

MARTHA-ESTRELLA GARCÍA-PÉREZ

**ANALYSE DES EFFETS PHARMACOLOGIQUES  
D'EXTRAITS POLYPHÉNOLIQUES ISSUS  
D'ESSENCES CANADIENNES POUR LE  
TRAITEMENT DU PSORIASIS**

Thèse présentée

à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en pharmacie  
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE PHARMACIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2012

© Martha-Estrella García-Pérez, 2012

## Résumé

Le psoriasis est une maladie de la peau pour laquelle aucun traitement curatif n'est encore connu, caractérisée par une inflammation accrue. Compte tenu des effets secondaires des traitements conventionnels, on estime qu'un pourcentage non négligeable de patients utilise des produits naturels. Les polyphénols sont des molécules multifonctionnelles pouvant être utilisées pour le traitement de maladies pluricausales comme le psoriasis. L'objectif général de ce travail a été d'étudier l'effet pharmacologique d'extraits polyphénoliques issus d'écorces d'essences canadiennes en vue d'une utilisation possible pour le traitement du psoriasis. Dans un premier temps, les extraits d'écorces de plusieurs essences canadiennes ont été analysés quant à leurs propriétés antioxydantes, toxiques et antiprolifératives. Les résultats de cette étude ont permis d'identifier l'extrait aqueux issu de l'écorce de l'épinette noire (*Picea mariana*) comme étant l'extrait brut le plus prometteur obtenu à partir d'écorces d'essences canadiennes. Puis, on a effectué la purification de cet extrait dans le but de produire une fraction enrichie en polyphénols et on a déterminé la structure moléculaire des composés majoritaires présents dans l'extrait purifié à l'aide de méthodes d'analyse chimique. Au total 28 composés ont été identifiés dans l'extrait purifié, en incluant le *trans*-resvératrol, qui a été trouvé dans des quantités importantes dans l'écorce de *Picea mariana* (104,19  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  par masse d'écorce sèche). Finalement, on a vérifié l'effet pharmacologique de l'extrait purifié sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$  en utilisant des kératinocytes psoriasiques. On a constaté que cet extrait a la capacité d'inhiber l'expression d'ICAM-1 ainsi que la production de l'IL-6, l'IL-8, la fractalkine, le VEGF, le monoxyde d'azote et l'élafine au sein des kératinocytes psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$ , ce qui a été relié à l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B. Ce travail a permis d'étudier pour la première fois le rôle immunopharmacologique d'un extrait polyphénolique en tant qu'agent anti-TNF- $\alpha$  sur les kératinocytes psoriasiques. De plus, il ouvre de nouvelles perspectives pour l'analyse du rôle individuel des composés contenus dans l'extrait purifié d'épinette noire pour le traitement du psoriasis.

## Abstract

Psoriasis is an incurable skin disorder characterized by an important inflammation. Clinically approved antipsoriatic treatments present many undesirable effects, therefore it has been estimated that a non negligible percent of patients use natural health products. Natural polyphenols are multifunctional molecules that could be used for the treatment of multi-causal diseases, such as psoriasis. The aim of this work was to study the pharmacological effect of polyphenolic extracts obtained from barks of Canadian species in order to evaluate their possible utilisation for psoriasis treatment. Extracts from barks of some Canadian species were firstly analyzed for their antioxidant, toxicological and antiproliferative properties. The black spruce (*Picea mariana*) extract obtained by hot water extraction was considered as the most valuable crude extract obtained from barks of Canadian species. Then, the purification of this extract was performed in order to produce a fraction enriched in polyphenols and the nature of major compounds present in the purified extract was determined using different chemical analysis methods. A total of 28 compounds were identified in the purified extract, including *trans*-resveratrol, which was determined to be present at significant level in the bark of *Picea mariana* (104.19  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dried bark). Finally, the influence of the purified extract on the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway on psoriatic keratinocytes was evaluated. It was found that this extract has the capacity to inhibit the ICAM-1 expression as well as the production of IL-6, IL-8, fractalkine; VEGF, nitric oxide and elafin by psoriatic keratinocytes upon TNF- $\alpha$  stimulation, which was attributed to the inhibition of TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation in these cells. This study provides new insight into the immunopharmacological role of a polyphenolic extract in impacting the TNF-induced responses by psoriatic keratinocytes. Additionally, it opens new perspectives for the analysis of the individual role of polyphenolic compounds present in this extract for psoriasis treatment.

## Avant-Propos

Étant donné le caractère multidisciplinaire de ce projet de recherche, ces travaux ont été réalisés au sein du Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX), du Centre de Recherche sur le bois (CRB) et du Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie de l'Université Laval (CRRI) sous la direction du Dre Roxane Pouliot, la codirection du Dre Tatjana Stevanovic et la collaboration du Dr Patrice E. Poubelle.

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, la Dre Roxane Pouliot. Son expertise dans le domaine cutané aussi bien que les connaissances reliées au psoriasis qu'elle détient ont été très importantes pour ce travail, qui a donné de nouveaux défis scientifiques à ma vie et pour cela je la remercie grandement.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à ma codirectrice, Dre Tatjana Stevanovic, car grâce à elle, j'ai pu découvrir le monde des extraits naturels et des polyphénols. Merci de m'avoir accueillie dans son équipe depuis la maîtrise, ce qui a nécessité 2 années d'attente, car, en tant que cubaine, il a été très difficile de quitter mon pays d'origine. Ses suggestions et ses compétences scientifiques reliées à la chimie de substances naturelles m'ont beaucoup aidée lors de la poursuite de mon doctorat.

Merci aussi au Dr Patrice E. Poubelle, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir encadrée avec autant de rigueur et d'enthousiasme. Je le remercie énormément, car j'ai pu bénéficier de ses conseils et de son aide en tout moment, aussi bien que de sa vaste expertise associée à l'immunologie et la pharmacologie.

Je tiens à remercier tout particulièrement les membres des 3 équipes de recherche pour leur support, leur encouragement et leur gentillesse. À tous les membres de l'équipe du Dre Pouliot, particulièrement à Alexandra Duque-Fernández, Jessica Jean et Amélie Talbot. Aussi, aux membres de l'équipe du Dre Stevanovic spécialement à Mariana Royer, Papa Diouf et Yves Bédard, lesquels partagent avec moi le même amour pour les polyphénols et les produits naturels. Également, je tiens à remercier les membres de l'équipe du Dr

Poubelle, en particulier Isabel Allaeys et Daniel Rusu qui ont toujours été présents et disponibles pour me guider peu importe les situations.

Merci à tous les membres du LOEX, du CRB et du CRRRI qui m'ont supportée, encouragée et qui, lors de nombreuses discussions, m'ont offert de judicieux conseils qui ont influencé positivement mon travail. Ce fut un privilège de partager avec des experts de plusieurs domaines scientifiques.

Aussi, je voudrais remercier le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie du Canada et le Fonds d'Enseignement et de Recherche de la Faculté de Pharmacie de l'Université Laval pour leur soutien financier. Sans ces bourses, mon parcours n'aurait pas été le même.

À mes parents et à ma sœur qui, par leur compréhension et leur amour, m'ont encouragée à me dépasser et à ne jamais abandonner malgré les difficultés. À mes amis, qui, dans les moments difficiles étaient toujours disponibles. Merci à mon fiancé Raul qui m'a beaucoup accompagnée, conseillée et supportée tout au long de ce travail, dans le meilleur et dans le pire.

Merci aussi à mon Dieu d'être une source d'inspiration à chaque instant.

*À mon frère, pour tout son soutien et son amour inconditionnel.*

# Table des matières

<i>Résumé</i> .....	<i>ii</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>iii</i>
<i>Avant-Propos</i> .....	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>vii</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>x</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>xi</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>xiii</i>
<i>Introduction et problématique</i> .....	<i>1</i>
<b>Chapitre 1. Revue de la littérature</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 La peau</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 L'épiderme .....	7
1.1.2 La jonction dermo-épidermique .....	11
1.1.3 Le derme.....	12
1.1.4 L'hypoderme .....	13
1.1.5 Les annexes cutanés .....	13
1.1.6 Différenciation épidermique normale.....	14
<b>1.2 Le psoriasis</b> .....	<b>18</b>
1.2.1 Les types de psoriasis.....	18
1.2.2 Niveaux de gravité.....	23
1.2.3 Épidémiologie .....	27
1.2.4 Facteurs génétiques .....	28
1.2.5 Facteurs environnementaux.....	31
1.2.6 Histologie .....	32
1.2.7 Différenciation cellulaire dans le psoriasis.....	33
1.2.8 Psoriasis et stress oxydant .....	35
1.2.9 La pathogenèse du psoriasis: une hypothèse.....	38
<b>1.3. Biologie du TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>41</b>
1.3.1 Le TNF- $\alpha$ : origine et synthèse.....	41
1.3.2 Signalisation intracellulaire du TNF- $\alpha$ .....	43
<b>1.4 La voie NF-<math>\kappa</math>B associée au TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>45</b>
1.4.1 Les composants de la voie d'activation NF- $\kappa$ B.....	45
1.4.2 La voie NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$ .....	48
1.4.3 Régulation de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B via la phosphorylation de p65 .....	49
<b>1.5 Rôle de la voie de signalisation du TNF-<math>\alpha</math> associé au NF-<math>\kappa</math>B dans la pathogenèse du psoriasis</b> .....	<b>50</b>
<b>1.6 Traitements antipsoriasiques disponibles</b> .....	<b>55</b>
1.6.1 Traitements topiques .....	56
1.6.2 Photothérapie.....	57
1.6.3 Traitements systémiques .....	58
1.6.4 Traitements biologiques .....	59
<b>1.7 Inconvénients reliés à l'utilisation des traitements antipsoriasiques anti-TNF<math>\alpha</math></b> .....	<b>63</b>
<b>1.8 État d'utilisation des produits naturels à base de plantes pour le traitement du psoriasis</b> .....	<b>64</b>
<b>1.9 Modèles dermopharmacologiques <i>in vitro</i> pouvant être utilisés pour étudier des nouveaux traitements antipsoriasiques</b> .....	<b>65</b>
1.9.1 Monocouche .....	66

1.9.2 Gel de collagène .....	67
1.9.3 Modèles développés par génie tissulaire .....	67
<b>1.10 Les polyphénols .....</b>	<b>67</b>
1.10.1 Classification .....	68
<b>1.11 Méthodes d'extraction des polyphénols dans des matrices végétales .....</b>	<b>82</b>
<b>1.12 Les polyphénols et le genre <i>Picea</i> .....</b>	<b>87</b>
1.12.1 Le genre <i>Picea</i> .....	87
1.12.2 Utilisation traditionnelle de divers tissus de l'épinette noire ( <i>Picea mariana</i> ) .....	88
1.12.3 Caractérisation des polyphénols dans les écorces d'essences appartenant au genre <i>Picea</i> .....	90
<b>1.13 Les polyphénols en tant qu'agents anti-TNF<math>\alpha</math> .....</b>	<b>93</b>
1.13.1 Polyphénols ayant un effet inhibiteur sur la synthèse et/ou la sécrétion de TNF- $\alpha$ .....	93
1.13.2 Polyphénols ayant un effet inhibiteur sur l'activité du TNF- $\alpha$ dans les cellules .....	95
<b>1.14 Les polyphénols et les produits de santé naturels .....</b>	<b>96</b>
1.14.1 Les produits de santé naturels .....	96
1.14.2 Importance de la caractérisation chimique pour la normalisation d'extraits polyphénoliques .....	97
1.14.3 Extraits polyphénoliques normalisés .....	98
<b>1.15 Les polyphénols dans le traitement du psoriasis .....</b>	<b>98</b>
1.15.1 Le resvératrol .....	99
1.15.2 La capsaïcine .....	101
1.15.3 Les polyphénols du thé vert .....	103
1.15.4 La curcumine .....	107
1.15.5 Les polyphénols de l'écorce du pin maritime français ( <i>Pinus pinaster</i> ) .....	111
<b>1.16 Forces et faiblesses au regard de l'utilisation des polyphénols pour le traitement du psoriasis .....</b>	<b>114</b>
<b>1.17 Objectifs de la recherche .....</b>	<b>119</b>
<b><i>Chapitre 2. Propriétés antioxydantes, toxiques et antiprolifératives d'extraits polyphénoliques issus d'essences canadiennes sur des kératinocytes normaux et psoriasiques .....</i></b>	<b><i>121</i></b>
<b>2.1 Avant-propos .....</b>	<b>122</b>
<b>2.2 Résumé .....</b>	<b>123</b>
<b>2.3 Article .....</b>	<b>124</b>
2.3.1 Abstract .....	125
2.3.2 Introduction .....	126
2.3.3 Materials and Methods .....	129
2.3.4 Results and discussion .....	137
2.3.5 Conclusions .....	147
2.3.6 Acknowledgements .....	148
2.3.7 References .....	149
<b><i>Chapitre 3. Les écorces de l'épinette noire (<i>Picea mariana</i>): une nouvelle source en trans-resvératrol et autres polyphénols bioactifs .....</i></b>	<b><i>154</i></b>
<b>3.1 Avant-propos .....</b>	<b>155</b>
<b>3.2 Résumé .....</b>	<b>156</b>
<b>3.3 Article .....</b>	<b>157</b>
3.3.1 Abstract .....	158



3.3.2 Introduction .....	159
3.3.3 Materials and Methods .....	161
3.3.4 Results and Discussion .....	170
3.3.5 Conclusions .....	178
3.3.6 Acknowledgments .....	180
3.3.7 References .....	181
<b>Chapitre 4. L'extrait polyphénolique d'épinette noire (<i>Picea mariana</i>) inhibe l'activation de NF-<math>\kappa</math>B au sein des kératinocytes psoriasiques stimulés avec le TNF-<math>\alpha</math> : implications pour le traitement du psoriasis .....</b>	<b>189</b>
<b>4.1 Avant-propos .....</b>	<b>190</b>
<b>4.2 Résumé .....</b>	<b>191</b>
<b>4.3 Article .....</b>	<b>192</b>
4.3.1 Abstract .....	193
4.3.2 Introduction .....	194
4.3.3 Materials and Methods .....	198
4.3.4 Results .....	204
4.3.5 Discussion .....	221
4.3.6 Conclusions .....	229
4.3.7 Acknowledgments .....	230
4.3.8 References .....	231
<b>Chapitre 5. Discussion et Conclusions .....</b>	<b>241</b>
<b>5.1 Discussion .....</b>	<b>242</b>
5.1.1 Identification de l'extrait brut polyphénolique le plus prometteur .....	243
5.1.2 Purification de l'extrait brut le plus prometteur et détermination de la structure moléculaire des composés majoritaires présents dans l'extrait purifié .....	247
5.1.3 Détermination de l'effet pharmacologique de l'extrait purifié sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$ en utilisant des cellules en monocouche essentiellement psoriasiques .....	250
<b>5.2 Perspectives .....</b>	<b>257</b>
5.2.1 Étude de l'effet pharmacologique des polyphénols isolés à partir de l'extrait purifié de l'épinette noire ( <i>Picea mariana</i> ) sur des voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse du psoriasis .....	257
5.2.2 Étude de la pénétration cutanée de l'extrait purifié et des polyphénols isolés sur des substituts cutanés sains et psoriasiques préparés par génie tissulaire, le comparant à celle obtenue sur la peau normale humaine et la peau psoriasique native .....	260
5.2.3 Analyses de la stabilité de l'extrait purifié .....	261
<b>5.3 Conclusions .....</b>	<b>262</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>267</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>312</b>
<b>Annexe 1. Développement de médicaments antipsoriasiques: défis et nouveaux traitements .....</b>	<b>312</b>
<b>Annexe 2. Psoriasis : causes, traitements et modèles pathologiques .....</b>	<b>370</b>
<b>Annexe 3. Présence des polyphénols dans la diète et dans la biomasse forestière .....</b>	<b>438</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 Outils d'évaluation de la gravité du <i>psoriasis vulgaris</i> .....	23
Tableau 2 Termes utilisés lors des essais cliniques pour évaluer la gravité du <i>psoriasis vulgaris</i> et la réussite thérapeutique.....	25
Tableau 3 Prévalence estimée du <i>psoriasis</i> au Canada.....	27
Tableau 4 Genès associés au <i>psoriasis</i> .....	30
Tableau 5 Effets du TNF- $\alpha$ au niveau cutané.....	53
Tableau 6 Efficacité thérapeutique des traitements biologiques anti-TNF- $\alpha$ comparativement à d'autres traitements antipsoriasiques.....	60
Tableau 7 État d'utilisation des produits naturels pour le traitement du <i>psoriasis</i> d'après des enquêtes effectuées au niveau mondial.....	65
Tableau 8 Classification des solvants selon l'évaluation du risque.....	85
Tableau 9 Solvants fréquemment utilisés pour l'extraction des polyphénols.....	87
Tableau 10 Utilisations traditionnelles de différents tissus de l'épinette noire.....	89
Tableau 11 Rendement en extractibles dans les écorces de l'épinette de Norvège ( <i>Picea abies</i> ).....	91
Tableau 12 Exemples de polyphénols ayant démontré un effet inhibiteur sur la production et/ou la sécrétion de TNF- $\alpha$ .....	94
Tableau 13 Exemples de polyphénols ayant un effet inhibiteur sur l'activité du TNF- $\alpha$ dans les cellules.....	95
Table 14 Extraction yields, total phenol content, flavonoids, hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins of crude extracts from Canadian species obtained by ethanolic maceration and hot water extraction.....	137
Table 15 Free radical scavenging activity of Canadian bark hot water and ethanolic extracts.....	139
Table 16 Initial cytotoxicity of ethanolic yellow birch extract (YB <sub>Mac</sub> ), hot water black spruce extract (BS <sub>HWE</sub> ) and Oligopin <sup>®</sup> on normal human keratinocytes.....	142
Table 17 Total phenol, flavonoid, hydroxycinnamic acid and proanthocyanidin contents of hot water extract from <i>Picea mariana</i> bark and its ethyl acetate fraction.....	170
Table 18 Undesirable effects of available antipsoriatic treatments.....	323
Table 19 Results of worldwide surveys related to satisfaction of psoriatic patients with their therapies.....	328
Table 20 Recent patents describing natural preparations for <i>psoriasis</i> treatment.....	330
Table 21 Recent patents applications related to pure chemical compounds alone or in combination for <i>psoriasis</i> treatment.....	331
Table 22 Expression of differentiation markers in normal and psoriatic skin.....	380
Table 23 Antioxydants and oxidative markers in <i>psoriasis</i> .....	384
Table 24 Complete list of actual or future therapies for <i>psoriasis</i> .....	397
Table 25 Genetically engineered in vivo models of <i>psoriasis</i> .....	408
Table 26 Total phenol contents of pine tree extracts from different plant-parts.....	478
Table 27 Relative concentration of phenolic compounds in woody plant tissues.....	482
Table 28 Summary of the promoting health effects of polyphenols from forest biomass.....	485

## Liste des figures

Figure 1 Structure de l'épiderme.....	8
Figure 2 Représentation schématique de la couche cornée.....	11
Figure 3 Les aspects cliniques du psoriasis.....	19
Figure 4 Psoriasis palmo-plantaire.....	21
Figure 5 Caractéristiques histologiques du psoriasis.....	32
Figure 6 Différenciation des kératinocytes normaux et psoriasiques.....	34
Figure 7 Une hypothèse du développement du psoriasis.....	40
Figure 8 Signalisation intercellulaire du TNF- $\alpha$ .....	42
Figure 9 Signalisation intracellulaire du TNF- $\alpha$ via le récepteur de type 1 (TNF-R1).....	44
Figure 10 La voie NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$ .....	49
Figure 11 Rôle central du TNF- $\alpha$ dans le développement du psoriasis.....	52
Figure 12 Expression de NF- $\kappa$ B phosphorylé au sein de la peau psoriasique (lésionnelle et non-lésionnelle) comparativement à la peau normale humaine: effets du traitement avec l'étanercept. .	55
Figure 13 Réactions adverses pouvant apparaître lors d'un traitement avec des agents biologiques anti-TNF- $\alpha$ .....	64
Figure 14 Exemple de polyphénols à squelette C6.....	69
Figure 15 Exemple de polyphénols à squelette C6-C1.....	70
Figure 16 Exemple de polyphénols à squelette C6-C2 et C6-C3.....	71
Figure 17 Quelques stilbènes pouvant être retrouvés dans les tissus des arbres.....	72
Figure 18 Structure de base des lignanes.....	73
Figure 19 Quelques lignanes identifiés dans les tissus de <i>Picea abies</i> .....	74
Figure 20 Structure chimique des dérivés semi-synthétiques de la podophyllotoxine, utilisés en clinique comme des agents anticancéreux.....	75
Figure 21 Familles des flavonoïdes.....	76
Figure 22 Structure chimique du kaempférol et de la quercétine, fréquemment retrouvés dans les tissus d'espèces appartenant au genre <i>Picea</i> .....	77
Figure 23 Structure et nomenclature de flavonoïdes à squelette propane.....	78
Figure 24 Exemples de gallotannins.....	79
Figure 25 Unités des tanins condensés.....	81
Figure 26 Distribution de l'épinette noire ( <i>Picea mariana</i> ) au Canada et aux États-Unis.....	88
Figure 27 Structure chimique des stilbènes astringine, isorhapontine et isorhapontigénine, retrouvés dans les écorces d'espèces appartenant au genre <i>Picea</i> .....	92
Figure 28 Structure chimique des isomères du resvératrol.....	99
Figure 29 Structure chimique de la capsaïcine.....	101
Figure 30 Des dérivés majeurs de l'épicatéchine retrouvés dans le thé vert.....	103
Figure 31 Ressemblances structurales entre l'épigallocatechin-3-gallate et les inhibiteurs de l'enzyme dihydrofolate réductase (méthotrexate et tétrahydroquinazoline).....	106
Figure 32 Des constituants de l'extrait du rhizome de <i>Curcuma longa</i> L.....	108
Figure 33 Quelques composés phénoliques identifiés dans l'extrait normalisé de l'écorce du pin maritime français.....	112
Figure 34 Effects of yellow birch (YB), black spruce (BS) and Oligopin <sup>®</sup> extracts on the growth of (a) normal, (b) non-lesional psoriatic and (c) lesional psoriatic keratinocytes after exposure during 48 h.....	145
Figure 35 Typical RP-HPLC chromatogram ( $\lambda=214\text{nm}$ ) of phase A. Peak numbers correspond to compounds presented in figure 37.....	165

Figure 36 Typical RP-HPLC chromatogram ( $\lambda=214\text{nm}$ ) of phase B. Peak numbers correspond to compounds presented in figure 37. ....	166
Figure 37 Chemical structures of the compounds isolated from the ethyl acetate soluble fraction (BS-EAc <sub>f</sub> ) obtained from the hot water extract of black spruce bark (BS <sub>HWE</sub> ) .....	169
Figure 38 Effects of BS-EAc <sub>f</sub> on normal human keratinocyte (NHK) viability .....	204
Figure 39 Effects of BS-EAc <sub>f</sub> on TNF- $\alpha$ induced expression of ICAM-1 on normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes. ....	206
Figure 40 Effects of BS-EAc <sub>f</sub> on TNF- $\alpha$ induced production of IL-6 and VEGF on normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes .....	209
Figure 41 Effects of BS-EAc <sub>f</sub> on TNF- $\alpha$ induced production of IL-8 and fractalckine/CX3CL1 in normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes.....	212
Figure 42 Effects of BS-EAc <sub>f</sub> on TNF- $\alpha$ induced production of trappin-2/elafin on normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes .....	215
Figure 43 Effects of BS-EAc <sub>f</sub> on TNF- $\alpha$ induced nitric oxide production on normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes .....	217
Figure 44 Inhibition of the TNF-induced activation of NF- $\kappa$ B by BS-EAc <sub>f</sub> in psoriatic keratinocytes .....	219
Figure 45 Chemical structure of various small molecules proposed for psoriasis treatment in recent patent applications published from 2000-2011. ....	340
Figure 46 Schematic representation of the histological aspect of hyperproliferative psoriatic epidermis .....	378
Figure 47 Self-assembly method.....	411
Figure 48 General phenylpropanoid biosynthetic pathway.....	446
Figure 49 Biosynthetic pathways to different lignans.....	459
Figure 50 Relations between different classes of flavonoids .....	462
Figure 51 HPLC-DAD chromatograms of 95% aqueous ethanolic extracts (room temperature for 24h) of <i>Betula alleghaniensis</i> Britton. tissue at 1 mg. mL <sup>-1</sup> ( $\lambda$ 280 nm).....	482

## Liste des abréviations

3T3	<i>3-day transfer, inoculum 3 x 10<sup>5</sup> cells</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse de la variance
AP-1	Protéine activatrice 1 ( <i>activator protein 1</i> )
AP-2	Protéine activatrice 2 ( <i>activator protein 2</i> )
ARD	<i>ankyrin repeat</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Surface corporelle atteinte
BS-EAc <sub>f</sub>	Fraction soluble dans l'acétate d'éthyle obtenue à partir de l'extrait aqueux d'écorces de l'épinette noire ( <i>Picea mariana</i> )
β-TrcP	<i>β transducin repeat containinig protein</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CRB	Centre de Recherche sur le Bois
CRE	<i>Cyclic adenosine monophosphate response element</i>
CRRI	Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie
DAD	Détection a barrettes de diodes ( <i>diode-array detection</i> )
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHR	Domaine d'Homologie Rel
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DLQI	Indice de qualité de vie en dermatologie
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EC	Épicatéchine
ECG	Épicatéchine-3-gallate
EDTA	<i>Ethylene diamino tetraacetic acid</i>
EGC	Épigallocatechine
EGCG	Épigallocatechine-3-gallate
EGF	Facteur de croissance épidermique ( <i>epidermal growth factor</i> )
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPS	Extraction en phase solide
ERA	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESI	<i>Elastase specific inhibitor</i>
ET-1	<i>Endothelin-1</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>

GMCSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HWE	Extraction à l'eau chaude ( <i>hot water extraction</i> )
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire ( <i>intercellular adhesion molecule</i> )
IFN	Interféron
I $\kappa$ B	Protéines inhibitrices de l'activité $\kappa$
IKK	I $\kappa$ B kinases
IL	Interleukine
INF	Interferon
iNOS	Oxyde nitrique synthétase inductible ( <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
K	Kératine
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes ( <i>keratinocyte growth factor</i> )
KNH	Kératinocytes normaux humains
LDH	<i>Lactate deshydrogenase</i>
LFA	<i>Lymphocyte fonction associated antigen</i>
LOEX	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocytes T
MAC	Macération
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MS	Spectroscopie de masse ( <i>mass spectrometry</i> )
MSK1	<i>Mitogen and stress activated protein kinase 1</i>
mTNF	Forme transmembranaire du facteur de nécrose tumorale
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NHK	<i>Normal human keratinocytes</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>

NO	Monoxyde d'azote ( <i>nitric oxyde</i> )
PASI	Indice de surface et de gravité du psoriasis
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	Potentiel d'hydrogène
PhK	Phosphorylase kinase
PI	<i>Propidium iodide</i>
PK	<i>Psoriatic keratinocytes</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PSN	Produit de santé naturel
PUVA	Photothérapie aux rayons UVA
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i>
RIP	<i>Receptor interactive protein</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RP	<i>Reverse phase</i>
Rt	<i>Retention time</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SCID	Immunodéficience sévère combinée ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )
SD	Écart-type ( <i>standard deviation</i> )
SKALP	<i>Skin-derived anti-leukoproteinase</i>
SLN	Signal de localisation nucléaire
SPRR	Petite protéine riche en proline ( <i>small proline-rich protein</i> )
STAT	Signal de transduction et d'activation de la transcription ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
sTNF	Forme soluble du facteur de nécrose tumorale
TACE	<i>TNF-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
TAK	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>-activated kinase</i>
TBDE	<i>Trypan blue dye exclusion</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper cells</i>
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>
tma	Tonne métrique anhydre
TNF	Facteur de nécrose tumorale ( <i>tumour necrosis factor</i> )
TNF-R1	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1</i>
TNF-R2	<i>Tumor necrosis factor receptor type 2</i>
TRADD	<i>TNF receptor associated with death domain</i>
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloïde</i>

TxA <sub>2</sub>	<i>Thromboxane A2</i>
UV	Ultraviolet
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )



## Introduction et problématique

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui nécessite des soins continus et pour laquelle aucun traitement curatif n'est encore connu. On estime que le psoriasis atteint 2 à 3 % de la population mondiale (Koo, 1996). Environ 20% des patients psoriasiques sont affectés par les formes modérée à sévère de la maladie (Choi and Koo, 2003). Au Canada, plus de 500 000 personnes (soit environ 1,7 % de la population) souffrent de psoriasis, parmi lesquelles 40 000 sont des aînées ( $\geq 70$  ans) et 20 000 des enfants ( $\leq 10$  ans) (dermatologie, 2009). Le psoriasis représente un lourd fardeau pathologique qui dépasse les symptômes cutanés, à tel point que ses répercussions sur les fonctions physiques et psychologiques des patients peuvent être comparables à celles du cancer, de l'arthrite, de l'hypertension, des maladies cardiaques, du diabète ou de la dépression (Rapp *et al.*, 1999).

À l'heure actuelle, les médecins disposent de traitements antipsoriasiques symptomatiques sans pouvoir offrir de traitements curatifs. Ces traitements sont fondamentalement dirigés vers : a) l'inhibition de l'hyperprolifération des kératinocytes psoriasiques (*cyclosporine A*, *rétinoïdes*); b) la normalisation du processus de différenciation cellulaire des kératinocytes (*analogues de la vitamine D*, *rétinoïdes*); c) la diminution de l'activation et de la migration d'immunocytes dans l'épiderme et le derme (*cyclosporine A*, *médicaments biologiques*) et enfin; d) la neutralisation de certaines cytokines pro-inflammatoires (*médicaments biologiques*). Un des problèmes qui limite l'utilisation à long terme des traitements antipsoriasiques disponibles est, en effet, relié à leur toxicité. Ceci inclut la néphrotoxicité (*cyclosporine A*), l'hépatotoxicité (*méthotrexate*), le cancer de la peau (*photothérapie*), la myélosuppression (*hydroxyurée*), la tératogénicité (*rétinoïdes oraux*), l'immunosuppression ainsi qu'un risque d'infections accru, dont la tuberculose (*médicaments biologiques*) (Naldi and Griffiths, 2005; Papp, 2006). Par ailleurs, l'efficacité des thérapies présentement disponibles reste incertaine dans de nombreux cas menant ainsi à une insatisfaction importante des patients (Krueger *et al.*, 2001).

Le TNF- $\alpha$  (17 kDa) est une protéine homotrimérique qui peut être produite en réponse à des agressions (inflammation, infection ou blessure) par différents types de cellules, dont les macrophages, les cellules T, les mastocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les kératinocytes. Il s'agit d'une cytokine multifonctionnelle qui joue un rôle majeur dans l'inflammation, la réponse immunitaire et l'apoptose (Schottelius *et al.*, 2004). Ainsi, un des mécanismes moléculaires proposés est que le récepteur de type 1 (TNF-R1), en réponse au TNF- $\alpha$ , subit une trimérisation en recrutant une molécule adaptatrice appelée TRADD. Cette molécule interagit à travers la voie de signalisation TRADD-TRAF2-RIP conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, à l'augmentation de l'expression du TNF- $\alpha$  lui-même, à celle d'autres cytokines/chimiokines (IL-1, IL-6, IL-8) et à la surexpression de gènes anti-apoptotiques, provoquant alors une rétroaction positive en faveur de la production de cytokines et une augmentation de l'inflammation au sein des plaques psoriasiques (Schottelius *et al.*, 2004). La stimulation cellulaire par le TNF- $\alpha$  s'accompagne de l'activation de divers facteurs de transcription, dont NF- $\kappa$ B étroitement contrôlé par ses protéines inhibitrices I $\kappa$ B. L'activation de NF- $\kappa$ B est initiée par des signaux qui dégradent les I $\kappa$ B permettant alors la migration de NF- $\kappa$ B jusqu'au noyau cellulaire où il régule la transcription d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines impliquées au niveau de: a) la réponse inflammatoire; b) la réponse immunitaire; c) la prolifération cellulaire et d) l'apoptose (Piette *et al.*, 1997). En particulier, la réponse inflammatoire qui accompagne l'activation de NF- $\kappa$ B se caractérise par une augmentation de la production de cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), des chimiokines (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, RANTES) et des molécules d'adhésion (ICAM, VCAM).

L'amélioration clinique nette liée aux traitements anti-TNF- $\alpha$  a mis en évidence l'importance de cette cytokine dans la pathogenèse du psoriasis (Schottelius *et al.*, 2004). En effet, les résultats d'études cliniques ont montré que la neutralisation du TNF- $\alpha$  avec des traitements biologiques tels, l'infliximab et l'adalimumab provoque une amélioration clinique du psoriasis auprès de 80-88% des patients comparativement à d'autres traitements conventionnels tels la cyclosporine A, le méthotrexate ou les traitements biologiques

inhibiteurs des lymphocytes T (MacDonald and Burden, 2007). Toutefois, l'utilisation prolongée des traitements biologiques anti-TNF- $\alpha$  a été associée à des réactions indésirables. Ainsi, on a signalé entre autres l'apparition de céphalées, de la tuberculose, des cas de maladie démyélinisante, de syndrome lupique et d'infections opportunistes (Keane *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2002). De ce fait, les recherches mettant en jeu de nouvelles molécules actives capables de bloquer le TNF- $\alpha$  tout en étant efficaces, sécuritaires et peu dispendieuses, sont privilégiées et toujours d'actualité pour le développement de nouveaux produits antipsoriasiques.

Les polyphénols sont des composés aromatiques portant plus d'une fonction hydroxyle sur un noyau benzénique. Il s'agit de molécules multifonctionnelles reconnues comme d'excellents antioxydants, pouvant également agir en tant qu'agents antiprolifératifs. Outre ces propriétés, ils peuvent inhiber l'activation des protéines et des facteurs de transcription comme le NF- $\kappa$ B (Brennan and O'Neill, 1998). De plus, ils agissent en tant qu'agents anti-inflammatoires via la diminution de la production de cytokines/chimiokines dans divers types cellulaires (Trompezinski *et al.*, 2003). Par ailleurs, ils semblent stimuler le processus de différenciation cellulaire (Balasubramanian *et al.*, 2006). Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction de leur structure chimique. On retrouve des structures simples (C6, C6-C1), des noyaux dérivant de l'extension du phényl propane (C6-C3) comme les lignanes, les néolignanes, les chalcones, les flavones, les flavonols ainsi que des dérivés du flavane ou du flavane-3-ol (catéchines et proanthocyanidines).

Les polyphénols peuvent agir via plusieurs mécanismes. En effet, des flavonoïdes comme la lutéoline et la quercétine peuvent inhiber la synthèse et la libération du TNF- $\alpha$  au sein des macrophages stimulés par des lipopolysaccharides (Herath *et al.*, 2003). Il semblerait que la double liaison entre les carbones 2 et 3 des flavonoïdes, aussi bien que le groupement cétonique en position 4 soient nécessaires à la puissante activité inhibitrice sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  (Herath *et al.*, 2003). De plus, certains polyphénols peuvent agir directement sur la sous-unité p50 du facteur de transcription NF- $\kappa$ B provoquant son inactivation (Brennan and O'Neill, 1998). La modification de la sous-unité p50 peut donc

prévenir la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et l'assemblage de NF- $\kappa$ B à l'ADN (Brennan and O'Neill, 1998). Certains types de polyphénols possèdent aussi la capacité de susciter la différenciation cellulaire de kératinocytes normaux en activant l'expression de l'involucrine et la conversion des kératinocytes indifférenciés en cornéocytes (Balasubramanian *et al.*, 2006). Également, ils sont capables de diminuer la production d'IL-8 de kératinocytes normaux stimulés par le TNF- $\alpha$  (Trompezinski *et al.*, 2003). De ce fait, des polyphénols tels que la curcumine et ses dérivés ont été utilisés lors d'essais cliniques de phase II pour le traitement du psoriasis (Strimpakos and Sharma, 2008b). Ainsi, nous croyons que cette polyvalence, quant à au mécanisme d'action de ces molécules, pourrait constituer un avantage pour le traitement des maladies pluricausales comme le psoriasis où plus d'une quarantaine d'événements cellulaires sont en cause. Ceci est d'autant plus intéressant en considérant qu'un pourcentage non négligeable de patients atteints de psoriasis utilisent des produits de santé naturels contenant des polyphénols, des triterpènes, des alcaloïdes ou des acides gras polyinsaturés (Fleischer *et al.*, 1996).

Plusieurs sources de polyphénols sont retrouvées dans la nature. On les retrouve entre autres dans les pépins de raisins, le thé, les fruits, les légumes et les écorces d'arbres. Ces dernières sont particulièrement riches en composés polyphénoliques de faible masse moléculaire (flavonoïdes, stilbènes, acides phénoliques, lignanes, neolignanes) et en proanthocyanidines (Stevanovic *et al.*, 2009). En effet, les arbres se caractérisent pour une forte lignification de leurs tissus et par conséquent représentent des précieuses sources de molécules dérivées de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, telles les polyphénols.

Le travail qui sera présenté dans cette thèse a pour but d'étudier l'action pharmacologique d'extraits polyphénoliques issus d'écorces d'essences canadiennes en vue d'une utilisation possible dans le traitement du psoriasis. Pour ce faire, les propriétés antioxydantes, antiprolifératives et la toxicité de divers extraits polyphénoliques bruts, issus d'écorces de plusieurs essences canadiennes, ont été étudiées *in vitro* sur des kératinocytes humains dans le but de choisir l'extrait le plus prometteur. Par la suite, l'extrait retenu a été purifié et la structure moléculaire de ses principaux composés a été déterminée en utilisant diverses

méthodes d'analyse chimique, notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la spectroscopie de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Finalement, l'effet pharmacologique de cet extrait purifié sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$  a été étudié, tout en déterminant son effet sur la expression/production de molécules pro-inflammatoires impliquées dans la pathogenèse du psoriasis, telles : l'IL-6, l'IL-8, la CX3CL1/fractalkine, la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1, le VEGF, l'élafine, et le monoxyde d'azote.

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

## 1.1 La peau

La peau est le plus grand organe du corps humain qui a, entre autres, pour fonction de défendre l'organisme. Il s'agit d'un mince épithélium dont l'épaisseur moyenne peut varier entre 1 et 4 mm selon la localisation (Melissopoulos and Levacher, 1998). Elle contient fondamentalement 3 couches qui sont anatomiquement et fonctionnellement distinctes, soit l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme forme une barrière physicochimique qui varie relativement peu en épaisseur (75-100  $\mu\text{m}$ ) à l'exception des paumes des mains et des plantes des pieds où il peut atteindre une épaisseur de 0,4 to 0,6 mm (Odland and Short, 1971). Le derme est composé du tissu conjonctif et contribue à la flexibilité de la peau (Kieda *et al.*, 1995). Quant à l'hypoderme, il est principalement constitué d'adipocytes et constitue une grande réserve d'énergie de l'organisme (Kierszenbaum, 2006).

### 1.1.1 L'épiderme

L'épiderme, épithélium malpighien kératinisant avasculaire (étymologiquement formé en grec des mots *epi*, sur et *derma*, peau) constitue une structure dynamique aux rôles physiologiques multiples de protection. L'épiderme est principalement constitué de kératinocytes qui représentent plus de 80% des cellules présentes dans ce tissu (Melissopoulos and Levacher, 1998). Il comprend également trois autres types cellulaires dont les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

En dehors de sa fonction de barrière physicomécanique hydrophobe déterminée en grande partie par la présence du *stratum corneum*, l'épiderme possède aussi d'autres fonctions physiologiques essentielles à la protection de l'organisme (Nemes and Steinert, 1999). Ainsi, l'épiderme est considéré comme une barrière immunologique et bactérienne, de par la présence des cellules de Langerhans et des kératinocytes impliqués dans la sécrétion de défensines et d'autres médiateurs contribuant à la protection de la peau contre l'attaque des agents externes. Cette couche protectrice constitue une barrière actinique assurée par la présence des mélanocytes qui pigmentent la peau la protégeant de l'influence négative des rayons ultraviolets. Également, elle joue un rôle important en tant que barrière neurosensorielle par les cellules de Merkel, les corpuscules tactiles et les terminaisons nerveuses libres intra-épidermiques. Enfin, l'épiderme est aussi un tissu sécrétoire

autocrine et paracrine: hormones, cytokines, chimiokines et facteurs de croissance sont régulièrement produits pour assurer non seulement sa trophicité et son homéostasie dermo-épidermique, mais aussi celle de l'organisme dans son ensemble (Aubin, 2011). Chez l'humain, l'épiderme est composé de cinq couches cellulaires, ou strates, superposées, déterminées en partant de l'intérieur vers l'extérieur par: a) la couche basale ou *stratum germinativum*; b) la couche épineuse ou *stratum spinosum*; c) la couche granuleuse ou *stratum granulosum*; d) la couche claire ou *stratum lucidum* et e) la couche cornée ou *stratum corneum* (Figure 1).

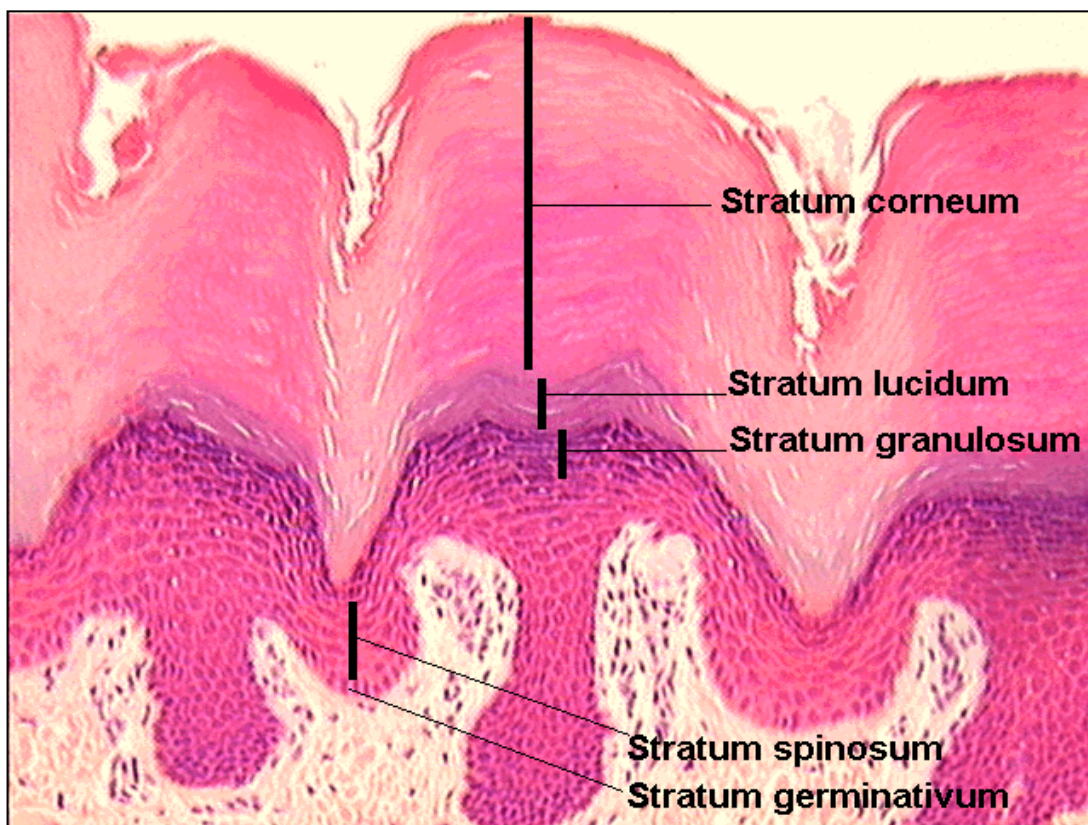


Figure 1 Structure de l'épiderme.

D'après [http://neuromedia.neurobio.ucla.edu/campbell/skin/wp\\_images/161\\_epidermis.gif](http://neuromedia.neurobio.ucla.edu/campbell/skin/wp_images/161_epidermis.gif)

#### 1.1.1.1 La couche basale (*stratum germinativum*)

La couche basale (ou *stratum germinativum*) est la couche la plus profonde de l'épiderme constituée d'une seule épaisseur de cellules de forme cuboïdale, soit les kératinocytes en prolifération. C'est à cet endroit que se retrouvent les cellules souches épidermiques



responsables de la production constante de kératinocytes par mitose et ainsi, du renouvellement complet de l'épiderme normalement atteint en 25-30 jours ou en 40-50 jours dépendamment des sites (Stevens and Lowe, 2005). En dehors des kératinocytes reliés entre eux par des desmosomes, la couche basale renferme aussi des mélanocytes (cellules produisant la mélanine reliées à la membrane basale via des hémidesmosomes) et les cellules de Merkel. Ces dernières sont considérées comme des cellules réceptrices sensorielles qui sont attachées aux kératinocytes via les desmosomes et qui peuvent être retrouvées en amas pour former des corpuscules tactiles (Stevens and Lowe, 2005).

#### 1.1.1.2 La couche épineuse (*stratum spinosum*)

La couche épineuse, *stratum spinosum* ou couche de Malpighi renferme des kératinocytes présentant une forme irrégulière (hérissée) lesquels forment 3 ou 4 assises de cellules en peau fine et 5 à 6 en peau épaisse. À l'intérieur de cette couche, les cellules ont une forme polyédrique à noyaux sphériques, étant reliées les unes avec les autres par les desmosomes (Eckert and Rorke, 1989). C'est précisément au niveau de la couche épineuse qu'on retrouve les kératines de type 1 et 10 ainsi que le début de la production d'enzymes comme la transglutaminase (Blumenberg and Tomic-Canic, 1997). Bien que présentes dans tout l'épiderme, les cellules de Langerhans, spécialisées dans la reconnaissance des antigènes, sont retrouvées le plus souvent dans cette couche (Stevens and Lowe, 2005).

#### 1.1.1.3 La couche granuleuse (*stratum granulosum*)

La couche granuleuse ou *stratum granulosum* constitue la dernière couche où on peut observer les noyaux à l'intérieur des kératinocytes. Celle-ci possède des cellules ayant deux à cinq épaisseurs dans les épithéliums épais alors qu'elles sont très peu apparentes dans les épithéliums minces (Melissopoulos and Levacher, 1998). En arrivant à la couche granuleuse, l'aspect des kératinocytes change considérablement pour devenir des cellules aplaties où leur noyau et leurs organites commencent à se désintégrer pour produire des granules. C'est précisément à ce niveau qu'on peut retrouver les granules de kératohyaline et les corps lamellaires, lesquels ont un rôle important dans la formation des lipides intercellulaires (Eckert, 1989). Également, dans la couche granuleuse il est possible de

trouver des protéines impliquées dans la différenciation des kératinocytes telles l'involucrine, la loricrine et la filaggrine (Presland and Dale, 2000).

#### 1.1.1.4 La couche claire (*stratum lucidum*)

La couche claire ou *stratum lucidum* se présente uniquement dans les peaux épaisses, soit sur la paume des mains et la plante des pieds et elle se reconnaît par la présence de kératinocytes morts, aplatis et clairs. Il s'agit d'une couche de transition où on ne distingue pas de limite cellulaire précise (Melissopoulos and Levacher, 1998). C'est au niveau de cette couche que la profilaggrine se transforme en filaggrine.

#### 1.1.1.5 La couche cornée (*stratum corneum*)

Le *stratum corneum* a une fonctionnalité et une plasticité très importantes au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Cette interface, en équilibre avec le milieu extérieur et intérieur grâce au processus de cornification et de desquamation, permet le renouvellement épidermique physiologiquement et génétiquement programmé au travers de modifications morphologiques et biochimiques (kératinocytes, desmosomes, kératines) donnant naissance aux cornéocytes, aux lipides intercornéocytaires et aux cornéodesmosomes (Eckert and Rorke, 1989). Ainsi, à la différence des kératinocytes, les cornéocytes se caractérisent par une forme complètement aplatie, avec l'absence de noyau et d'organites cytoplasmiques, étant également caractérisés par la présence d'un cytoplasme rempli de trousseaux fibrillaires formés à partir des filaments de kératine et des grains de kératohyaline (Eckert, 1989). Dans ce contexte, une activité enzymatique intense se déroule soit pour la synthèse de l'enveloppe cornée (involucrine, loricrine, transglutaminase dépendante), soit pour l'hydrolyse totale de la filaggrine, qui permet la constitution des facteurs d'hydratation (Hohl, 1990). Dans la littérature, on considère souvent *le stratum corneum* comme un «mur de brique» où les cornéocytes (briques) sont entourés d'une matrice de lipides spécialisés (ciment) (Harding, 2004; Jackson *et al.*, 1993) (Figure 2).

La desquamation a lieu au niveau du *stratum corneum* et se caractérise par le détachement des couches superficielles de l'épiderme sous forme de petites pellicules appelées: squames (Jackson *et al.*, 1993). Il s'agit d'un phénomène normal d'exfoliation de l'épiderme. Ainsi,

en arrivant à la surface, les cellules vont alors se séparer et seront remplacées par celles qui les suivent. Deux mécanismes seraient donc impliqués dans ce processus: la destruction des membranes lipido-protéiques cornéocytaires et la dégradation enzymatique des cornéodesmosomes (Melissopoulos and Levacher, 1998).

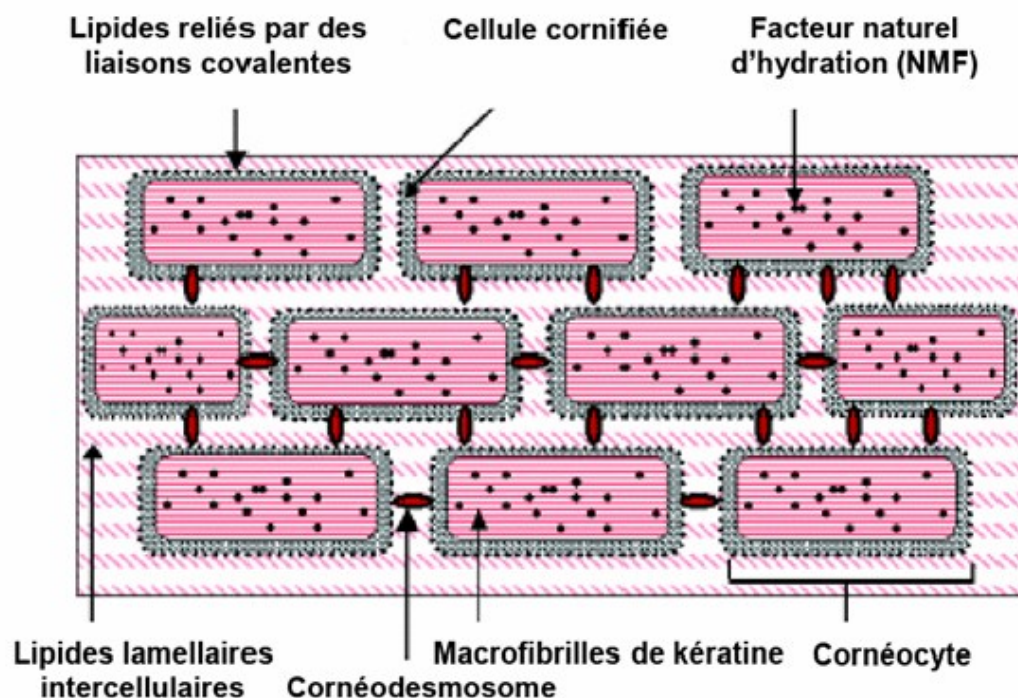


Figure 2 Représentation schématique de la couche cornée. Tirée de Harding, 2004.

### 1.1.2 La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique est la région acellulaire qui solidifie l'épiderme et le derme. Elle est fondamentalement constituée de collagène IV, laminine, fibronectine, héparane sulfate, glycoprotéines et de protéoglycannes (Wysocki, 1999). En général, on lui attribue plusieurs rôles dont ceux de soutien, de contrôle du comportement cellulaire au cours du développement tissulaire et de filtre pour contrôler le passage de diverses molécules (Kanitakis, 2002).

### 1.1.3 Le derme

Le derme est représenté par un tissu conjonctif résistant et flexible, principalement constitué par des cellules d'origine mésenchymateuse connues sous le nom de fibroblastes (Kanitakis, 2002). Il est considéré comme une source nourricière et un support pour l'épiderme, ayant aussi un rôle important dans la thermorégulation, la cicatrisation et l'élimination de substances toxiques. La matrice extracellulaire, sécrétée par les fibroblastes, est formée par un ensemble de macromolécules procurant la force mécanique dont la peau a besoin (Rosenbloom *et al.*, 1993). Elle est principalement composée de protéines de structures fibreuses (collagènes de type 1 ou 3 et élastine), de glycoprotéines adhésives (fibronectine et laminine), de protéoglycanes et d'hyaluronanes (Culav *et al.*, 1999). La matrice extracellulaire possède plusieurs fonctions dont celles de permettre la rétention des molécules dans le tissu, de servir de substrat pour l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire et d'influencer directement la forme et la fonction des cellules (Melissopoulos and Levacher, 1998).

Trois couches composent le derme: a) le derme profond, relié à l'hypoderme par des trousseaux de collagène; b) le derme réticulaire, composé de tissu conjonctif dense et irrégulier contenant d'épais faisceaux de fibres de collagène qui confèrent à la peau résistance et élasticité et qui participent au maintien de son hydratation; c) le derme papillaire, jouté à la jonction dermo-épidermique, une mince couche irrégulière de tissu conjonctif où sont retrouvées les papilles dermiques, responsables des empreintes digitales (Stevens and Lowe, 2005).

En dehors des fibroblastes, le derme renferme aussi le système vasculaire de la peau, des cellules du système immunitaire (lymphocytes, mastocytes, macrophages), aussi bien que des fibres nerveuses et des récepteurs sensoriels (Stevens and Lowe, 2005). La vascularisation cutanée est caractérisée par la présence de trois réseaux sanguins interconnectés soit les plexus sous-papillaire, cutané et sous-cutané (Stevens and Lowe, 2005). Elle assure la nutrition et l'oxygénation de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme tout en permettant l'évacuation des déchets produits lors de leur métabolisme tels que le dioxyde de carbone (Melissopoulos and Levacher, 1998). De même, la vascularisation est reliée au maintien d'une bonne température, de l'équilibre hydrique et de la pression

artérielle. Au niveau du derme on retrouve également les vaisseaux lymphatiques qui permettent le recrutement de cellules immunitaires. La présence de nerfs cutanés, formés d'axones entourés de cellules de Schwann, contribue à décoder les informations provenant du monde extérieur notamment la température, les vibrations, le toucher, la pression et la douleur, et de les envoyer au système nerveux central (Melissopoulos and Levacher, 1998).

#### 1.1.4 L'hypoderme

L'hypoderme est la couche interne de la peau qui est essentiellement constituée de tissus adipeux et conjonctifs. Ceux-ci permettent la liaison de la peau aux muscles ainsi que l'absorption des chocs (Melissopoulos and Levacher, 1998). Les adipocytes, les cellules principales qui composent l'hypoderme, renferment les graisses et sont considérées comme un bon isolant permettant la conservation de la température corporelle (Kierszenbaum, 2006). De plus, les graisses présentes au niveau de l'hypoderme servent aussi de source d'énergie au métabolisme du corps lorsque les sucres emmagasinés ne sont plus suffisants aux dépenses énergétiques. L'hypoderme est également considéré comme un organe endocrinien, de par sa capacité à sécréter de la leptine et de l'adiponectine, contribuant à la plasticité du tissu cutané et à la thermorégulation (Melissopoulos and Levacher, 1998). L'hypoderme contient les corpuscules tactiles de Vater Pacini.

#### 1.1.5 Les annexes cutanés

En dehors des trois couches principales, la peau renferme plusieurs annexes cutanées qui sont représentés par les poils, les glandes sudoripares, les ongles et les glandes sébacées. Les poils sont constitués de cellules kératinisées fusionnées et mortes dont leur implantation s'effectue au niveau du derme. Le type de kératine présente au niveau du poil est plus solide et contient plus de cystéine (7,6 vs. 2,9 %) que celui synthétisé par les kératinocytes, mais les cellules ne se desquament pas (Marshall *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1993). Chaque poil est composé de deux sections: le follicule pileux et la tige du poil. Le follicule pileux est la source des poils. Chaque follicule est entouré de terminaisons nerveuses sensibles, agissant comme un récepteur du toucher léger (Araujo *et al.*, 2011).

Les glandes sudoripares, quant à elles, se retrouvent également au niveau du derme. On identifie deux types de glandes sudoripares: les glandes eccrines et les glandes apocrines. Les premières sont situées sur tout le corps étant responsables de la sécrétion sudorale dans le but d'éliminer les toxines et d'expulser la chaleur vers l'extérieur, aidant au maintien de la température corporelle (Melissopoulos and Levacher, 1998). Les deuxièmes, principalement localisées dans le derme profond de certaines zones du corps (les yeux, oreilles, aisselles, autour de l'aréole du sein, du nombril et dans les régions génitales) sécrètent une sueur visqueuse, riche en substances organiques (Melissopoulos and Levacher, 1998).

Les ongles constituent une modification écailleuse de l'épiderme et se retrouvent au niveau de la face dorsale du bout du doigt ou de l'orteil. Elles sont composées de 3 parties principales: les formations sus-unguéales, les formations sous-unguéales et le manteau (Cashman and Sloan, 2010). Plusieurs rôles ont été associés aux ongles, soit la protection contre les agressions extérieures, la préhension permettant la saisie des objets de volume réduit et la sensibilité reliée à l'innervation et la vascularisation du lit de l'ongle (Cashman and Sloan, 2010).

Les glandes sébacées se retrouvent sur tout le corps sauf sur la paume des mains et la plante des pieds. Elles sécrètent une substance huileuse appelée sébum, servant à lubrifier les poils et à empêcher le dessèchement de la surface cutanée. Le sébum joue également un rôle important en tant qu'agent bactéricide (Melissopoulos and Levacher, 1998).

#### 1.1.6 Différenciation épidermique normale

Le rôle protecteur de la peau est fondamentalement assuré par la couche cornée, dont l'organisation résulte de transformations biochimiques, métaboliques et morphologiques reliées à l'évolution des kératinocytes depuis la couche basale. De ce fait, de nombreuses modifications sont impliquées dans le programme de différenciation des kératinocytes jusqu'à leur arrivée à la couche cornée en incluant la synthèse de protéines, les changements dans la forme des cellules ainsi que la mort cellulaire programmée aboutissant à la transformation des kératinocytes en cornéocytes (Lippens *et al.*, 2000). D'autres

modifications correspondent à l'arrangement des espaces intercornéocytaires, assuré en partie par un ciment lipidique adapté à l'établissement d'une barrière hydrophobe efficace.

#### 1.1.6.1 Les kératines

Les kératines (K) sont considérées comme étant le principal marqueur de la différenciation des cellules épithéliales (Arin and Mueller, 2007). Elles représentent une vaste famille multigénique de filaments intermédiaires de structure  $\alpha$ -hélicoïdale représentée par 20 polypeptides de poids moléculaires et de points isoélectriques différents, appelés K1 à K20. Elles jouent un rôle important, celui de permettre la formation de structures rigides et insolubles conférant aux cellules épidermiques une résistance aux chocs mécaniques (Owens and Lane, 2003). Les kératines se divisent en deux groupes : soit le type I ou kératines acides qui possèdent un poids moléculaire entre 40,0 et 56,6 kDa et le type 2 regroupant les kératines ayant un point isoélectrique neutre ou basique et un poids moléculaire entre 52,0 et 67,0 kDa (Kanitakis, 2002). Une kératine de chaque type est nécessaire pour qu'il y ait formation de filaments de kératine (type 1-type 2). Ces hétérodimères sont polymérisés pour former des filaments intermédiaires.

La kératinisation épidermique implique divers programmes de synthèses complémentaires, protéiques et lipidiques associés à d'importants changements morphologiques aboutissant d'une part à la cornification, reliée à la fonction barrière de la peau, et d'autre part à la desquamation (Lippens *et al.*, 2000). L'expression des kératines varie en fonction du degré de maturation des kératinocytes dans les différentes couches formant l'épiderme. Ainsi, dans la membrane basale, les kératinocytes expriment les kératines 5 et 14 (Arin and Mueller, 2007). Suite à l'initiation du programme de différenciation dans la couche granuleuse, la production des kératines 5 et 14 est ralentie et les kératines 1 et 10 apparaissent (Ishida-Yamamoto *et al.*, 1998). En cas d'hyperprolifération, les kératines 6, 16 et 17 sont exprimées (van Rossum *et al.*, 2000). Quant à la kératine 9, elle n'est exprimée que dans les cellules suprabasales de la plante du pied tandis que la kératine 2 se retrouve au niveau des cellules supérieures de la couche épineuse et granuleuse (Corden and McLean, 1996).

Parmi les protéines associées aux kératines, la filaggrine est capable d'assembler les filaments de kératines d'où son nom (*filament aggregating protein*) et elle assure aussi des fonctions au niveau de la maturation de la couche cornée (Blumenberg and Tomic-Canic, 1997). De ce fait, les unités de filaggrine vont permettre la formation de la matrice fibreuse intracornéocytaire (Alibardi, 2001). La matrice fibreuse obtenue est riche en cystine et possède de nombreux ponts disulfures qui assurent l'insolubilité et la résistance des kératines.

#### 1.1.6.2 Les desmosomes

La cohésion interkératinocytaire est mécaniquement assurée par des jonctions solides appelées desmosomes qui correspondent aux ponts intercellulaires particulièrement visibles dans les couches suprabasales de l'épiderme (Hino *et al.*, 1982). Ces constituants des kératinocytes sont des structures symétriques constituées de deux parties cytoplasmiques ou plaques desmosomales qui sont des structures denses, formées sur les feuillettes internes des membranes plasmiques des cellules en contact (Garrod, 2010). Les desmosomes réunissent les cytosquelettes des kératinocytes en une suprastructure tissulaire, conférant à l'épiderme ses propriétés biomécaniques exceptionnelles. Les desmosomes sont très peu fréquents au niveau de la couche basale. C'est plutôt dans les couches épineuse et granuleuse qu'ils sont présents se transformant en cornéodesmosomes lorsqu'ils atteignent la couche cornée.

#### 1.1.6.3 Les corps lamellaires et les grains de kératohyaline

Les corps lamellaires apparaissent dans les kératinocytes supérieurs de la couche épineuse et dans la couche granuleuse et servent de réservoirs aux lipides précurseurs (acylcéramides, acylglucocéramides, phospholipides, stérols et sulfate de cholestérol) qui sont importants pour la formation des lipides intercellulaires de la couche cornée (Contard *et al.*, 1993). En général, on les reconnaît comme de petits organites ovalaires, entourés d'une membrane et présentant un aspect lamellaire (d'où leur nom). Les corps lamellaires sont aussi connus sous le terme de kératinosomes ou de corps d'Odland (Wolff and Holubar, 1967).



Les granules de kératohyaline sont retrouvés au niveau des couches épineuse et granuleuse. Ils sont fondamentalement composés de profilaggrine, une protéine de grande taille hautement phosphorylée constituée d'environ 10 à 12 sous-unités de filaggrine (Melissopoulos and Levacher, 1998). De plus, ils contiennent de la loricrine, de la cystatine A et des kératines 1 et 10. Lors de la transition des kératinocytes de la couche granuleuse vers la couche cornée, la profilaggrine est clivée en des unités de filaggrine (Chatterjea *et al.*, 2011).

### 1.1.6.3 La cornification

La cornification correspond aux dernières étapes de la différenciation épidermique, qui se caractérise par un processus de mort cellulaire programmée aboutissant à la desquamation, à laquelle participent de nombreuses enzymes (Landmann, 1988). De nombreuses protéines associées à la membrane des kératinocytes ou stockées dans les grains de kératohyaline, participent à l'élaboration de l'enveloppe cornée, qui est responsable de l'imperméabilité et de la rigidité des cornéocytes ainsi que de la grande résistance mécanique de la couche cornée (Candi *et al.*, 2005). L'involucrine (68 kDa), riche en glutamine et lysine, est exprimée dans la partie supérieure de la couche épineuse et dans la couche granuleuse. Précisément, sa structure hautement répétitive aussi bien que la grande quantité de glutamine de même que sa distribution homogène le long de sa séquence, font de cette protéine un élément très important pour la formation des liens protéiques de l'enveloppe cornée (Eckert *et al.*, 1993). La loricrine (26 kDa), le précurseur majeur de l'enveloppe des cornéocytes, est une autre protéine hautement insoluble qui sert de substrat pour la transglutaminase lors de la formation de l'enveloppe cornée dont elle est la constituante principale (Kalinin *et al.*, 2002). Elle est également exprimée dans les granules de kératohyaline de la couche granuleuse (Ishida-Yamamoto *et al.*, 1996). Les transglutaminases quant à elles, représentent une famille d'enzymes dépendantes du calcium qui catalysent la formation de liens isopeptidiques entre les protéines de l'enveloppe cornée. Dans les tissus épidermiques on retrouve les transglutaminases 1, 2, 3 et 5 (Eckert *et al.*, 2005).

## 1.2 Le psoriasis

### 1.2.1 Les types de psoriasis

Le terme «psoriasis» est utilisé pour définir un ensemble de dermatoses chroniques inflammatoires, dont le psoriasis en plaques (*psoriasis vulgaris*) est la forme la plus commune (Figure 3). En fait, il s'agit d'un certain nombre de manifestations cliniques différentes d'un point de vue morphologique qui peuvent se manifester séparément, simultanément ou successivement (dermatologie, 2009). Bien que la littérature scientifique présente plusieurs classifications du psoriasis, c'est la classification phénotypique simplifiée adoptée par l'*International Psoriasis Council* (Griffiths *et al.*, 2007) qui sera utilisée en guise de référence dans ce présent ouvrage.

#### 1.2.1.1 Psoriasis en plaques

Le psoriasis en plaques se caractérise par la présence de plaques rouges érythémateuses qui, dans plusieurs cas, se présentent recouvertes de squames argentées. En fait, il s'agit de la forme la plus courante de la maladie (90 %) (Griffiths *et al.*, 2007). De ce fait, cette forme de psoriasis fait l'objet de la plupart des recherches fondamentales et des essais cliniques existants. Les lésions (plaques) rouges squameuses présentent une forme arrondie ou ovale, d'au moins 0,5 cm de diamètre. Ces plaques sont souvent douloureuses ou à l'origine de démangeaisons; selon leur étendue et leur localisation, elles peuvent avoir des conséquences négatives sur le plan physique et psychologique des patients. Généralement, elles se localisent dans certaines régions comme les genoux, les coudes ou peuvent s'étendre sur de grandes surfaces corporelles. Fréquemment, les plaques sont très bien délimitées par la peau non lésionnelle, qui a un aspect normal.

Dans certains cas, la plaque s'étend progressivement vers l'extérieur alors que la partie centrale tend à guérir, ce qui lui confère l'aspect d'un anneau (Goodfield *et al.*, 1994). Le psoriasis en plaques a été sous-divisé en fonction des sièges anatomiques atteints et des variations phénotypiques en: psoriasis inversé, psoriasis du cuir chevelu, psoriasis unguéal, sébo-psoriasis et psoriasis palmo-plantaire (Griffiths *et al.*, 2007).



Figure 3 Les aspects cliniques du psoriasis. Tirée de (Schon and Boehncke, 2005).

(A) en plaques; (B) en gouttes; (C) érythrodermique; (D) du cuir chevelu; (E) inversé; (F) pustuleux; (G) pustuleux généralisé; (H) atteinte aux ongles (onychodystrophie); (I) arthrite psoriasique; (J) unguéal (K) reproduction artistique en cire du psoriasis unguéal.

#### *1.2.1.1.1 Psoriasis inversé*

Également connu sous le nom de psoriasis intertrigineux, il est caractérisé par la présence de plaques minces, peu squameuses et bien définies qui affectent exclusivement les plis cutanés (région inframammaire, aine, creux axillaire, zone génitale et sillon interfessier) (Griffiths *et al.*, 2007). L'atteinte des plis peut avoir lieu en absence du psoriasis en plaques touchant d'autres sites ou bien coexister avec un psoriasis en plaques chronique. Ce type de psoriasis peut être sujet à l'irritation causée par les frottements et la transpiration en raison de son emplacement dans les plis de la peau et les zones sensibles (dermatologie, 2009). Il peut causer davantage de problèmes chez les personnes qui ont un excès de poids et celles qui ont des plis de la peau profonds.

#### *1.2.1.1.2 Psoriasis du cuir chevelu*

En général, on considère que le cuir chevelu est la région la plus fréquemment touchée par le psoriasis en plaques. En fait, il s'agit souvent de la première zone affectée par la maladie (Griffiths *et al.*, 2007). Fait intéressant, l'atteinte du cuir chevelu dépasse rarement la lisière des cheveux au-delà de 2 cm. Au plan clinique, les lésions du cuir chevelu se caractérisent par la présence de plaques érythémato-squameuses nettement délimitées, couvertes d'épaisses squames argentées. Elles sont généralement localisées autour des oreilles et dans la région occipitale (Griffiths *et al.*, 2007).

#### *1.2.1.1.3 Psoriasis unguéal*

Le psoriasis des ongles peut se présenter chez les patients atteints de psoriasis en plaques, mais il peut aussi apparaître comme une forme isolée et survenir en absence de plaques cutanées. Chacune des structures qui composent la tablette unguéale peuvent être affectées par le psoriasis à différents stades de la maladie. Toutefois, les études cliniques portent en majorité sur le psoriasis de la matrice unguéale et le psoriasis du lit unguéal (Salomon *et al.*, 2003). Ce type de psoriasis peut s'accompagner d'un épaissement, d'une dépression, d'une décoloration et d'un effritement de l'ongle, ainsi que d'un décollement de la tablette au niveau du lit unguéal (Rich and Scher, 2003). Le psoriasis unguéal est considéré comme une des formes de psoriasis les plus difficiles à traiter en raison de la difficulté d'administration des médicaments autour et sous la tablette unguéale.

#### 1.2.1.1.4 Sébo-psoriasis

Le sébo-psoriasis est un type de psoriasis en plaques qui se caractérise par sa ressemblance avec la dermatite séborrhéique en ce qui concerne sa localisation (visage, en particulier sur les sillons naso-labiaux) et sa morphologie (lésions rouges, minces et bien délimitées d'aspect gras) (Griffiths *et al.*, 2007).

#### 1.2.1.1.5 Psoriasis palmo-plantaire

Le psoriasis palmo-plantaire (Figure 4) touche la paume des mains et la plante des pieds et affecte 17 % des patients psoriasiques (Kumar *et al.*, 2002). Il peut se présenter sous deux formes, souvent observées chez le même individu. La première se manifeste comme un psoriasis en plaques localisé, semblable au *psoriasis vulgaris* présent sur le reste du corps. Les lésions sont nettement délimitées, érythémateuses et couvertes d'une épaisse couche de squames. La deuxième forme est connue sous le nom de psoriasis pustuleux palmo-plantaire, caractérisée par la présence des plaques érythémateuses parsemées de pustules intra-épidermiques, souvent récalcitrant aux traitements (dermatologie, 2009). Le psoriasis pustuleux palmo-plantaire a été considéré comme une affection génétique distincte, qui peut survenir indépendamment ou en comorbidité avec le psoriasis en plaques (Griffiths and Barker, 2007).



Figure 4 Psoriasis palmo-plantaire. Tirée de Griffiths *et al.*, 2007

### 1.2.1.2 Autres formes de psoriasis

#### *1.2.1.2.1 Érythrodermie*

Le psoriasis érythrodermique se manifeste par l'éruption cutanée aiguë ou subaiguë des lésions psoriasiques inflammatoires diffuses et rouges qui s'étendent souvent à 90 % ou plus de la surface corporelle et qui s'accompagnent d'une desquamation peu intense (dermatologie, 2009). En général le psoriasis érythrodermique est considéré comme étant une forme sévère et peu répandue de la maladie. Ainsi, ce type de psoriasis peut provoquer chez les patients des troubles divers de la régulation thermique, des troubles cardiovasculaires, des poussées de chaleur de la peau ainsi que des accès de fièvre, ce qui handicape largement leur qualité de vie. De plus, ces patients démontrent d'importants risques de déshydratation pouvant nécessiter une hospitalisation. Bien qu'il puisse apparaître spontanément, ce type de psoriasis est le plus souvent associé à un psoriasis actif de longue date (Roenigk and Maibach, 1985).

#### *1.2.1.2.2 Psoriasis en gouttes*

Le psoriasis en gouttes se manifeste sous la forme d'une éruption aiguë de petites papules sur le tronc, les membres ou le visage (Roenigk and Maibach, 1985). Les zones de frottement sont souvent atteintes : bas ventre, bas du dos, avant-bras, tour de poitrine. Dans environ les deux-tiers des cas, les poussées de psoriasis en gouttes sont déclenchées par une infection streptococcique (dermatologie, 2009).

#### *1.2.1.2.3 Psoriasis pustuleux*

Le psoriasis pustuleux généralisé se caractérise par la formation de pustules monomorphes sur une peau érythrodermique ou en bordure des plaques inflammatoires en expansion. Il peut survenir sur un psoriasis en plaques établi ou se déclarer spontanément. Il résulte de l'exagération du phénomène d'exocytose de polynucléaires qui caractérise le psoriasis; cliniquement, il se présente sous la forme de pustules plates, blanches-jaunâtres (amicrobiennes) avec une tendance à la coalescence (dermatologie, 2009).

### 1.2.2 Niveaux de gravité

En clinique, la détermination de la gravité du *psoriasis vulgaris* comprend une évaluation objective de l'étendue et des symptômes aussi bien qu'une évaluation subjective des répercussions de la maladie au niveau de la qualité de vie des patients. Parmi les mesures objectives normalisées existantes, on trouve des mesures de la surface corporelle atteinte (BSA) et l'indice de surface et de gravité du psoriasis, connu sous le nom de PASI, tandis que l'indice de qualité de vie en dermatologie (DLQI) et l'échelle SF-36 sont utilisés pour évaluer la qualité de vie des patients (Tableau 1).

Tableau 1 Outils d'évaluation de la gravité du *psoriasis vulgaris*. Tiré des Lignes Directrices Canadiennes pour la Prise en Charge du Psoriasis en Plaques (première édition, juin 2009).

<b>Mesure</b>	<b>Description</b>
<i>Mesures des symptômes et de l'atteinte cutanée</i>	
BSA (Surface corporelle atteinte)	Pourcentage de la surface corporelle atteinte par le psoriasis. Cette estimation est obtenue à partir de la paume du sujet (main posée à plat avec tous les doigts serrés, pouce inclus) représentant 1% de la surface corporelle totale
PASI (Indice de surface et de gravité du psoriasis)	<p>Indice de la gravité (épaisseur, rougeur, desquamation) et étendue de la maladie sur le corps. L'échelle de l'indice va de 0 à 72 (0 = absence de maladie, 72 = atteinte maximale). L'indice PASI combine l'évaluation de quatre parties du corps : la tête et le cou (H), les membres supérieurs (U), le tronc (T) et les membres inférieurs (L). On attribue à chaque partie atteinte une valeur numérique (A) de 1 à 6 correspondant à la proportion de peau atteinte par le psoriasis:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 : 0 à 9%</li> <li>• 2 : 10 à 29%</li> <li>• 3 : 30 à 49%</li> <li>• 4 : 50 à 69%</li> <li>• 5 : 70 à 89%</li> <li>• 6 : 90 à 100%.</li> </ul> <p>Dans chaque partie, la gravité des trois signes de la maladie - érythème (E), épaisseur/induration (I), et desquamation (S) - est évaluée sur une échelle en cinq points:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 : aucune</li> <li>• 1 : faible</li> <li>• 2 : modérée</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 : grave</li> <li>• 4 : très grave.</li> </ul> <p>Pour chacune des quatre parties du corps, les cotes des trois signes sont additionnées puis multipliées par la valeur numérique correspondant à la proportion de peau atteinte. Les résultats obtenus sont ensuite multipliés par les coefficients suivants qui représentent la part de chaque partie du corps dans la surface corporelle totale :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• cou et tête: 0.1</li> <li>• membres supérieurs: 0.2</li> <li>• tronc: 0.3</li> <li>• membres inférieurs: 0.4.</li> </ul> <p>Finalement, les cotes des quatre parties du corps sont additionnées pour donner l'indice PASI global</p>
Évolution du PASI	L'évolution de la gravité est indiquée en termes d'évolution de variation du pourcentage par rapport à l'état initial. Ainsi, un indice PASI-75 correspond à une diminution de 75% (amélioration) de la gravité sur l'échelle PASI; un indice PASI-125 correspond à une augmentation (aggravation) de la gravité supérieure de 25% par rapport à l'état initial
Évaluation globale du médecin (PGA statique)	Évaluation de la gravité de la maladie disparition totale, disparition quasi-totale, légère, modérée, grave, très grave) à un moment précis
PGA dynamique (PGA de l'évolution de la maladie)	Évaluation de la réponse au traitement (aggravation, pas de changement, légère amélioration, amélioration moyenne, amélioration satisfaisante, excellente amélioration, disparition totale). Cette méthode d'évaluation est limitée par le fait de devoir se rappeler ou avoir inscrit le degré de gravité observé avant le traitement
<b>Mesures de qualité de vie</b>	
DLQI (Indice de qualité de vie en dermatologie)	Questionnaire destiné aux patients afin d'évaluer les démangeaisons, la douleur, le sentiment de gêne/embarras, les problèmes liés au traitement et les répercussions de la maladie cutanée sur les activités quotidiennes, les relations personnelles et l'activité sexuelle du patient. Échelle de 0 (aucune répercussion) à 30 (répercussions maximales)
Échelle SF-36	Outil de qualité de vie générale (pas spécifique à la dermatologie) comportant plusieurs dimensions: fonctionnement physique, limitations dues à l'état physique, douleurs physiques, perceptions de la santé générale, vitalité, fonctionnement social, retentissement



Jusqu'à maintenant, il n'existe pas un consensus sur les critères de définition de la gravité du psoriasis ni sur l'évaluation de la réussite thérapeutique (Tableau 2). La plupart des définitions couramment utilisées ont été déterminées aux fins d'usage dans les essais cliniques et dans plusieurs cas elles sont mal adaptées à la pratique clinique (Gottlieb, 2005). De ce fait, il y a des auteurs qui considèrent une maladie « grave » comme celle qui remplit un de ces critères : PASI  $\geq$  10, DLQI  $\geq$  10 ou BSA  $\geq$  10%, tandis que d'autres établissent un seul critère du BSA  $\geq$  20% (Asawanonda and Nateetongrungsak, 2006; Finlay, 2005; Tanew *et al.*, 1991). Ainsi, il a été suggéré qu'il est impératif de définir de nouvelles normes axées sur les patients afin de pouvoir évaluer le fardeau de la maladie et la réussite thérapeutique (Krueger *et al.*, 2001).

Tableau 2 Termes utilisés lors des essais cliniques pour évaluer la gravité du psoriasis vulgaris et la réussite thérapeutique. Tiré des Lignes Directrices Canadiennes pour la Prise en Charge du Psoriasis en Plaques (première édition, juin 2009).

Terme	Définitions utilisées dans les essais cliniques	Définition pour la pratique clinique
<b>Mesures de la gravité de la maladie</b>		
Psoriasis en plaques léger	Pas de valeur communément admise; La <i>National Psoriasis Foundation</i> des États-Unis propose BSA = 5 % comme limite supérieure pour une forme légère de la maladie	Maladie ayant des répercussions minimales sur la qualité de vie du patient; maîtrise acceptable des symptômes par des soins de la peau et/ou un traitement topique réguliers
Psoriasis en plaques modéré	La limite inférieure du psoriasis d'intensité modérée à grave peut être établie à PASI = 8. Plusieurs essais d'agents biologiques ont utilisé des critères plus rigoureux (PASI $\geq$ 12 et BSA $\geq$ 10%) pour définir la limite inférieure du psoriasis	Maladie qui ne peut pas être maîtrisée de façon acceptable, ou qui a peu de chances de l'être par des soins de la peau réguliers et/ou maladie qui altère sérieusement la qualité de vie du patient, que ce soit en raison de son étendue, de

	de «modéré à grave» bien que les mêmes limites aient également été utilisées pour définir le psoriasis «grave»	l'inconfort physique qu'elle occasionne (douleur ou prurit) ou de la région du corps affectée, (visage, mains, pieds ou organes génitaux)
Psoriasis en plaques grave	Règle de dix : PASI $\geq$ 10 ou DLQI $\geq$ 10 ou BSA $\geq$ 10%. Dans certains essais de photothérapie, une BSA $\geq$ 20% représente la limite inférieure de la maladie grave	Maladie qui ne peut pas être maîtrisée de façon satisfaisante, ou qui a peu de chances de l'être par un traitement topique et qui entraîne une altération importante de la qualité de vie du patient
<b>Mesures de la réussite thérapeutique</b>		
Disparition totale	Absence des signes de la maladie	
Maîtrise	Réponse satisfaisante au traitement, telle qu'elle a été définie par le patient et/ou le médecin; n'implique pas nécessairement une disparition totale	
Rémission	Maîtrise de la maladie pendant une longue période, qui est parfois définie dans la pratique par le laps de temps écoulé entre deux traitements prévus	Suppression des signes et symptômes du psoriasis (ne nécessitant pas une disparition complète) qui perdure pendant une période donnée malgré l'absence de traitements plus poussés que les soins de la peau réguliers
<b>Mesures de l'échec thérapeutique</b>		
Exacerbation	Toute aggravation des symptômes du psoriasis	
Poussée	Exacerbation survenant lorsque le patient est sous traitement, et au cours de laquelle l'aggravation de la maladie est différente de la maladie précédente, soit par sa morphologie (p. ex. poussée érythrodermique ou pustuleuse chez un patient atteint de psoriasis en plaques), soit par l'étendue ou la gravité des lésions	
Rebond	Exacerbation (généralement définie par un PASI-125 ou un accroissement de la gravité ou une modification de la morphologie du psoriasis) associée à l'abandon du traitement. Pour qu'un rebond soit considéré comme étant lié à l'abandon du traitement, il doit survenir au cours des trois mois suivant l'abandon du traitement	

Rechute

Perte de maîtrise de la maladie qui était jusqu'alors maîtrisée de manière satisfaisante; la rechute est généralement définie comme une perte de 50% des gains obtenus par le traitement. Par exemple, un patient ayant un PASI-20 à l'état initial et qui a atteint un PASI-10 grâce au traitement est considéré en rechute avec un PASI-15

### 1.2.3 Épidémiologie

En moyenne, le psoriasis touche 2 à 3 % de la population mondiale (Christophers, 2001), et il est généralement moins fréquent dans les régions équatoriales comparativement aux régions nordiques (Krueger and Bowcock, 2005; Raychaudhuri and Farber, 2001). La prévalence du psoriasis est très variable, ce qui pourrait s'expliquer par l'existence de différences génétiques, démographiques et environnementales entre les différentes populations étudiées. Des études menées auprès de différentes populations au niveau mondial ont démontré que le psoriasis touche 6,5% de la population en Allemagne; 5,5% en Irlande, 4,8% en Écosse, 3,7% en Espagne, 2,3% en Suède, 4,8% en Norvège, 2,2-4,6% aux États-Unis, 0,5-1,5% en Inde, 4,0-5,5% en Malaisie, 0,29-1,18 au Japon, 0,2-1,5% en Chine, 0,7% en Guatemala, 0,7% en Honduras, 0,2-0,9 % en Nicaragua, 1,3% au Brésil, 3% au Mexique, 2% au Venezuela, 4,2% au Paraguay, 0,08-0,4% en Nigeria, 0,05% au Mali et 0,3% en Angola (Failmezger, 1978; Farber and Nall, 1994; Raychaudhuri and Farber, 2001). Il semblerait que l'origine ethnique ait un rôle à jouer sur la prévalence du psoriasis. Ainsi, il a été reporté que cette pathologie affecte 0,45 à 0,70% des afro-américains alors que dans le reste de la population des États-Unis la prévalence est de 1,40 à 4,60% (Schon *et al.*, 2005). Le tableau 3 montre la prévalence estimée au Canada. Ainsi, on considère que 500 000 Canadiens souffrent du psoriasis (1,7% de la population) parmi lesquels 40 000 personnes sont des aînés ( $\geq 70$  ans) et 20 000 sont des enfants ( $\leq 10$  ans) (dermatologie, 2009).

Tableau 3 Prévalence estimée du psoriasis au Canada. Tiré de des Lignes Directrices Canadiennes pour la Prise en Charge du Psoriasis en Plaques (première édition, juin 2009).

Groupe d'âge	Population canadienne (Données du recensement canadien de 2006)	Prévalence estimée du psoriasis par groupe d'âge (sur 10 000)	Nombre estimé de Canadiens atteints de psoriasis par groupe d'âge
0 à 9	3 499 915	55,02	19 257

10 à 19	4 220 415	137,37	57 976
20 à 29	4 065 965	151,04	61 412
30 à 39	4 228 500	178,01	75 272
40 à 49	5 231 055	203,43	106 415
50 à 59	4 441 920	222,78	98 957
60 à 69	2 824 445	225,95	63 818
70 à 79	1 933 360	161,39	31 202
80 à 89	989 390	88,44	8 750
90 et plus	177 925	47,33	842
<b>Total</b>	<b>31 612 895</b>		<b>523 902</b>

#### 1.2.4 Facteurs génétiques

On considère le psoriasis comme une maladie à caractère héréditaire qui ne correspond pas au modèle mendélien monogénique. En effet, l'expression de plus de 1300 gènes est altérée dans les lésions psoriasiques (Zhou *et al.*, 2003). L'héritabilité dans le psoriasis (60-90%) est considérablement élevée comparativement à d'autres maladies à caractère génétique multifactoriel telles l'hypertension artérielle (Elder *et al.*, 2001). Ainsi, un taux de concordance d'environ 70% est visible chez les jumeaux homozygotes, alors qu'il n'est que d'environ 20% chez les jumeaux dizygotes (Bowcock, 2005).

Plusieurs locus ont été déjà identifiés et sont soupçonnés d'abriter des gènes pouvant interagir avec les facteurs environnementaux pour accroître le risque d'apparition du psoriasis. Des locus comme le *PSORS1* ont été identifiés dans plusieurs études en utilisant des populations différentes (Liu *et al.*, 2007). En fait, le gène codant pour la protéine HLA-C (*human leukocyte antigen C*) du complexe majeur d'histocompatibilité (correspondant au locus *PSORS1*) a été corrélé au risque de développer le psoriasis (Elder, 2006; Nair *et al.*, 2006). De même, l'IL-15 représente le gène du psoriasis dans le locus *PSORS 9* (Zhang *et al.*, 2007). De plus, des variations de la séquence génétique affectant l'expression du gène codant pour le facteur de nécrose tumorale (TNF) semblent être impliquées dans le

psoriasis en plaques et l'arthrite psoriasique (Gallo *et al.*, 2011; Mossner *et al.*, 2005). Également, des mutations dans les sous-unités de l'IL-23 et du récepteur de l'IL-23 ont été associées au psoriasis. Enfin, l'analyse génétique a permis de établir des associations entre les dérèglements des gènes reliés à la voie NF- $\kappa$ B et le psoriasis (Nair *et al.*, 2009) (Tableau 4).

Bien que les nouveaux traitements biologiques témoignent d'une meilleure compréhension de cette maladie au niveau moléculaire, l'analyse génétique n'a pas encore permis de proposer des nouvelles alternatives thérapeutiques. Ainsi, indépendamment du génotype du patient, la prise de décision pour les traitements continue à être empirique (Capon *et al.*, 2012).

Tableau 4 Genès associés au psoriasis. Tiré de Capon *et al.*, 2012

Gene <sup>2</sup> (location)	Protein function	Pathway
<i>IL23R</i> (1p31)	IL-23 receptor subunit	IL-23 signaling
<i>IL28RA</i> (1p36)	IL-29 receptor subunit	IFN signaling
<i>LCE3B/3C/3D</i> (1q21)	Keratinocyte structural protein	Skin barrier function
<i>REL</i> (2p16)	NF- $\kappa$ B subunit	NF- $\kappa$ B signaling
<i>IFIH1/MDA5</i> (2q24)	Innate antiviral receptor	IFN signaling
<i>ERAP1</i> (5q15)	Amino peptidase processing MHC class I ligands	Antigen presentation
<i>IL4, IL13</i> (5q31)	Th2 cytokines	IL-4/IL-13 signaling
<i>IL12B</i> (5q33)	Subunit shared by the IL-12 and IL-23 cytokines	IL-23 signaling
<i>TNIP1</i> (5q33)	Inhibitor of TNF-induced NF- $\kappa$ B activation	NF- $\kappa$ B signaling
<i>PTTG1</i> (5q33)	Anaphase-promoting complex substrate	Cell cycle control/DNA repair
<i>HLA-C</i> (6p21)	MHC class I antigen	Antigen presentation
<i>TRAF3IP2</i> (6q21)	Adaptor mediating IL-17-induced NF- $\kappa$ B activation	IL-17/NF- $\kappa$ B signaling
<i>TNFAIP3</i> (6q23)	Inhibitor of TNF-induced NF- $\kappa$ B activation	NF- $\kappa$ B signaling
<i>CSMD1</i> (8p23)	Tumor-suppressor gene	Unknown
<i>IL23A</i> (12q13)	IL-23 subunit	IL-23 signaling
<i>GJB2</i> (13q11)	Gap junction protein	Electrolyte transport
<i>NFKBIA</i> (14q13)	Inhibitor of NF- $\kappa$ B activation	NF- $\kappa$ B signaling
<i>FBXL19</i> (16p11)	Putative inhibitor of NF- $\kappa$ B activation	NF- $\kappa$ B signaling
<i>NOS2</i> (17q11)	Induced nitric oxide synthase	Innate antibacterial response
<i>SERPINB8</i> (18q21)	Serine protease inhibitor	Unknown
<i>TYK2</i> (19p13)	Tyrosine kinase associated with cytokine receptors	IL-23 and IFN signaling
<i>ZNF816A</i> (19q13)	Zinc-finger protein	Unknown
<i>ZNF313/RNF114</i> (20q13)	E3 ubiquitin ligase	IFN signaling

### 1.2.5 Facteurs environnementaux

Les causes reliées aux manifestations initiales du psoriasis ou à l'aggravation de ses symptômes sont mal connues. Parmi les facteurs environnementaux soupçonnés de déclencher le psoriasis se trouvent : a) les traumatismes de la peau; b) les chocs psychologiques ou le stress; c) les changements climatiques; d) les infections à streptocoques; et enfin e) l'exposition à certains médicaments. Par contre, le psoriasis a tendance à s'atténuer en été, ce qui semble être relié à une exposition plus importante aux rayons ultraviolets (UV) (Hancox *et al.*, 2004).

Dans certains cas, le psoriasis peut être déclenché par des infections streptococciques, le plus souvent une pharyngite à streptocoques, ou une cellulite périanale à streptocoques (Valdimarsson *et al.*, 2009). En effet, il a été démontré que la protéine M du streptocoque partage une séquence homologue avec les kératines épidermiques humaines. Ainsi, il est donc possible que les lymphocytes T activés par un antigène venant du streptocoque reconnaissent également les kératines de la peau tout en déclenchant une réaction immunologique (Johnston *et al.*, 2004; Valdimarsson *et al.*, 2009).

Dans une étude récente effectuée aux États-Unis incluant 185 836 participants, il a été démontré que le tabagisme constitue un facteur de risque du psoriasis autant chez les hommes que chez les femmes (Li *et al.*, 2012). Les chocs psychologiques et le stress semblent aussi être reliés aux premiers épisodes du psoriasis. Ainsi, l'apparition du psoriasis a été aussi documentée chez des personnes engagées pendant des guerres et soumises à un stress psychologique continu (Sarilar *et al.*, 2011).

Des médicaments tels que les  $\beta$ -bloquants et le lithium sont reconnus pour déclencher le psoriasis (Basavaraj *et al.*, 2010; Milavec-Puretic *et al.*, 2011). Le mécanisme précis concernant l'influence des  $\beta$ -bloquants sur l'apparition du psoriasis n'est pas complètement élucidé. Toutefois, plusieurs hypothèses ont été émises, entre elles celle qui associe le blocage des  $\beta$ -récepteurs épidermiques à une diminution de l'AMPc intra-épidermique et à l'hyper-prolifération des kératinocytes psoriasiques (O'Brien and Koo, 2006). Le lithium quant à lui, semble augmenter la production des cytokines (TGF- $\alpha$ , IL-2 et IL-6) chez les kératinocytes (Ockenfels *et al.*, 1996), diminuer les niveaux d'AMPc à l'intérieur des

lésions psoriasiques (DiGiovanna *et al.*, 1981) et conséquemment augmenter le taux de prolifération des kératinocytes.

### 1.2.6 Histologie

Les critères histologiques les plus importants qui caractérisent le psoriasis comprennent : a) l'hyperkératose (épaississement de la couche cornée) ; b) l'absence de couche granuleuse; c) l'acanthose (hyperplasie épidermique) ; d) l'allongement des papilles dermiques ; e) l'hyperplasie et la dilatation des vaisseaux sanguins; f) la présence d'un infiltrat à prédominance lymphocytaire ; et enfin g) l'exocytose de neutrophiles qui forment des micro-abcès de Munro dans la couche cornée (Figure 5) (Lowe *et al.*, 2007; Yawalkar and Braathem, 2006).

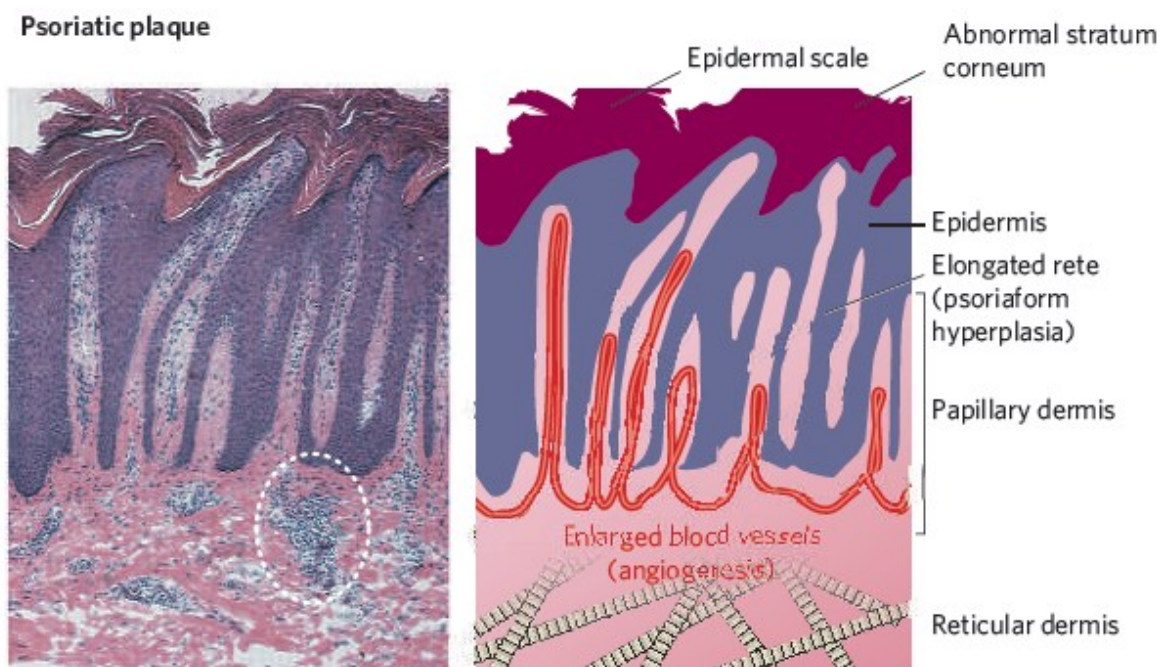


Figure 5 Caractéristiques histologiques du psoriasis. Tirée de Lowe *et al.*, 2007



### 1.2.7 Différenciation cellulaire dans le psoriasis

Une des caractéristiques les plus distinctives du psoriasis, est l'hyperprolifération des kératinocytes. Ainsi, ces cellules se divisent beaucoup plus rapidement que les kératinocytes normaux et atteignent la surface cutanée entre 7 et 10 jours alors que ce processus prend entre 28 et 50 jours dans les peaux normales. Par conséquent, les kératinocytes psoriasiques passent à travers le processus de différenciation beaucoup plus rapidement, d'où leur maturation incomplète (Bowcock and Krueger, 2005).

L'hyperprolifération des kératinocytes mène à un épaississement de l'épiderme. De plus, la couche granuleuse, où le commencement de la différenciation terminale a lieu, est diminuée ou absente au sein de la peau psoriasique (Lowes *et al.*, 2007). La couche cornée quant à elle, est formée de cellules encore indifférenciées où on peut observer la présence du noyau (Bowcock and Krueger, 2005) (Figure 6).

Les kératinocytes psoriasiques suivent donc un programme alternatif de différenciation connu sous le nom de «différenciation régénérative» ou «maturation régénérative» qui désigne un nouveau plan d'adaptation physiologique face aux perturbations de l'homéostasie cutanée (Mansbridge *et al.*, 1984; Pfundt *et al.*, 2000). Ce processus, bien entendu, présente plusieurs différences comparativement à la différenciation épidermique normale. Ainsi, l'expression de certaines kératines est affectée. C'est le cas des kératines 5 et 14 qui sont exprimées de façon beaucoup plus intense dans le psoriasis, tandis que l'expression des kératines 1 et 10 est diminuée au niveau des couches suprabasales des épidermes psoriasiques (Mils *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2002). De plus, on retrouve des kératines associées à l'hyperprolifération qui ne sont pas présentes dans les peaux normales, par exemple les kératines 6, 16 et 17 (Wei *et al.*, 1999). De même, une expression plus précoce des enzymes et de protéines impliquées dans la formation de la couche cornée tels la transglutaminase et l'involucrine a été observée dans le psoriasis. Les peaux psoriasiques démontrent aussi une faible expression de la loricrine et de la filaggrine qui sont normalement exprimées dans la couche granuleuse (Van de Kerkhof *et al.*, 1996).

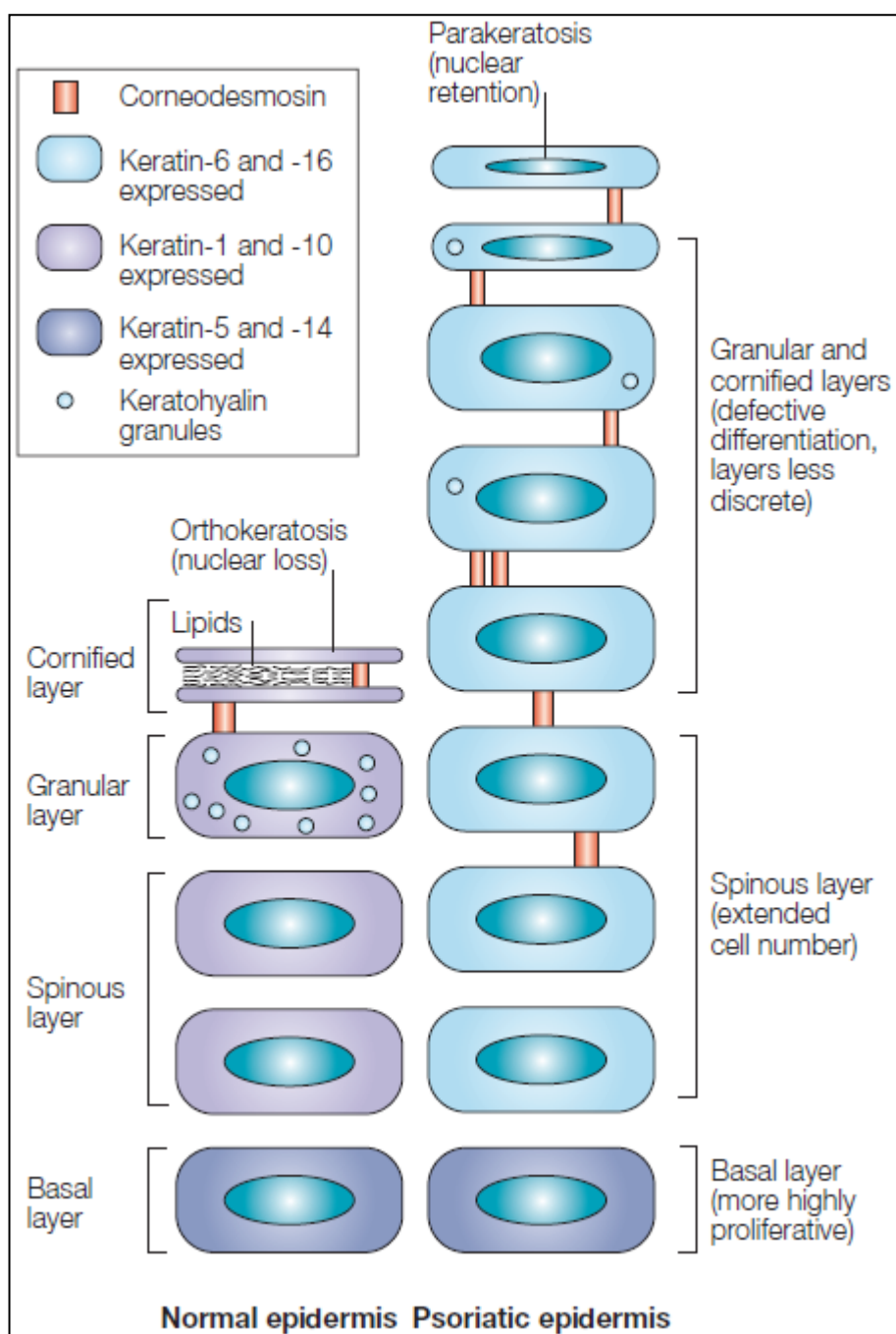


Figure 6 Différenciation des kératinocytes normaux et psoriasiques. Tirée de Bowcock and Krueger, 2005.

Le programme de différenciation retrouvé dans le psoriasis se caractérise aussi par la présence d'autres protéines qui ne sont pas présentes dans l'épiderme normal (Iizuka *et al.*, 2004a). C'est le cas de l'élafine (9.9 kDa), appartenant à la famille des gènes Trappin, considérée comme un marqueur de la différenciation aberrante retrouvée dans le psoriasis (Pol *et al.*, 2002b; Vandermeeren *et al.*, 2001). Cette protéine est connue aussi sous les noms de Trappin-2, SKALP (*skin-derived anti-leukoproteinase*) ou encore ESI (*elastase specific inhibitor*). L'élafine est exprimée de façon constitutive dans divers épithéliums y compris ceux de l'œsophage, le vagin et la cavité buccale. Dans la peau psoriasique elle peut être fortement induite par des cytokines comme le TNF- $\alpha$  (Pfundt *et al.*, 2000).

Plusieurs fonctions lui sont attribuées soit celle d'inhiber l'élastase provenant des leukocytes contribuant ainsi à la protection de la peau contre les lésions tissulaires provoquées par cette enzyme (Alkemade *et al.*, 1994). De plus, elle est présente au niveau de l'enveloppe cornée psoriasique et agit en tant que substrat pour la transglutaminase contribuant à l'excessive cornification retrouvée dans le psoriasis (Nakane *et al.*, 2002). Finalement, il semblerait que cette protéine puisse stimuler la production d'autres cytokines/chimiokines chez les kératinocytes (IL-8, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et amplifier de cette façon l'inflammation (Aung *et al.*, 2011).

#### 1.2.8 Psoriasis et stress oxydant

*Cette section est un rapide survol de l'influence du stress oxydant dans la pathogenèse du psoriasis, une revue plus complète est présentée à l'annexe 2.*

La peau fournit une interface importante entre l'environnement et l'organisme. Ainsi, elle est continuellement exposée à une vaste gamme de produits chimiques et de polluants physiques environnementaux (Atar, 2002). Ces toxiques environnementaux ou leurs métabolites sont des oxydants qui conduisent à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERA). Ces espèces, hautement réactives, peuvent être générées lors du métabolisme cellulaire (oxydation enzymatique et respiration aérobie), de réactions immunologiques et de conditions pathologiques (McCord, 1985). Elles peuvent également être produites par des cytokines, des facteurs de croissance et d'autres stimuli physiologiques (Kohen and Nyska, 2002). Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

sont constituées d'agents prooxydants pouvant être classés en deux groupes. Le premier regroupe les radicaux libres, qui sont par définition des espèces moléculaires ayant des électrons célibataires, par exemple le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) ; l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ; le peroxyde ( $\text{ROO}^\bullet$ ) ; le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ) et le radical alkoxyde ( $\text{RO}^\bullet$ ). Le deuxième groupe est formé par des composés non radicalaires extrêmement réactifs par exemple l'acide hypochloreux ( $\text{HClO}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , les aldéhydes et l'ozone) (Drogue, 2002). L'anion  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le  $\text{NO}^\bullet$  et le  $\text{OH}^\bullet$  à des concentrations faibles, font partie des processus cellulaires tels que la transduction de signaux, la prolifération cellulaire, l'apoptose, les réponses immunitaires et la différenciation cellulaire (Finkel, 2000). La production de ces espèces est donc largement physiologique: elle est déterminée, dirigée et utile. Toutefois, elle peut aussi être potentiellement délétère si prolongée ou incontrôlée, dépassant les capacités de neutralisation de la peau. La perturbation de l'équilibre endogène entre la production de ces espèces et les défenses antioxydantes due soit à une défense défaillante, soit à un état prooxydant accru est connue sous le nom de stress oxydant (Berger, 2006).

Pour faire face aux effets négatifs des agents oxydants, la peau est équipée de tout un système complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, dont le rôle est de maintenir l'équilibre redox intracellulaire. Les enzymes antioxydantes de la peau sont représentées par l'enzyme superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. Parmi les défenses antioxydantes non enzymatiques on retrouve les antioxydants de faible masse moléculaire tels que le glutathion réduit, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et l' $\alpha$ -tocophérol (Berger, 2006). Ce groupe est beaucoup plus vaste que le groupe des enzymes antioxydants pouvant agir par différents mécanismes directs ou indirects (Kohen *et al.*, 2000). C'est ainsi qu'ils ont pour rôle d'empêcher les ERO ou les ERA d'atteindre leurs cibles moléculaires, d'où leur fonction de protecteur chimique. Généralement on considère qu'un bon antioxydant est un bon «capteur» d'agents oxydants. Toutefois, cette condition n'est pas suffisante; il faut en outre que l'antioxydant soit présent continuellement *in vivo* de manière à jouer plusieurs fois son rôle. Les mécanismes les plus fréquents de l'activité antioxydante sont l'interruption de la spirale

oxydative, la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons et la réparation des molécules d'ADN (Berger, 2006).

Des recherches effectuées au cours de deux dernières décennies appuient le fait que les espèces réactives d'oxygène et de l'azote auraient un rôle dans le psoriasis, en prouvant la présence de stress oxydant chez les patients atteints. Ainsi, plusieurs travaux expérimentaux ont confirmé l'existence de dérèglements quant aux mécanismes de protection antioxydants dans la peau, les érythrocytes et le plasma d'individus atteints (Baz *et al.*, 2003; Yildirim *et al.*, 2003; Utas *et al.*, 2002). En effet, des ERO tels le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde, semblent être générés dans le psoriasis sous l'action de la xanthine oxydase, une enzyme qui présente des niveaux d'activité élevés au sein des plaques (Kizaki *et al.*, 1977). De plus, la production accrue du TNF- $\alpha$  à l'intérieur des lésions pourrait également contribuer à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le psoriasis (Young *et al.*, 2008). De même, des études expérimentales ont démontré que la peau psoriasique est caractérisée par une augmentation du contenu en dialdéhyde malonique démontrant ainsi un état avancé de peroxydation lipidique (Utas *et al.*, 2002). La peroxydation lipidique, dans les kératinocytes psoriasiques, semble être l'une des causes de la diminution de la fluidité membranaire retrouvée dans la maladie (Simonetti *et al.*, 1996), ce qui jouerait un rôle important dans l'homéostasie cellulaire et le réarrangement des lipides à la suite des changements de température (Gommans *et al.*, 1979). De plus, il semble que les produits de la peroxydation lipidique sont capables d'inhiber l'enzyme adénylate cyclase (Popov and Lewin, 1991), tout en diminuant les niveaux de l'AMPc au sein des kératinocytes, ce qui est relié à l'hyperprolifération retrouvée dans le psoriasis.

Bien que ces études aient démontré la présence du stress oxydant chez les patients atteints, il manque encore des évaluations nous permettant d'établir des liens entre le stress oxydant et d'autres dérèglements qui sont présents dans la maladie. Le but serait de cibler avec plus de précision le vrai impact du déséquilibre antioxydant dans le psoriasis. Récemment, il a été suggéré que le traitement du psoriasis avec des agents antioxydants pourrait faire partie d'une thérapie antipsoriasique plus spécifique et efficace (Young *et al.*, 2008). Toutefois, les bénéfices réels des thérapies antioxydantes n'ont pas encore été mis en évidence. Ce contexte nous permet d'envisager d'autres travaux à réaliser dans les prochaines années.

### 1.2.9 La pathogenèse du psoriasis: une hypothèse

Jusqu'à maintenant, les causes exactes du psoriasis n'ont pas encore été découvertes bien que plusieurs hypothèses aient été émises (*une revue complète concernant l'évolution des concepts associés à la pathogenèse du psoriasis est présentée dans l'annexe 2*).

Auparavant, il était généralement admis que le psoriasis résultait d'anomalies épidermiques reliées à l'accélération du renouvellement cellulaire et à la différenciation cellulaire incomplète des kératinocytes (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). Cette hypothèse a conduit certains scientifiques à proposer l'utilisation d'agents pharmacologiques dirigés vers la diminution de l'hyperprolifération et la différenciation des kératinocytes, tels les analogues de la vitamine D et les rétinoïdes. Les recherches menées ces dernières années ont permis de comprendre le rôle du système immunitaire, particulièrement des lymphocytes T sur la prolifération des kératinocytes et sur l'angiogenèse observées dans le psoriasis. De ce fait, le psoriasis est aujourd'hui considéré comme une maladie à caractère auto-immun principalement reliée aux lymphocytes T (Tonel and Conrad, 2009). Effectivement, des études précédentes ont indiqué que le transfert de lymphocytes T d'un patient induit des lésions psoriasiques chez des animaux ayant reçu une greffe de peau non-lésionnelle du même patient (Nickoloff and Wrona-Smith, 1999). Par ailleurs, le traitement des patients avec des agents ciblant sélectivement les lymphocytes T ou des immunosuppresseurs lymphocytaires produit une amélioration significative du psoriasis (Morel *et al.*, 1992; Piskin *et al.*, 2003).

Les lésions psoriasiques sont caractérisées par une infiltration accrue de lymphocytes T (LT). Ainsi, on estime que chez un patient ayant 20% de la surface corporelle touchée par le psoriasis, environ 8 billions des lymphocytes T seront présents dans le sang, alors que 20 billions seront localisés dans le derme et l'épiderme des plaques psoriasiques (Krueger and Bowcock, 2005). Les études immunohistochimiques confirment que le derme est le siège d'une infiltration composée majoritairement de LT CD4<sup>+</sup> mémoires, de macrophages et de cellules présentatrices d'antigènes alors que les LT CD8<sup>+</sup> prédominent dans l'épiderme (Pauls *et al.*, 2001). La caractérisation des lymphocytes T présents dans des lésions psoriasiques démontre un biais vers le type 1 (Th1 et Tc1) ainsi qu'une infiltration de lymphocytes Th17 (Lowe *et al.*, 2008; Szegedi *et al.*, 2003). Les lymphocytes du type Th1

se distinguent par la production entre autres des interleukines (IL) IL-1, IL-6, IL-8, du TNF- $\alpha$ , de l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ) et du facteur de croissance épidermique (EGF). La présence accrue des lymphocytes du type Th17 au sein des lésions psoriasiques serait reliée à la production de puissantes cytokines proinflammatoires, telles l'IL-17 et l'IL-22 (Asarch *et al.*, 2008).

Aujourd'hui on considère que la transition de la peau normale à la lésion psoriasique serait orchestrée par des interactions complexes entre les différentes chimiokines et cytokines rélarguées par les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T et les kératinocytes chez des individus génétiquement prédisposés (Krueger and Bowcock, 2005) (Figure 7). De ce fait, l'hypothèse qui a été émise présume que la survenue de la maladie chez un individu jusque-là indemne de psoriasis suppose une étape de «sensibilisation» pendant laquelle les patients vont développer des lymphocytes T spécifiques d'un antigène cutané. Ainsi, un antigène (inconnu à ce jour, probablement en relation avec le HLA) serait apprêté par les cellules présentatrices d'antigènes comme conséquence de l'exposition des patients à des facteurs déclencheurs du psoriasis par exemple une infection (Bowcock and Krueger, 2005). Par la suite, les cellules présentatrices d'antigènes migreraient vers les organes lymphoïdes secondaires drainant la peau tout en libérant des cytokines, particulièrement de la famille de l'IL-12 (IL-12, IL-23) responsables de l'orientation de la réponse T vers la production de cytokines de type 1 et l'IL-17 (Boyman *et al.*, 2004). L'interaction entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T naïfs au niveau des ganglions lymphatiques, aboutirait à la génération de lymphocytes T spécifiques effecteurs et mémoires qui vont donc migrer vers le site d'inflammation en suivant un gradient de chimiokines (Santamaria-Babi, 2004).

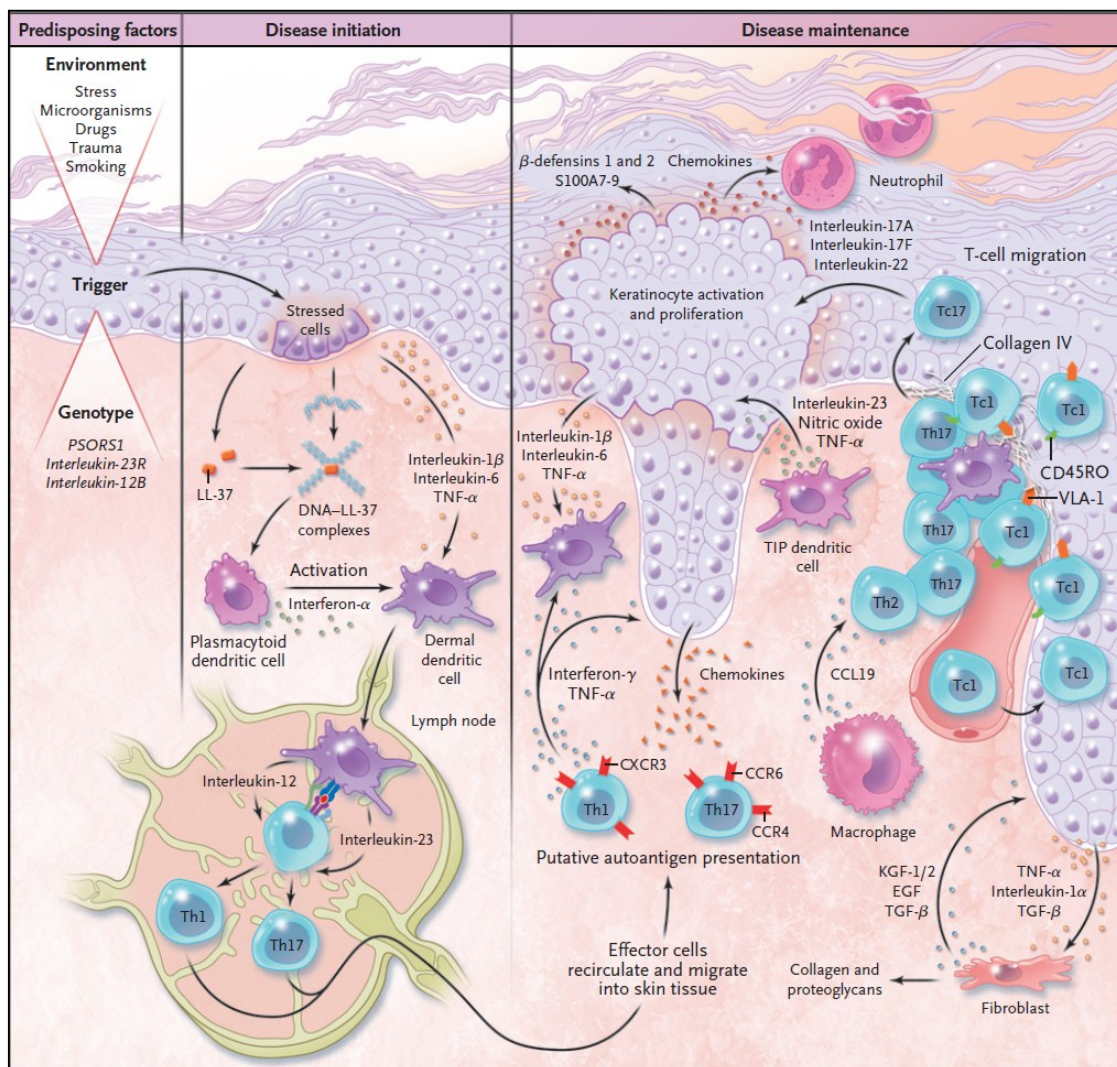


Figure 7 Une hypothèse du développement du psoriasis. Tirée de Nestle *et al.*, 2009

La reconnaissance de l'antigène en cause au site primaire chez des individus déjà «sensibilisés», stimulerait les lymphocytes à s'y établir et à libérer plusieurs cytokines (l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2, IL-6 et le TNF- $\alpha$ ) qui augmenteraient la prolifération des kératinocytes (Tonel and Conrad, 2009). Parmi ces cytokines, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  augmenteraient les niveaux des protéines anti-apoptotiques des kératinocytes, contribuant à des dérèglements au niveau de leur différenciation. L'IL-2 à son tour, stimulerait la prolifération des lymphocytes T en une boucle autocrine et le TNF- $\alpha$  augmenterait entre autres, la production de cytokines et des molécules d'adhérence. Les kératinocytes ainsi stimulés sécrèteraient des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF), des chimiokines et des molécules



d'adhérence qui augmenteraient le recrutement des lymphocytes au site de l'inflammation (Nestle *et al.*, 2009). Ils favoriseraient également l'angiogenèse et l'hyperperméabilité vasculaire par synthèse accrue du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Detmar *et al.*, 1994). Ainsi, ces interactions complexes entre les kératinocytes, les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigènes déclencheraient un cercle vicieux responsable de la perpétuation de cette maladie.

### **1.3. Biologie du TNF- $\alpha$**

#### 1.3.1 Le TNF- $\alpha$ : origine et synthèse

Le TNF- $\alpha$  est l'une des cytokines les plus étudiées et dont l'activité est parmi les plus pléiotropiques. En fait, il joue un rôle majeur dans l'inflammation, la réponse immunitaire et l'apoptose (Schottelius *et al.*, 2004). Les monocytes et macrophages sont les principales cellules productrices de TNF- $\alpha$ , mais d'autres cellules immunitaires en produisent aussi, notamment les lymphocytes T et B, les cellules NK (*natural killer*) et les mastocytes. Pareillement, d'autres types cellulaires comme les kératinocytes, les astrocytes, les cellules microgliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, ou certaines cellules tumorales, sont capables de produire cette cytokine (Bazzoni and Beutler, 1996).

Le TNF- $\alpha$  est codé par un gène situé sur le chromosome 6, près des gènes du HLA (*human leukocyte antigen*) (Kriegler *et al.*, 1988). On dénombre deux formes de TNF- $\alpha$ : une soluble (17,3 kDa, constituée de 157 acides aminés) et une liée à la membrane plasmique (26 kDa, constituée de 233 acides aminés). La forme soluble (sTNF- $\alpha$ ) est obtenue par clivage du TNF transmembranaire (mTNF- $\alpha$ ) qui agit en tant que précurseur protéique (Schottelius *et al.*, 2004). L'enzyme principalement responsable de la transformation de la forme transmembranaire du TNF vers la forme soluble est connue sous le nom de TACE (*TNF- $\alpha$ -converting enzyme*) (Figure 8).

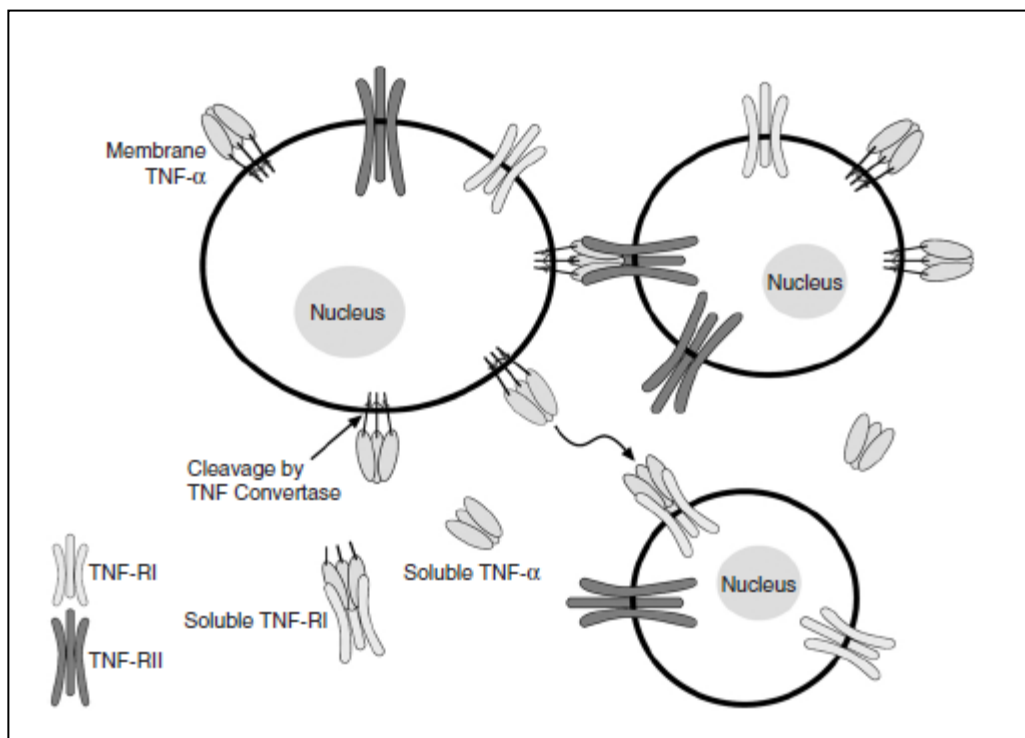


Figure 8 Signalisation intercellulaire du TNF- $\alpha$ . Tirée de Schotellius *et al.*, 2004.

La forme transmembranaire du TNF- $\alpha$  agit fondamentalement via le contact cellulaire (action juxtacrine) alors que la forme soluble agit au niveau de l'environnement local (action paracrine) ou à distance (action endocrine) (Hehlgans and Mannel, 2002). Après le clivage du mTNF- $\alpha$ , le sTNF- $\alpha$  s'oligomérisse en trimères pour constituer la forme active circulante du TNF- $\alpha$  (Schotellius *et al.*, 2004). Ces deux formes, soluble et transmembranaire, agissent en se fixant sur leurs récepteurs: le *tumor necrosis factor receptor type 1* (TNF-R1), connu également sous le nom de p55, p60 ou CD120a; et le *tumor necrosis factor receptor type 2* (TNF-R2) connu comme p75, p80, ou encore CD120b. Ces deux récepteurs sont des glycoprotéines avec un domaine riche en cystéine au niveau de la partie N terminale extracellulaire. Les deux récepteurs sont exprimés par presque tous les types cellulaires, mais le TNF-R1 est plus répandu. Le TNF-R2, quant à lui, est présent en quantité plus importante sur les cellules endothéliales et les cellules d'origine hématopoïétique. Le mTNF- $\alpha$  peut lier directement les TNF-R1 et 2, sans action de la TACE sur son domaine extramembranaire, mais il a une affinité supérieure pour le TNF-R2. Le sTNF- $\alpha$ , quant à lui, se lie préférentiellement sur le TNF-R1 (Grell *et al.*,

1995). Toutefois, sous certaines conditions, il peut lier le TNF-R2, qui à son tour le transférerait vers le TNF-R1 (*ligand-passing mechanism*) (Tartaglia *et al.*, 1993b).

Il existe aussi des formes solubles des récepteurs TNF-R1 et TNF-R2, lesquelles peuvent être libérées sous l'action de métalloprotéases comme la TACE et les MMP (*matrix metalloproteinases*), ou sécrétées après un épissage alternatif de leurs ARNm. Ces récepteurs solubles (sTNF-Rs) jouent le rôle d'inhibiteurs naturels du TNF- $\alpha$ , lui servant également de transporteurs (Anderson *et al.*, 1995; Edwards, 1999).

En général, on considère que la quantité de TNF- $\alpha$  synthétisée dépendra de l'état d'activation de la cellule, du type cellulaire impliqué, et du stimulus de départ (Schottelius *et al.*, 2004). Les facteurs induisant la synthèse du TNF sont fondamentalement d'origine immunologique (IL-1, TNF lui-même, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) ou infectieuse (les bactéries, les virus et les lipopolysaccharides (LPS)). Ces stimulus agissent principalement via l'activation de la voie de signalisation associée au facteur de transcription NF- $\kappa$ B ou en activant les MAPK (*mitogen activated protein kinases*). Ces dernières forment des cascades de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation du facteur de transcription AP-1 (*activator protein 1*), lequel induit l'expression du TNF- $\alpha$  (Schottelius *et al.*, 2004).

Le promoteur du TNF- $\alpha$  comporte aussi des sites de fixation pour d'autres facteurs de transcription comme l'AP-2 (*activator protein 2*), le NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) et le CRE (*cyclic adenosine monophosphate response element*), qui interagissent de façon différente selon le type cellulaire impliqué (Spriggs *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1996). Le polymorphisme de ce promoteur influence les capacités individuelles de production du TNF- $\alpha$  dans les différents types cellulaires.

### 1.3.2 Signalisation intracellulaire du TNF- $\alpha$

Afin d'exercer son action, le TNF- $\alpha$  doit se lier à ses récepteurs (TNF-R1 et TNF-R2), qui ont des fonctions et des voies de signalisation différentes. Dans les deux cas, la trimérisation du récepteur, préalable ou consécutive à la fixation du ligand, est indispensable à son activation (Schottelius *et al.*, 2004).

L'activation des TNF-R1 par le sTNF- $\alpha$  (17,3 kDa) est suivie par l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et par la transcription de nombreux gènes pro-inflammatoires, entre autres ceux codant pour des cytokines (le TNF- $\alpha$  lui-même, l'IL-1, l'IL-6), l'INF- $\gamma$  et le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*- $\beta$ ). Par l'intermédiaire du TNF-R1, le TNF- $\alpha$  peut également induire la voie des caspases (caspase 8, caspase 3), ce qui a pour conséquence l'apoptose (Figure 9). L'activation du TNF-R2 induit le recrutement intracellulaire de différentes protéines qui activent les voies de NF- $\kappa$ B et des MAP-kinases. Par contre, la signalisation intracellulaire du TNF- $\alpha$  via ce récepteur ne semble pas conduire à l'activation des caspases ni à l'induction de l'apoptose (Schottelius *et al.*, 2004).

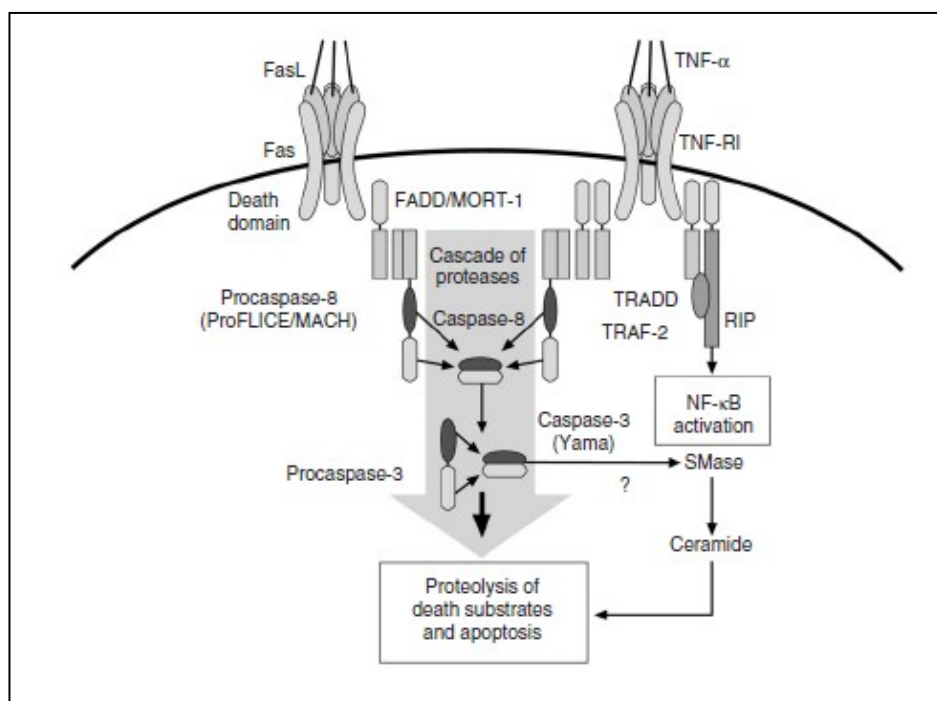


Figure 9 Signalisation intracellulaire du TNF- $\alpha$  via le récepteur de type 1 (TNF-R1). Tirée de Schotellius *et al.*, 2004.

## 1.4 La voie NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$

### 1.4.1 Les composants de la voie d'activation NF- $\kappa$ B

#### 1.4.1.1 Les protéines NF- $\kappa$ B

Le contrôle de l'expression génétique s'effectue en partie au niveau de la régulation transcriptionnelle. Ainsi, des signaux physiologiques générés à l'extérieur de la cellule par différents stimulus sont transmis jusqu'au noyau via de cascades de signalisation, lesquelles peuvent amplifier ou atténuer les interactions des facteurs de transcription à leur cible. Afin de pouvoir réguler l'expression génétique, les facteurs de transcription possèdent deux régions caractéristiques : un site de liaison directe à une séquence spécifique d'ADN et un domaine d'activation ou répression, leur permettant d'interagir avec différents cofacteurs afin d'orienter l'activité transcriptionnelle (Brivanlou and Darnell, 2002).

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) est un facteur de transcription eucaryote ubiquitaire et inductible. Il a été identifié pour la première fois en 1986, comme un régulateur de l'expression des gènes des chaînes légères  $\kappa$  des immunoglobulines dans les lymphocytes B matures (d'où son nom) (Sen and Baltimore, 1986). Aujourd'hui on lui attribue un rôle clé dans le contrôle de la réponse immunitaire, la réponse inflammatoire, la croissance et la survie cellulaires.

La famille NF- $\kappa$ B compte plusieurs membres chez les mammifères: RelA (p65), NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), c-Rel et RelB (Karin and Lin, 2002). Ces cinq protéines partagent une séquence de 300 acides aminés extrêmement conservée, appelée le Domaine d'Homologie Rel (DHR) qui permet la liaison à l'ADN, la dimérisation ainsi que l'association aux protéines inhibitrices de l'activité  $\kappa$  appelées I $\kappa$ B (Ghosh *et al.*, 1998). À l'exception de Rel B, tous les membres de la famille NF- $\kappa$ B peuvent former des hétérodimères avec les autres membres de la famille. De ce fait, différentes combinaisons seront à l'origine de réponses spécifiques et auront des effets différents au niveau de la transcription. Ainsi, les combinaisons p50/p65; p50/c-Rel; p65/p65; p65/c-Rel sont toutes transcriptionnellement activatrices alors que les homodimères p50/p50 ou p52/p52 répriment la transcription de leurs gènes cibles (Ghosh *et al.*, 1998). Les protéines p50 et

p65 sont exprimées de façon ubiquitaire dans presque tous les types cellulaires. En fait, l'hétérodimère p50/p65 représente la forme de NF- $\kappa$ B la plus abondante dans les cellules. Les sous-unités p50 et p65 lient l'ADN mais seule la sous-unité p65 possède l'activité transactivatrice (Ghosh and Karin, 2002).

#### 1.4.1.2 Les protéines inhibitrices I $\kappa$ B

Les protéines inhibitrices I $\kappa$ B maintiennent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B sous une forme inactive dans le cytoplasme des cellules non stimulées. De ce fait, les I $\kappa$ B masquent le signal de localisation nucléaire (SLN) de NF- $\kappa$ B, empêchant sa translocation nucléaire et sa fixation sur ses domaines de liaison à l'ADN (Ghosh *et al.*, 1998).

La famille des protéines I $\kappa$ B est composée de sept membres dont les plus communs sont I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  et I $\kappa$ B $\epsilon$ , caractérisés par la présence de plusieurs régions ARD (*ankyrin repeat*) de 33 acides aminés qui permettent les interactions avec les domaines DHR des protéines NF- $\kappa$ B (Ghosh *et al.*, 1998). Ainsi, le nombre de répétitions ankyrines diffère en fonction du type d'I $\kappa$ B et semble déterminer quelle protéine I $\kappa$ B va s'associer à quel dimère Rel. I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\beta$  sont principalement associés aux complexes p50/p65 et p50/c-Rel, alors qu'I $\kappa$ B $\epsilon$  s'associe principalement aux homodimères p65 et c-Rel (Thompson *et al.*, 1995; Whiteside *et al.*, 1997).

Le schème classique admet que la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  retient NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme. Toutefois, des études biochimiques et structurales ont montré que seulement un de deux SLN du dimère NF- $\kappa$ B (p50/p65) est masqué par I $\kappa$ B $\alpha$  dans un complexe I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, ce qui permet au complexe de basculer quand même vers le noyau en absence de toute stimulation (Birbach *et al.*, 2002). De même, le complexe I $\kappa$ B $\epsilon$ /NF- $\kappa$ B est capable de voyager entre le cytoplasme et le noyau (Lee and Hannink, 2002). Par contre, le complexe I $\kappa$ B $\beta$ /NF- $\kappa$ B est toujours retenu dans le cytoplasme (Tam and Sen, 2001).

I $\kappa$ B $\alpha$  (37 kDa) a été le premier membre de la famille des I $\kappa$ B à avoir été cloné, étant aussi le membre le plus étudié (Ghosh *et al.*, 1998). Sous l'action de certains stimuli, l'activation des kinases spécifiques aura lieu, et conséquemment la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  sur les résidus de sérine 32 et 36. I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylée est reconnue par la protéine  $\beta$ -TrCP ( $\beta$

*transducin repeat containinig protein*) (Margottin *et al.*, 1998). Ensuite, elle subit une ubiquitinylation sur les lysines 21 et 22 et une dégradation par le protéasome 26S, via des interactions entre la partie carboxy-terminale d'I $\kappa$ B $\alpha$  et le cœur catalytique du protéasome (Kroll *et al.*, 1997). Suite à la destruction d'I $\kappa$ B $\alpha$ , le SLN de la sous-unité p65 du complexe NF- $\kappa$ B est démasqué, et la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B peut s'effectuer. Bien qu'I $\kappa$ B $\alpha$  soit rapidement dégradée, la présence d'un élément de réponse NF- $\kappa$ B sur le promoteur de son gène lui permettra d'être rapidement néosynthétisée. L'I $\kappa$ B $\alpha$  néosynthétisée s'accumule donc dans le noyau où elle serait sumoylée rendant sa dégradation par le protéasome impossible. Les protéines I $\kappa$ B $\alpha$  néosynthétisées peuvent alors déplacer NF- $\kappa$ B de son site de liaison à l'ADN et ainsi le transporter vers le cytoplasme où il restera disponible pour une nouvelle activation (Rodriguez *et al.*, 1999). De cette façon, I $\kappa$ B $\alpha$  joue un rôle de régulateur négatif de NF- $\kappa$ B.

#### 1.4.1.3 Les I $\kappa$ B kinases

La plupart des signaux d'activation de la voie NF- $\kappa$ B convergent vers un complexe multiprotéique cytoplasmique connu sous le nom du complexe IKK (I $\kappa$ B kinases) (700-900 kDa) qui est composé d'au moins trois protéines: IKK $\alpha$  (85 kDa), IKK $\beta$  (87 kDa) et NEMO (48 kDa) (Karin and Delhase, 2000). IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont les sous-unités catalytiques du complexe, ayant une structure primaire très similaire. Elles sont présentes en quantités égales au sein du complexe, associées sous forme d'hétérodimères (Rothwarf *et al.*, 1998). Ces sous-unités possèdent une activité sérine kinase spécifique dépendante de leur dimérisation et sont responsables de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  sur les résidus de sérine 32 et 36. Ainsi, il semblerait qu'IKK $\beta$  soit essentielle pour l'activation du complexe IKK et la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  après stimulation par les cytokines pro-inflammatoires, alors qu'IKK $\alpha$  semble jouer un rôle clé dans le développement épidermique (Ghosh and Karin, 2002; Zandi and Karin, 1999).

NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*) ou IKK $\gamma$  est la sous-unité régulatrice du complexe IKK, mais à la différence IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , elle ne possède pas de domaine kinase (Yamaoka *et al.*, 1998). À l'intérieur du complexe IKK, des dimères de NEMO sont associés aux hétérodimères IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ . NEMO est impliquée dans le recrutement de protéines kinases situées en amont du complexe IKK (May *et al.*, 2000). Ainsi, en réponse à divers stimuli,

ces kinases sont activées et recrutées par NEMO, ce qui s'en suit la phosphorylation d'IKK $\beta$  et l'activation du complexe IKK. Puis, par des mécanismes d'autophosphorylation intra-moléculaires, la sous-unité IKK $\beta$  phosphorylée va, à son tour, phosphoryler la sous-unité IKK $\alpha$  ou d'autres complexes IKK inactifs (Karin, 1999).

#### 1.4.2 La voie NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$

Trois voies d'activation distinctes, mettant en jeu différentes kinases, conduisent à l'activation de NF- $\kappa$ B. La première voie, nommée « *voie classique ou canonique* » est activée par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ . La seconde voie dite « *alternative* » est activée par des ligands tels que la lymphotoxine B, le CD40, ou certains types de virus. Quant à la troisième voie, dite « *atypique* », elle est activée suite à l'altération de l'ADN par les rayons ultraviolets (UV) (Viatour *et al.*, 2005). *Dans cette thèse nous expliquerons seulement la voie d'activation classique de NF- $\kappa$ B de par son importance pour la signalisation du TNF- $\alpha$  et l'inflammation.*

L'inflammation induite par le TNF passe par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B qui fait suite à la liaison de la cytokine avec son récepteur. Ainsi, en réponse au TNF- $\alpha$ , le récepteur de type 1 subit une trimérisation ainsi qu'un changement de conformation qui permet la liaison de la protéine adaptatrice TRADD (*TNF receptor associated with death domain*). Ce complexe sert de point de départ à l'activation des 3 voies de signalisation induites par le TNF- $\alpha$  : la voie NF- $\kappa$ B, la voie conduisant à l'apoptose et la voie des MAP kinases (Schottelius *et al.*, 2004). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B est initiée par la fixation de la protéine adaptatrice RIP (*receptor interactive protein*) à TRADD. Par la suite, le TRAF2 (*TNF-receptor associated factor 2*) est recruté dans le complexe, ce qui favorise la polyubiquitination de RIP, qui, à son tour, favorise le recrutement et l'activation de TAK1 (*transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase*). L'activation de TAK1 résulte en la phosphorylation et l'activation du complexe IKK (Omori *et al.*, 2006; Takaesu *et al.*, 2003). De cette activation s'en suit la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  par l'IKK $\beta$  au niveau des sérines 32 et 36. La phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  induit alors son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome 26S. La dégradation de l'inhibiteur permet de démasquer le signal de localisation nucléaire des sous-unités NF- $\kappa$ B et ainsi leur transport vers le



noyau. Une fois transloqués, les dimères NF- $\kappa$ B p50/p65 peuvent alors se fixer sur les séquences promotrices et activer les gènes cibles, entre autres ceux reliés à l'inflammation (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) (Figure 10) (Schottelius *et al.*, 2004).

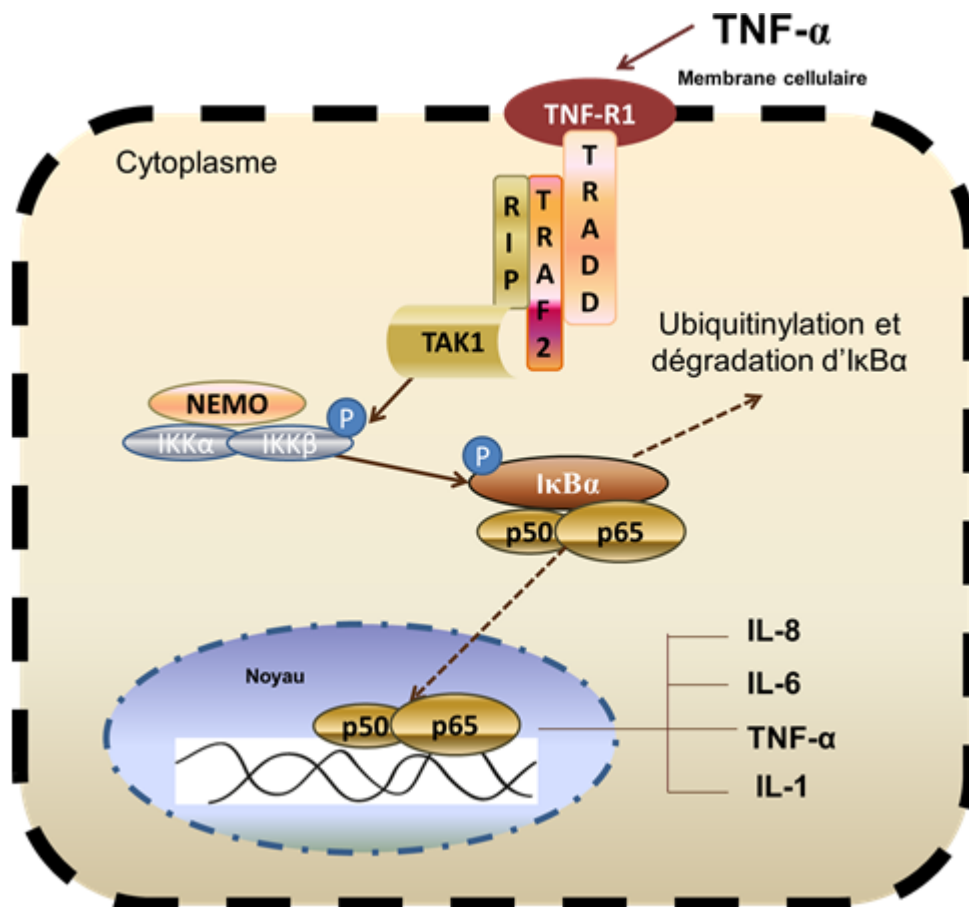


Figure 10 La voie NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$

#### 1.4.3 Régulation de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B via la phosphorylation de p65

La régulation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B peut survenir à différents niveaux: a) la dimérisation ; b) la translocation nucléaire liée à l'inhibition par les I $\kappa$ B; c) la liaison à l'ADN; d) l'interaction avec d'autres co-activateurs de la transcription et finalement, e) l'interaction avec la machinerie basale de transcription (Ghosh *et al.*, 1998).

Un autre niveau de régulation important de l'activité NF- $\kappa$ B tient compte de la phosphorylation de la sous-unité p65 (Viatour *et al.*, 2005). Cette phosphorylation conduit à

l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B via l'augmentation de son affinité de fixation aux sites  $\kappa$ B et le recrutement de co-activateurs de la transcription (Ghosh and Karin, 2002). Ainsi, la phosphorylation de p65 sur le résidu de sérine 276 (Ser276) par la sous-unité catalytique de la PKA (*protein kinase A*) est primordiale pour une fixation efficace de p65 sur le co-activateur de transcription CBP (*CREB binding protein*) (Zhong *et al.*, 1998). Le résidu de sérine 276 peut également être phosphorylé dans le noyau par MSK1 (*mitogen and stress activated protein kinase 1*) contribuant à une activation optimale de p65 après stimulation de cellules par le TNF- $\alpha$  (Vermeulen *et al.*, 2003). En réponse au TNF- $\alpha$ , le résidu de sérine 311 de p65 peut aussi être ciblé par la PKC $\zeta$  (*protein kinase C  $\zeta$* ), ce qui activerait l'interaction de p65 avec le co-activateur de transcription CBP (Kai *et al.*, 2009). Le TNF- $\alpha$  peut également activer la phosphorylation de p65 sur le résidu de sérine 536 via l'IKK $\beta$ , et augmenter l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (Sakurai *et al.*, 1999).

### **1.5 Rôle de la voie de signalisation du TNF- $\alpha$ associé au NF- $\kappa$ B dans la pathogenèse du psoriasis**

Le TNF- $\alpha$  est aujourd'hui considéré au centre de la physiopathologie du psoriasis. Son importance pour le développement du psoriasis a été principalement constatée par l'effet thérapeutique étonnant des molécules biologiques capables de bloquer son action (Gottlieb *et al.*, 2003; Mease, 2003). La production de TNF- $\alpha$  constitue un événement précoce dans la constitution des lésions psoriasiques, mais cette cytokine semble aussi jouer un rôle majeur dans l'induction et la persistance de la maladie. En effet, des études expérimentales ont montré que les niveaux de TNF- $\alpha$  sont plus élevés au sein de la peau et du sang des patients atteints de psoriasis comparativement à ceux retrouvés chez des individus normaux; cette augmentation étant significativement corrélée avec la sévérité clinique du psoriasis (Kristensen *et al.*, 1993; Mussi *et al.*, 1997). Des polymorphismes dans les gènes codant pour le TNF ont été identifiés dans le psoriasis (Capon *et al.*, 2012) et pourraient être à la base de la production accrue de cette cytokine chez des individus prédisposés.

Dans la peau normale, le TNF- $\alpha$  se trouve principalement au niveau de la couche basale et autour des glandes sudoripares et sébacées, alors que dans la peau psoriasique il est présent dans toutes les couches de l'épiderme ainsi que autour des vaisseaux sanguins du derme

(Kristensen *et al.*, 1993). Par ailleurs, la peau psoriasique est caractérisée par une augmentation de l'expression des récepteurs du TNF (TNF-R1 et TNF-R2). Ainsi, au sein des plaques, l'expression du TNF-R1 est augmentée principalement autour des vaisseaux sanguins du derme et dans le *stratum corneum* (Kristensen *et al.*, 1993). De même, on retrouve des niveaux élevés de sTNF-R1 dans le plasma des patients atteints (Ettehadi *et al.*, 1994). Quant au TNF-R2, il n'est pas présent dans l'épiderme normal, mais son expression est augmentée dans le *stratum corneum* des lésions psoriasiques (Kristensen *et al.*, 1993). L'activation du récepteur TNF-R1 par le TNF- $\alpha$  semble jouer un rôle majeur dans la pathogenèse du psoriasis en ce qui concerne l'activation de NF- $\kappa$ B, la prolifération des lymphocytes T, la migration des cellules de Langerhans vers les ganglions lymphatiques et la production de cytokines de type 1 (Kristensen *et al.*, 1993; Mizutani *et al.*, 1997; Segui *et al.*, 2001). Similairement, la signalisation via le TNF-R2 semble être impliquée dans la prolifération des lymphocytes T et dans la migration des cellules présentatrices d'antigènes vers les ganglions lymphatiques (Tartaglia *et al.*, 1993a).

Au niveau cutané, le TNF- $\alpha$  est produit par de nombreux types cellulaires comme les kératinocytes, les lymphocytes, les fibroblastes, les monocytes et les cellules présentatrices d'antigènes, mais le type cellulaire responsable de la production initiale de TNF- $\alpha$  au sein des lésions psoriasiques n'est toujours pas connu avec certitude (Schottelius *et al.*, 2004). Les kératinocytes pourraient être en cause de par leur capacité à produire du TNF en réponse à des stimuli exogènes déclencheurs du psoriasis (Darmstadt *et al.*, 1999). Toutefois, des études utilisant des modèles animaux suggèrent que les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T seraient les cellules impliquées dans la production précoce de TNF- $\alpha$  dans le psoriasis (Boyman *et al.*, 2004). En fait, des greffes de peau non lésionnelle de patients psoriasiques chez la souris immunosupprimée ont démontré qu'un développement spontané et rapide du psoriasis associé à une prolifération accrue des lymphocytes T dans la peau et à une production locale de TNF- $\alpha$  était possible. Le traitement des animaux avec des molécules anti-TNF (infliximab et etanercept) a significativement réduit la prolifération des lymphocytes T, tout en prévenant le développement des lésions psoriasiques. Ces résultats ont suggéré que le TNF- $\alpha$  puisse être impliqué dans l'activation, la migration et la prolifération des lymphocytes T au sein de la peau (Boyman *et al.*, 2004).

Le TNF- $\alpha$  produit par les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T activerait donc les kératinocytes, ce qui les amènerait à produire un large panel de molécules capables d'attirer les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T spécifiques mémoires vers l'épiderme (Figure 11) (Pastore *et al.*, 2004). Les kératinocytes psoriasiques se caractérisent entre autres par une réponse au TNF anormalement augmentée (Giustizieri *et al.*, 2001). Ainsi, il est possible qu'au sein des plaques psoriasiques, ils aient des réponses altérées aux signaux inflammatoires produits par les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T aboutissant à des dérèglements au niveau de leur prolifération et différenciation (Rozieres *et al.*, 2006).

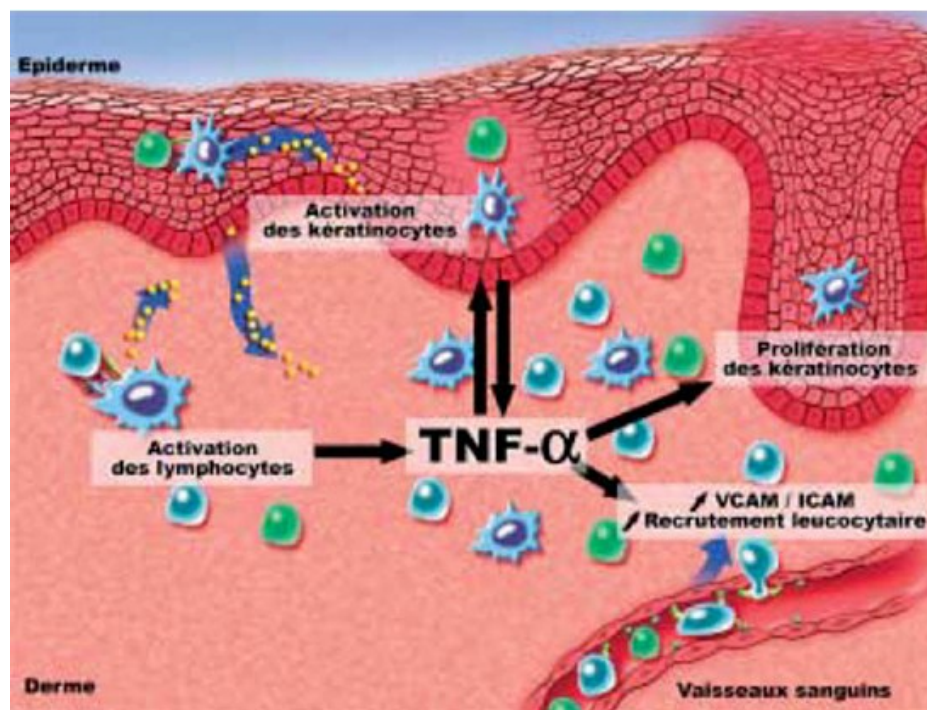


Figure 11 Rôle central du TNF- $\alpha$  dans le développement du psoriasis. Tirée de Rozieres *et al.*, 2006

Au niveau moléculaire le TNF- $\alpha$  agit principalement en activant la voie NF- $\kappa$ B. L'activation de NF- $\kappa$ B serait responsable de la production de nombreuses molécules inflammatoires, qui seraient produites à la fois par les lymphocytes T, les cellules présentatrices d'antigènes et les kératinocytes (Iversen *et al.*, 2005) (Tableau 5). Parmi ces molécules on retrouve des cytokines comme l'IL-6, considérée en tant que puissant

mitogène pour les kératinocytes aussi bien que des chimiokines comme l'IL-8 et le CX3CL1/fractalkine impliquées au niveau de la chimiotaxie des lymphocytes T et des neutrophiles. Également, l'activation de NF- $\kappa$ B conduirait à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) impliquée dans le trafic lymphocytaire et le recrutement des leucocytes dans la peau (Victor and Gottlieb, 2002).

Tableau 5 Effets du TNF- $\alpha$  au niveau cutané. Modifié de Victor and Gottlieb, 2002

Actions du TNF- $\alpha$	Effets subséquents
Augmentation de l'IL-1	Stimule la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires, augmente la production du TNF- $\alpha$ , augmente l'expression de la kératine 6
Augmentation de l'IL-6	Stimule la prolifération des kératinocytes, tout en étant un facteur de croissance pour les lymphocytes T et B
Augmentation de l'IL-8	Contribue à l'activation des lymphocytes T et des neutrophiles; favorise la chimiotaxie des neutrophiles vers la peau; stimule l'angiogenèse et la prolifération des kératinocytes
Augmentation de l'expression d'ICAM-1	Permet l'interaction des lymphocytes T avec les kératinocytes et les cellules endothéliales, tout en favorisant l'infiltration des cellules T dans la peau
Augmentation de l'expression et de la synthèse de l'élafine	Marqueur de la différenciation aberrante des kératinocytes
Augmentation de CX3CL1/fractalkine	Favorise la chimiotaxie des leucocytes exprimant CX3CR1 et l'adhérence de ces cellules aux kératinocytes
Stimule la synthèse des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	Hyperprolifération et différenciation aberrante des kératinocytes
Stimule l'expression et la synthèse du VEGF	Stimule l'angiogenèse, en fournissant de nouvelles voies pour l'infiltration des lymphocytes T dans la peau
Induit l'expression de l'enzyme oxyde	Augmente la production de monoxyde

nitrique synthétase inductible (iNOS)	d'azote, ce qui est nécessaire pour l'induction du VEGF
Capable de stimuler la migration des cellules de Langerhans vers les ganglions lymphatiques	Contribue à l'activation des lymphocytes T
Diminution de l'expression de l'E-cadhérine	Favorise la migration des cellules de Langerhans vers les ganglions lymphatiques
Activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B	Stimule la transcription du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, d'iNOS, de l'ICAM-1 et des protéines anti-apoptotiques

Fait intéressant, l'expression de NF- $\kappa$ B sous une forme active (p65 phosphorylé sur le résidu de sérine 536) est significativement augmentée au sein des lésions psoriasiques comparativement à la peau normale ou à la peau non-lésionnelle du même patient (Figure 12) (Lizzul *et al.*, 2005). Le traitement avec un inhibiteur du TNF- $\alpha$  (l'etanercept) a significativement diminué cette expression, ce qui a été corrélé à une amélioration clinique significative du psoriasis (Figure 12) (Lizzul *et al.*, 2005). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'inhibition de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par des inhibiteurs du protéasome dans un modèle animal du psoriasis a également conduit à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires dépendantes du TNF- $\alpha$ , tout en améliorant les signes cliniques du psoriasis (Zollner *et al.*, 2002). Ces résultats ont donc suggéré que l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$  jouerait un rôle clé dans la pathogenèse du psoriasis et que l'inhibition de l'activation de ce facteur de transcription pourrait constituer une cible thérapeutique pour le traitement de cette maladie (Lizzul *et al.*, 2005).

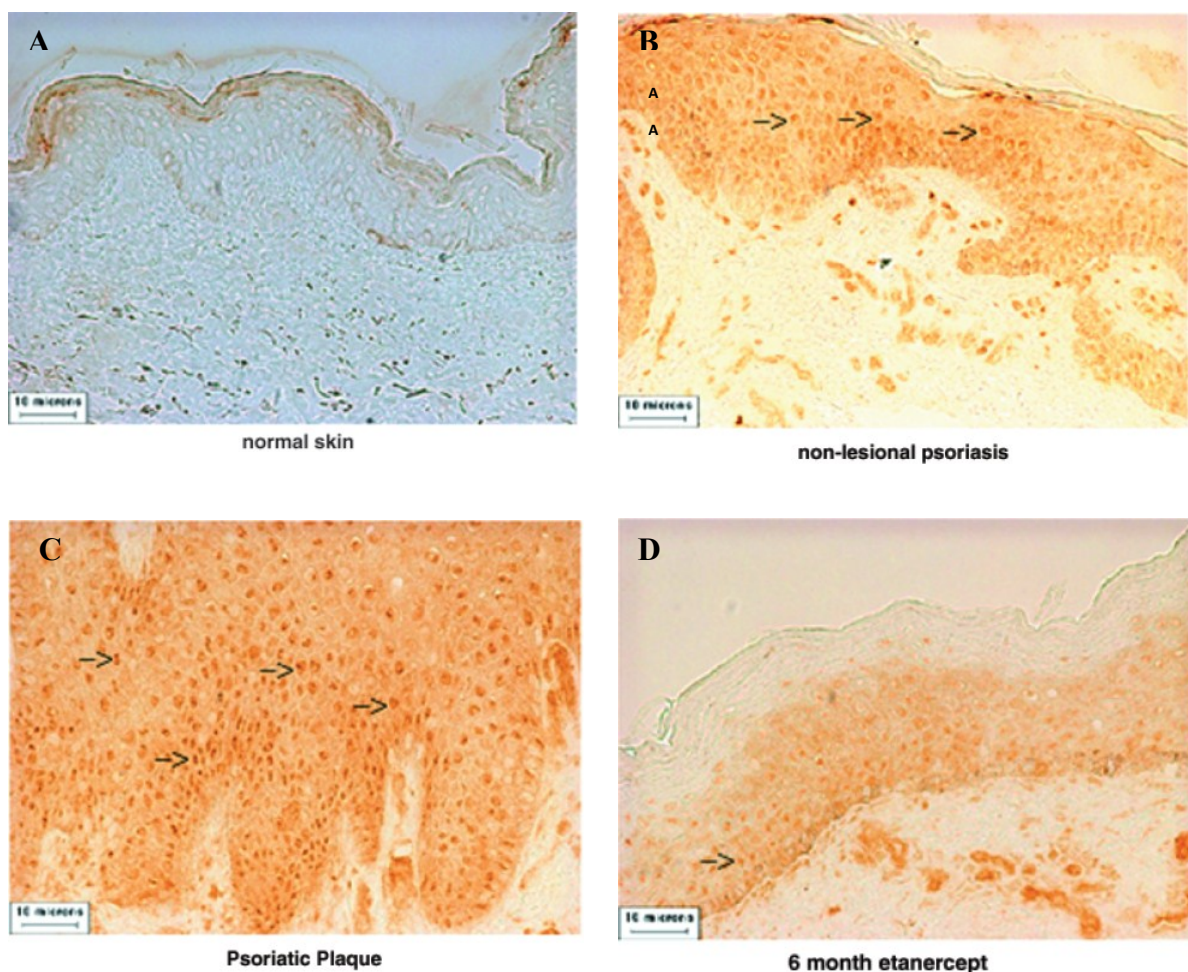


Figure 12 Expression de NF- $\kappa$ B phosphorylé au sein de la peau psoriasique (lésionnelle et non-lésionnelle) comparativement à la peau normale humaine: effets du traitement avec l'étanercept. Tirée de Lizzul *et al.*, 2005.

(A) peau normale humaine; (B) peau psoriasique non-lésionnelle; (C) peau psoriasique lésionnelle ; (D) peau psoriasique lésionnelle traitée avec l'étanercept pendant 6 mois.

### 1.6 Traitements antipsoriasiques disponibles

Bien qu'il soit toujours impossible de guérir le psoriasis, différents traitements permettant le soulagement des symptômes sont disponibles pour les patients. Le choix du traitement dépendra d'une série de facteurs, tels que la morphologie des plaques, l'extension et localisation des lésions, la réponse aux thérapies antérieures et leurs effets indésirables, la nature des facteurs déclenchants et les comorbidités présents chez les patients (Lebwohl

and Ali, 2001). Ainsi, il existe fondamentalement quatre stratégies thérapeutiques pour traiter le psoriasis: les traitements topiques, la photothérapie, les traitements systémiques et les traitements biologiques.

Malgré l'existence de plusieurs types de traitements, le psoriasis est considéré comme une maladie sous-traitée. En effet, une étude observationnelle effectuée aux États-Unis a révélé que près de 80% des patients psoriasiques ne recevaient pas de traitement pendant une année civile donnée (Feldman *et al.*, 2000). De même, une autre étude menée aux États-Unis par la *National Psoriasis Foundation* a montré que près de 40% des répondants ne recevaient aucun traitement pour leur psoriasis au moment de l'étude (Horn *et al.*, 2007). Bien qu'une gravité modérée des symptômes pourrait être en cause chez certains patients, il semblerait qu'il existe également une méconnaissance de ces derniers par rapport à leur psoriasis. Cela démontre l'importance d'instaurer des programmes éducatifs afin de permettre que les patients affectés soient correctement pris en charge (dermatologie, 2009).

#### 1.6.1 Traitements topiques

De nos jours, il existe un large éventail de traitements topiques permettant de prendre en charge les symptômes des patients souffrant de psoriasis léger ( $BSA \leq 5\%$ ). Les produits le plus souvent utilisés sont: a) les corticostéroïdes ; b) les analogues de la vitamine D<sub>3</sub>; c) les rétinoïdes ; d) l'anthraline ; e) les goudrons et f) l'acide salicylique.

- a) Les corticostéroïdes se sont imposés comme un traitement topique de premier choix chez des patients atteints de psoriasis. En fait, ils sont aujourd'hui les médicaments les plus utilisés dans les pays développés pour le traitement du psoriasis léger (Strowd *et al.*, 2009). Les corticostéroïdes diminuent les symptômes du psoriasis par des effets immunosuppresseifs, anti-inflammatoires, antiprolifératifs et vasoconstricteurs (Cornell, 1992; Glade *et al.*, 2002). Leur mécanisme d'action exact est peu connu, mais il semblerait qu'ils puissent agir en inhibant l'activation de NF- $\kappa$ B au sein des kératinocytes stimulés avec le TNF- $\alpha$  et diminuer ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (Kis *et al.*, 2006).



- b) Les analogues de la vitamine D<sub>3</sub> régulent la prolifération et la différenciation des kératinocytes et inhibent aussi l'activité des lymphocytes T (Gerritsen *et al.*, 1993). Ils diminuent également l'inflammation retrouvée dans le psoriasis (van de Kerkhof, 1995).
- c) Les rétinoïdes topiques (tazarotène) exerceraient leur action thérapeutique en régulant la prolifération et la différenciation des kératinocytes (Duvic *et al.*, 1997). Bien qu'ils puissent éliminer l'infiltrat inflammatoire au sein des plaques psoriasiques, il n'a pas encore été établi si cet effet était une conséquence plutôt indirecte de leur action sur les kératinocytes (Gottlieb *et al.*, 1996).
- d) L'anthraline, également connue sous le nom de dithranol, a été originalement obtenue à partir de la poudre de Goa, provenant de l'écorce d'un arbre du Brésil, l'araroba (*Andira araroba*) (du Vivier, 2002). En fait, il s'agit d'un polyphénol ayant des propriétés anti-inflammatoires et antiprolifératives, qui semblent être reliées à sa capacité d'induire la peroxydation lipidique sur les kératinocytes et les monocytes au sein des plaques psoriasiques (Peus *et al.*, 2000).
- e) Le goudron de houille est la principale préparation à base de goudron pour le traitement du psoriasis en plaques léger. Son mécanisme d'action pharmacologique n'est pas complètement élucidé, mais il inclut un effet antiprolifératif, antiprurigineux et antiseptique (Kamili and Menter, 2009; Vallat *et al.*, 1994).
- f) L'acide salicylique, un dérivé phénolique, est utilisé dans le psoriasis en raison de ses propriétés kératolytiques (Lebwohl, 1999).

### 1.6.2 Photothérapie

Les séances de photothérapie sont utilisées pour des patients ayant un psoriasis modéré et/ou grave (PASI  $\geq$  8) qui ne peut pas être maîtrisé de façon satisfaisante avec les agents topiques (dermatologie, 2009). On dénombre deux types de photothérapie: la PUVA thérapie et la photothérapie aux rayons ultraviolets (UVB) (Grundmann-Kollmann *et al.*, 2004). La PUVA thérapie recouvre plusieurs techniques thérapeutiques utilisant le 5- ou le

8-méthoxypsoralène afin de sensibiliser les cellules aux effets des rayons ultraviolets de longueur d'onde élevées (320-400 nm) (Lebwohl and Ali, 2001). La photothérapie UVB, quant à elle, peut être appliquée à large spectre (290-320 nm), à spectre étroit (311 nm) ou sous forme de laser excimer (308 nm) (Ashcroft *et al.*, 2000). Autant la photothérapie UVB que la PUVA thérapie agit en provoquant une réduction rapide des populations cellulaires impliquées dans la pathogenèse du psoriasis y compris les lymphocytes T dermiques et épidermiques, les macrophages et les cellules dendritiques (Erkin *et al.*, 2007).

### 1.6.3 Traitements systémiques

- a) Le méthotrexate est un anti-métabolite inhibant la synthèse de l'ADN via l'inhibition de l'enzyme dihydrofolate réductase, une enzyme nécessaire à la conversion de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique, qui est nécessaire à la synthèse des purines et des pyrimidines (Fairbanks *et al.*, 1999). À l'origine, il a été utilisé dans le traitement du psoriasis pour ses propriétés antiprolifératives, mais aujourd'hui on reconnaît ses effets inhibiteurs sur l'activation des lymphocytes T et B et sur la production de cytokines pro-inflammatoires (Fairbanks *et al.*, 1999).
- b) Les rétinoïdes oraux, tels l'acitretin, diminuent l'épaisseur, la rougeur et la desquamation des plaques en modulant la prolifération et la différenciation des cellules épidermiques (Monfrecola and Baldo, 2009). Le mécanisme pharmacologique n'est pas encore bien connu; mais il semblerait que les effets antipsoriasiques de l'acitretin seraient aussi reliés à l'inhibition de la chimiotaxie des neutrophiles et à la diminution de la synthèse du VEGF par les kératinocytes (Young *et al.*, 2006).
- c) La cyclosporine est un inhibiteur de la calcineurine utilisé dans le psoriasis comme traitement immunosuppresseur. L'inhibition de la calcineurine implique l'inhibition de la transcription des gènes reliés à l'activation des lymphocytes T. De ce fait, ce médicament prévient l'activation des lymphocytes T tout en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires (Ghoreschi *et al.*, 2003).

#### 1.6.4 Traitements biologiques

Depuis peu, de nouveaux traitements biologiques sont disponibles pour le traitement du psoriasis. Ceux-ci ciblent des éléments spécifiques du système immunitaire impliqués dans le psoriasis et sont généralement utilisés dans le cas de patients qui résistent aux traitements systémiques classiques (Bahner *et al.*, 2009).

Il existe plusieurs types d'agents biologiques présentement disponibles, à savoir des protéines de fusion, des protéines recombinantes et des anticorps monoclonaux. Les visées de ces traitements incluent: a) l'inhibition de l'activation et du nombre de lymphocytes T pathogéniques; b) l'inhibition des cytokines proinflammatoires impliquées dans le psoriasis (IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ ); et e) l'augmentation de la réponse immune de type 2 (Schon and Boehncke, 2005).

##### 1.6.4.1 Traitements biologiques ciblant les lymphocytes T

- a) L'aléfacept est une protéine de fusion humaine qui combine le domaine extracellulaire de LFA-3 (*lymphocyte fonction associated antigen-3*) avec le fragment Fc de l'immunoglobuline humaine (IgG1) (Chaarani and Lebwohl, 2010). L'aléfacept agit via la liaison au récepteur CD2 des cellules T. Ceci bloque l'interaction des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes T, tout en stimulant l'apoptose des lymphocytes T de type CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> et CD45RO<sup>+</sup> lesquels sont exprimés de façon importante au sein des lésions psoriasiques (Chaarani and Lebwohl, 2010).
- b) L'efalizumab est un anticorps monoclonal murin humanisé anti-CD11a (sous-unité  $\alpha$  de LFA-1 *lymphocyte fonction associated antigen-1*). Il inhibe l'activation des lymphocytes T, leur infiltration cutanée et leur adhésion aux kératinocytes et aux cellules endothéliales en empêchant la liaison de LFA-1 à l'ICAM-1 (Talamonti *et al.*, 2011). Suite à l'apparition de leucoencéphalopathies multifocales progressives et d'infections sévères chez certains patients suivant ce traitement depuis plusieurs années, l'efalizumab a été retiré du marché (Talamonti *et al.*, 2011).

#### 1.6.4.2 Traitements biologiques ciblant l'IL-12 et l'IL-23

L'ustekinumab est un anticorps monoclonal IgG1k entièrement humanisé dirigé contre la sous-unité protéique p40 commune aux interleukines 12 et 23 (O'Neill and Kalb, 2009). Ainsi, ce médicament agit avec une haute spécificité et affinité contre les cytokines IL-12 et IL-23 les empêchant de se lier à leur récepteur protéique IL-12R $\beta$ 1 exprimé à la surface des cellules immunitaires. De ce fait, l'ustekinumab inhibe l'activation de cellules NK aussi bien que la différenciation et l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (O'Neill and Kalb, 2009). L'ustekinumab est réservé aux patients qui n'ont pas répondu aux traitements systémiques.

#### 1.6.4.3 Traitements biologiques ciblant le TNF- $\alpha$

Deux types de médicaments biologiques anti-TNF- $\alpha$  ont été utilisés pour le traitement du psoriasis: des anticorps monoclonaux (infliximab et adalimumab) et une protéine de fusion (etanercept). Ces thérapies ont démontré une efficacité thérapeutique remarquable comparativement aux traitements conventionnels et aux traitements biologiques ciblant les lymphocytes T (Tableau 6), ce qui a permis de constater l'importance du TNF- $\alpha$  dans la pathogenèse du psoriasis (Leon *et al.*, 2007).

Tableau 6 Efficacité thérapeutique des traitements biologiques anti-TNF- $\alpha$  comparativement à d'autres traitements antipsoriasiques. Modifié de Leon *et al.*, 2007

Médicament	Classe	Période du traitement (semaines)	Sévérité du psoriasis chez les patients inclus dans l'étude	% des patients ayant une réponse PASI 75 % après le traitement
Acitretin	Rétinoïde oral	12	PASI : 12.6-13.1	45-52 %
Méthotrexate	Antimétabolite	16	PASI $\geq$ 8	60 %
Cyclosporine	Inhibiteur de la calcineurine	12	PASI $\geq$ 15	78,2-80,3 %
Alefacept	Biologique (prévient l'activation des lymphocytes T)	14	PASI : 13-15	21 %
Efalizumab	Biologique (prévient l'activation	12	PASI $\geq$ 12	31.4 %

des lymphocytes T)				
<b>Infliximab</b>	<b>Biologique (anti-TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<b>10</b>	<b>PASI <math>\geq</math> 12</b>	<b>80 %</b>
<b>Adalimumab</b>	<b>Biologique (anti-TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<b>12</b>	<b>PASI <math>\geq</math> 14</b>	<b>53-80 %</b>
<b>Etanercept</b>	<b>Biologique (anti-TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<b>12</b>	<b>PASI <math>\geq</math> 10</b>	<b>34-49 %</b>

#### 1.6.4.3.1 L'infliximab

L'Infliximab est un anticorps chimérique IgG1 $\kappa$  comportant des régions constantes humaines et des régions variables murines, ayant un poids moléculaire de 149 kDa. L'infliximab agit en inhibant la signalisation cellulaire induite par le TNF- $\alpha$  par neutralisation de la forme soluble ou transmembranaire de la cytokine (Vergou *et al.*, 2011). De plus, il peut se lier au TNF- $\alpha$  monomérique l'empêchant ainsi de former son trimère biologiquement actif. En interagissant avec le TNF- $\alpha$ , lié au préalable à son récepteur, l'infliximab peut aussi empêcher l'activation des cellules (Chaudhari *et al.*, 2001). En raison de la présence d'un isotype IgG1 dans sa structure, l'infliximab peut également causer la mort ou la lyse anticorps-dépendante des cellules exprimant le TNF- $\alpha$  transmembranaire (ten Hove *et al.*, 2002). L'infliximab est administré par perfusion intraveineuse; le traitement standard nécessitant trois perfusions (5 mg.kg<sup>-1</sup>) sur une période d'induction de six semaines, suivi de perfusions régulières toutes les 8 semaines. Près de la moitié des patients traités par l'infliximab présentent une réduction du PASI  $\geq$  80% après 10 semaines de traitement (Menter *et al.*, 2007). Cette réduction s'accompagne d'améliorations significatives de leur qualité de vie (Feldman *et al.*, 2005). Toutefois, plusieurs études ont rapporté une baisse d'efficacité lors de la deuxième année du traitement continu avec ce médicament (Krathen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006).

#### 1.6.4.3.2 L'adalimumab

L'adalimumab est un anticorps monoclonal humain recombinant de type IgG1 $\kappa$  et de poids moléculaire 148 kDa. En effet, tout comme l'infliximab, l'adalimumab se lie spécifiquement au TNF- $\alpha$  sous forme soluble ou transmembranaire neutralisant ainsi sa

fonction biologique via le blocage de son interaction avec ses récepteurs TNF-R1 et TNF-R2 situés à la surface des cellules (Menter, 2009). L'adalimumab est administré par voie souscutanée, à une dose de 40 mg toutes les deux semaines, suivant une dose d'attaque de 80 mg (Menter *et al.*, 2008). Chez certains patients, on observe une amélioration significative du psoriasis après une semaine de traitement (Gordon *et al.*, 2006). Une étude clinique évaluant l'efficacité de l'adalimumab auprès de 1200 individus ayant un psoriasis en plaques modéré à sévère, a montré que ce médicament pouvait mener à une réduction du PASI de 75% chez 71% des patients après 16 semaines de traitement, alors que 20% des patients avaient une disparation complète des symptômes de la maladie (PASI 100) (Menter *et al.*, 2008). Les avantages cliniques reliés à une réduction du PASI de 75% ou plus, ont été maintenus pendant au moins une année avec le traitement administré en continu. Toutefois, environ 10% des patients ayant initialement répondu au traitement ont cessé de présenter une réponse satisfaisante durant la poursuite du traitement (Menter *et al.*, 2008).

#### 1.6.4.3.3 L'etanercept

L'etanercept est une protéine de fusion ayant un poids moléculaire de 150 kDa constituée de deux portions extracellulaires du TNF-R2 humain p75 (75 kDa) liées au fragment Fc d'une IgG1 humaine. L'etanercept agit en tant qu'antagoniste soluble du TNF- $\alpha$  en mimant les effets de ses inhibiteurs naturels, les sTNF-Rs. De ce fait, ce médicament forme des complexes inactifs avec la cytokine (sTNF ou mTNF), en limitant sa fixation sur ses récepteurs membranaires. L'inhibition compétitive de la liaison du TNF- $\alpha$  à ses récepteurs sur la surface des cellules, bloquerait les réponses cellulaires induites par le TNF, lui rendant biologiquement inactif (Goffe and Cather, 2003). Le traitement par etanercept est généralement instauré à la dose de 50 mg deux fois par semaine, suivi d'une réduction à 25 mg deux fois par semaine après les 12 premières semaines de traitement (Papp *et al.*, 2005). Cette posologie suffit pour obtenir une réduction du PASI de 75% en 24 semaines de traitement chez plus de la moitié des patients et une réduction  $\geq 90\%$  chez un cinquième des patients (Leonardi *et al.*, 2003).

### **1.7 Inconvénients reliés à l'utilisation des traitements antipsoriasiques anti-TNF $\alpha$**

Des sondages auprès des patients psoriasiques ont montré que le taux de non-adhésion aux traitements disponibles atteint 73% (Fouere *et al.*, 2005). Même dans les populations qui estiment que leur maladie et ses répercussions sur leur vie sont graves, jusqu'à deux patients sur cinq ne suivent pas le traitement qui leur a été prescrit (Richards *et al.*, 1999). Ce manque d'observance a généralement été attribué au manque d'effets des traitements disponibles ou à des réactions adverses qui leur sont associées (Ali *et al.*, 2007). Ainsi, le patient, déçu ou découragé, abandonne le traitement ou cesse de le suivre adéquatement, diminuant davantage ses chances de réussite. *Une analyse complète du niveau de satisfaction des patients avec les thérapies actuellement disponibles est présentée à l'annexe 1.*

Bien que les médicaments anti-TNF- $\alpha$  aient démontré une remarquable efficacité thérapeutique, des réactions adverses reliées à leur utilisation ont été reportées dans la littérature incluant : l'apparition des réactions légères au point d'injection, l'augmentation du risque de développer de la tuberculose, le développement de la maladie démyélinisante du système nerveux central etc. (Figure 13) (Chen *et al.*, 2011; Keystone *et al.*, 2011; Sfikakis *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2010). Ceci constitue une limitation importante pour le traitement du psoriasis, surtout en considérant que cette maladie est chronique et qu'elle requiert des traitements à long terme. De ce fait, il est donc impératif de continuer les recherches afin d'identifier de nouvelles molécules faiblement toxiques pouvant diminuer les effets du TNF- $\alpha$  au niveau cutané (Aggarwal *et al.*, 2006).

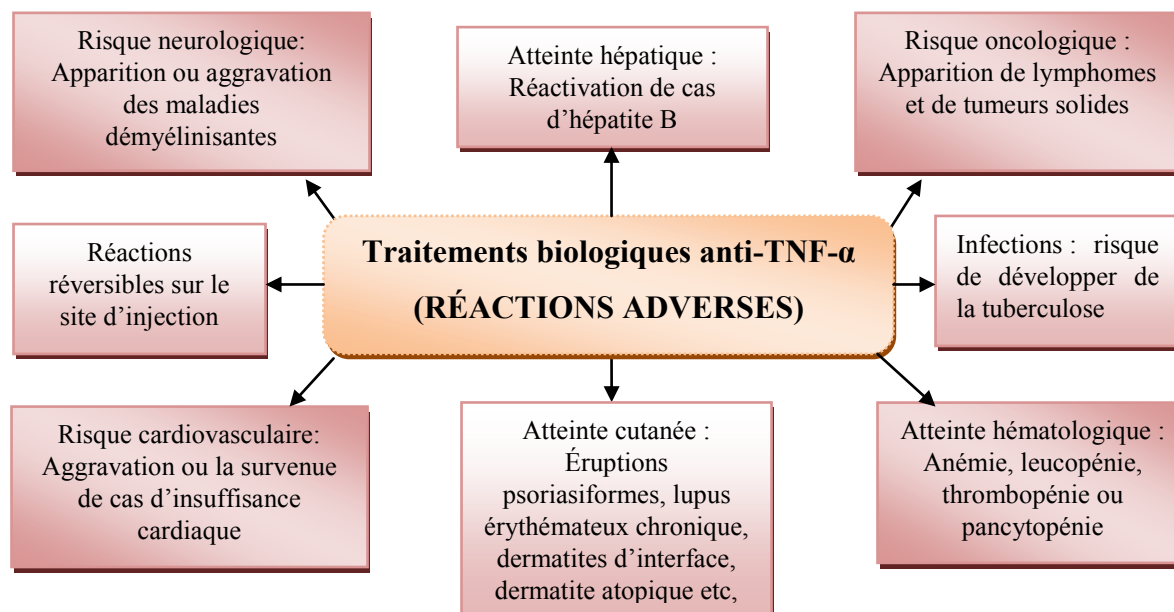


Figure 13 Réactions adverses pouvant apparaître lors d'un traitement avec des agents biologiques anti-TNF- $\alpha$

### 1.8 État d'utilisation des produits naturels à base de plantes pour le traitement du psoriasis

Des sondages réalisés au niveau mondial ont clairement démontré que les patients atteints de psoriasis utilisent fréquemment des produits naturels à base de plantes (Tableau 7). Cela est principalement dû au manque d'effets des traitements conventionnels ou à la survenue d'effets indésirables (Ben-Arye *et al.*, 2003). Toutefois, des problèmes méthodologiques dans les études *in vitro* et *in vivo* utilisant des produits naturels (p.ex. utilisation d'extraits peu caractérisés, utilisation de modèles peu relevant du psoriasis, manque de placebo, nombre insuffisant de patients dans les essais cliniques) n'ont pas permis d'établir l'utilisation de ce type de traitements dans la pratique clinique sur des bases plus rigoureuses.

L'utilisation non négligeable de produits naturels pour le traitement du psoriasis démontre l'importance d'établir des stratégies d'évaluation adéquates de ces produits sur des bases



scientifiques. Cela inclut des études relatives à leur qualité (identité, pureté, quantité et seuils de tolérance), leur innocuité et leur efficacité.

Tableau 7 État d'utilisation des produits naturels pour le traitement du psoriasis d'après des enquêtes effectuées au niveau mondial.

Pays	Nombre des patients psoriasiques qui ont participé au sondage	% de patients prenant des thérapies alternatives, en incluant des produits naturels à base de plantes	Références
Norvège	506	43	(Jensen, 1990)
États-Unis	312	62	(Fleischer <i>et al.</i> , 1996)
Royaume Uni	50	69	(Clark <i>et al.</i> , 1998)
Danemark	1356	34,1	(Zachariae <i>et al.</i> , 2001)
Finlande	1125	23,9	(Zachariae <i>et al.</i> , 2001)
Islande	451	42,1	(Zachariae <i>et al.</i> , 2001)
Norvège	903	26,8	(Zachariae <i>et al.</i> , 2001)
Suède	1828	19,7	(Zachariae <i>et al.</i> , 2001)
Iles Féroé	76	25,6	(Zachariae <i>et al.</i> , 2001)
États-Unis	17 488	43	(Krueger <i>et al.</i> , 2001)
Japon	28 628	14,2	(Kawada <i>et al.</i> , 2003)
Israël	77	62	(Ben-Arye <i>et al.</i> , 2003)
Italie	1689	33	(Altobelli <i>et al.</i> , 2011)
Singapour	94	39	(See <i>et al.</i> , 2011)

### 1.9 Modèles dermopharmacologiques *in vitro* pouvant être utilisés pour étudier des nouveaux traitements antipsoriasiques

*Cette section constitue un survol des différents modèles in vitro pouvant être utilisés pour étudier de nouveaux traitements antipsoriasiques. Une revue complète des modèles in vivo et in vitro présentement disponibles est présentée à l'annexe 2.*

### 1.9.1 Monocouche

Les modèles en monocouche sont des modèles simplifiés permettant d'utiliser des cellules provenant de patients psoriasiques, à savoir des kératinocytes, des fibroblastes ou encore des cellules immunitaires. Bien qu'il ne soit pas possible d'observer les interactions entre plusieurs types cellulaires impliqués dans le psoriasis (p.ex. entre les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules immunitaires), ces modèles permettent d'analyser en détail un type cellulaire en particulier (Jean and Pouliot, 2010). Ainsi, ils ont permis de comprendre l'hyperprolifération et la différenciation aberrante des kératinocytes psoriasiques (van Ruissen *et al.*, 1996). Également ils ont mis en évidence la présence des différences phénotypiques et fonctionnelles entre les cellules psoriasiques par rapport aux cellules normales concernant la production/expression de cytokines, de chimiokines, de molécules d'adhésion et de facteurs de croissance (Giustizieri *et al.*, 2001; Griffiths and Nickoloff, 1989). De plus, ces modèles ont permis d'étudier l'impact des cytokines et des chimiokines sur les réponses des kératinocytes, des fibroblastes et des cellules immunitaires, ce qui a permis de comprendre le rôle de ces médiateurs biochimiques dans la pathogenèse du psoriasis (Giustizieri *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2008).

Les modèles en monocouche sont essentiels pour l'étude du mécanisme d'action pharmacologique de nouvelles molécules sur des voies de signalisation impliquées dans le psoriasis et sont généralement utilisés dans les premières étapes de développement d'un nouveau produit antipsoriasique (George *et al.*, 2010). De ce fait, ils jouent un rôle clé pour établir le potentiel pharmacologique de nouveaux médicaments (Pol *et al.*, 2002a). Toutefois, plusieurs inconvénients sont attribués à ces modèles pour l'évaluation de nouvelles molécules administrées par voie topique, à savoir : a) les concentrations utilisées pour les nouvelles molécules ne correspondent pas aux doses qui seront utilisées lors d'une application réelle sur la peau; b) dans ces modèles la fonction barrière de la peau est absente, donc ils ne tiennent pas compte de la biodisponibilité des nouveaux produits; c) la distribution du nouveau médicament dans les différentes couches qui forment la peau ne peut pas être analysée.

### 1.9.2 Gel de collagène

En 2004, Barker et son équipe ont créé un nouveau modèle utilisant des fibroblastes et des kératinocytes provenant de patients psoriasiques lesquels ont étéensemencés sur un gel de collagène. La peau ainsi reconstruite conservait plusieurs caractéristiques du psoriasis telles que, la prolifération et l'hyperprolifération des kératinocytes, l'augmentation de la concentration de l'IL-6 et l'IL-8 et la surexpression du récepteur CXCR2. De plus, des gènes pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) étaient surexprimés dans ce modèle psoriasique comparativement au modèle fait à partir de cellules saines (Barker *et al.*, 2004).

### 1.9.3 Modèles développés par génie tissulaire

Le génie tissulaire est présentement en plein essor. En fait, cette discipline scientifique combine à la fois l'expertise de la transplantation de cellules, de la science des matériaux et de l'ingénierie pour l'étude des mécanismes physiologiques du vivant en se basant sur la capacité des cellules à s'assembler en un tissu tridimensionnel, en présence ou non de biomatériaux (Moulin *et al.*, 2003).

Depuis quelques années, notre équipe a mis au point un nouveau modèle de substituts cutanés psoriasiques, complètement dépourvu de matériel exogène et ayant la capacité de conserver pendant un certain temps les caractéristiques principales du psoriasis. Ainsi, ces substituts possèdent un taux de prolifération supérieur, une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et une sous ou surexpression de certains marqueurs de différenciation cellulaire comparativement aux substituts sains (Jean *et al.*, 2009). Fait intéressant, ils réagissaient positivement à la présence d'acide rétinoïque, améliorant la prolifération et la différenciation cellulaires tel que ce qui est observé dans la peau psoriasique *in vivo* (Jean *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que ce nouveau modèle pourrait être utilisé dans les étapes initiales du développement de nouveaux produits antipsoriasiques destinés à améliorer la prolifération et la différenciation des kératinocytes.

## 1.10 Les polyphénols

Les polyphénols sont un groupe de composés chimiques très répandu dans le règne des plantes, qui sont représentés par divers types de structures chimiques. On les définit comme

les aromatiques portant plus qu'une fonction hydroxyle sur un ou plusieurs noyaux benzéniques (Stevanovic and Perrin, 2009).

*Dans cette section on présentera la classification des polyphénols ayant un squelette phénylpropane, dont la biosynthèse est étroitement liée à celle des lignines. Une revue concernant la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et celle des flavonoïdes et des lignanes est présentée à l'annexe 3. Cette annexe inclut aussi des sections concernant la distribution des polyphénols dans les ressources forestières aussi bien qu'une révision des propriétés biologiques des flavonoïdes, des stilbènes (resvératrol), des proanthocyanidines et des lignanes.*

### 1.10.1 Classification

#### 1.10.1.1 Les phénols simples, les aldéhydes phénoliques et les acides phénoliques

Les extraits phénoliques sont très variés. Ils sont représentés entre autres par des phénols ayant un squelette C6, C6-C1, C6-C2 ou encore C6-C3 (c.-à-d. un noyau benzénique et une chaîne composée par un, deux ou trois atomes de carbone) (Stevanovic and Perrin, 2009). Ainsi, on retrouve les dérivés C6 dont le squelette de base est formé d'un noyau benzénique. Parmi ces composés le pyrocatéchol, le résorcinol et l'orcinol ont été identifiés dans les aiguilles, les cônes et le bois de différentes espèces. L'hydroquinone (p-dihydroxybenzène) est le diphénol le plus fréquent dans les plantes. On le retrouve dans plusieurs familles (*Ericaceae*, *Rosaceae*) sous forme d'arbutine. Le pyrogallol, un triphénol en ortho, ainsi que le phloroglucinol ont été identifiés dans le séquoia (Figure 14) (Stevanovic and Perrin, 2009).

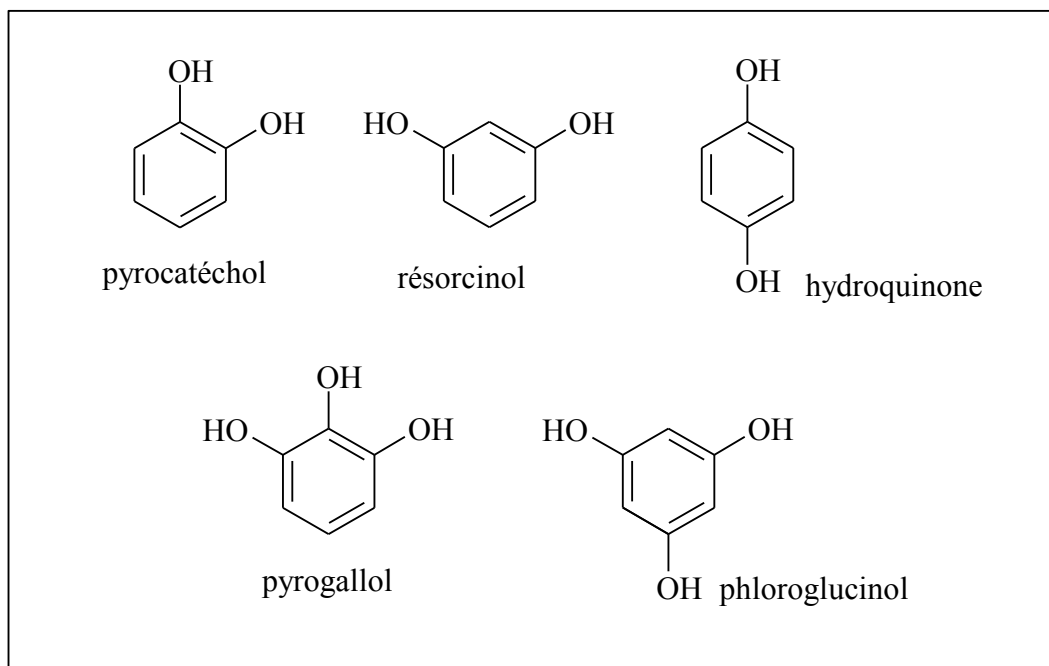


Figure 14 Exemple de polyphénols à squelette C6

Les structures phénoliques C6-C1 constituées d'un noyau benzénique auquel est greffé un atome de carbone sont aussi présentes dans les différents tissus des arbres. Parmi ces composés on retrouve la vanilline et les aldéhydes benzyliques dont le salicylaldéhyde, le p-hydroxybenzaldéhyde (présent dans plusieurs espèces de *Sorghum*), le p-anisaldéhyde et le protocatéchualdéhyde (Stevanovic, 2005). On peut également mentionner les acides phénoliques ayant un squelette C6-C1, dont l'acide salicylique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide gallique, l'acide syringique, l'acide gentistique qui se trouvent sous forme libre ou sous forme d'esters ou de glycosides dans le bois des angiospermes (Stevanovic and Perrin, 2009). L'acide protocatéchuique et l'acide vanillique sont également largement distribués chez les gymnospermes. En effet, ils ont été identifiés dans les aiguilles de *Picea abies* et dans les écorces de *Picea jezoensis* (Figure 15) (Rummukainen *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2009).

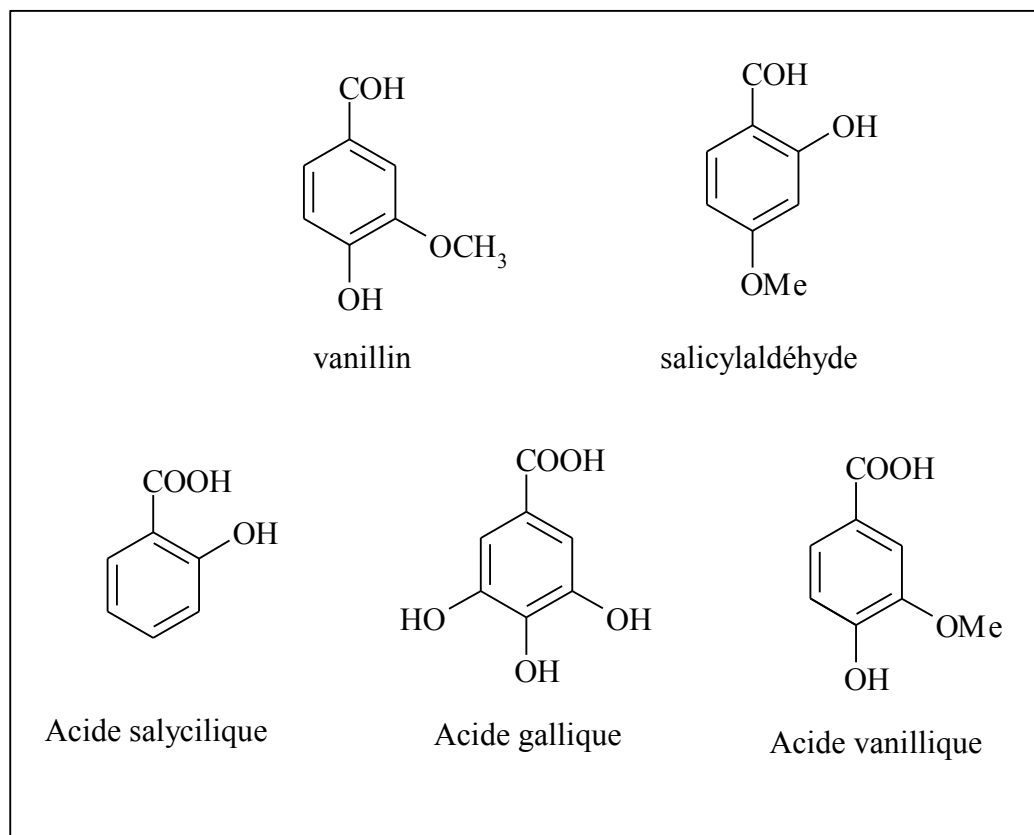


Figure 15 Exemple de polyphénols à squelette C6-C1

Parmi les composés ayant des squelettes C6-C2, les dérivés de l'acide phényl acétique et les acétophénonnes sont les plus importants. Le p-hydroxyacétophénone et l'aglycone de picéine sont retrouvés dans les bourgeons de peuplier (*Populus balsamifera*) et également dans les branches, l'écorce et les racines de divers saules (*Salix*) (Stevanovic and Perrin, 2009). Les dérivés de l'acide cinnamique, les acides hydroxycinnamiques, ont une structure de base de type C6-C3 et sont largement répandus dans les différents tissus des arbres. Parmi ces composés on retrouve l'acide *para*-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique, tous liés directement à la biosynthèse des lignines. L'acide *para*-coumarique a été identifié dans l'écorce de *Picea abies* ainsi que dans les ramilles et feuilles de *Picea neveitchii* (Figure 16) (Pan and Lundgren, 1995; Song *et al.*, 2011).

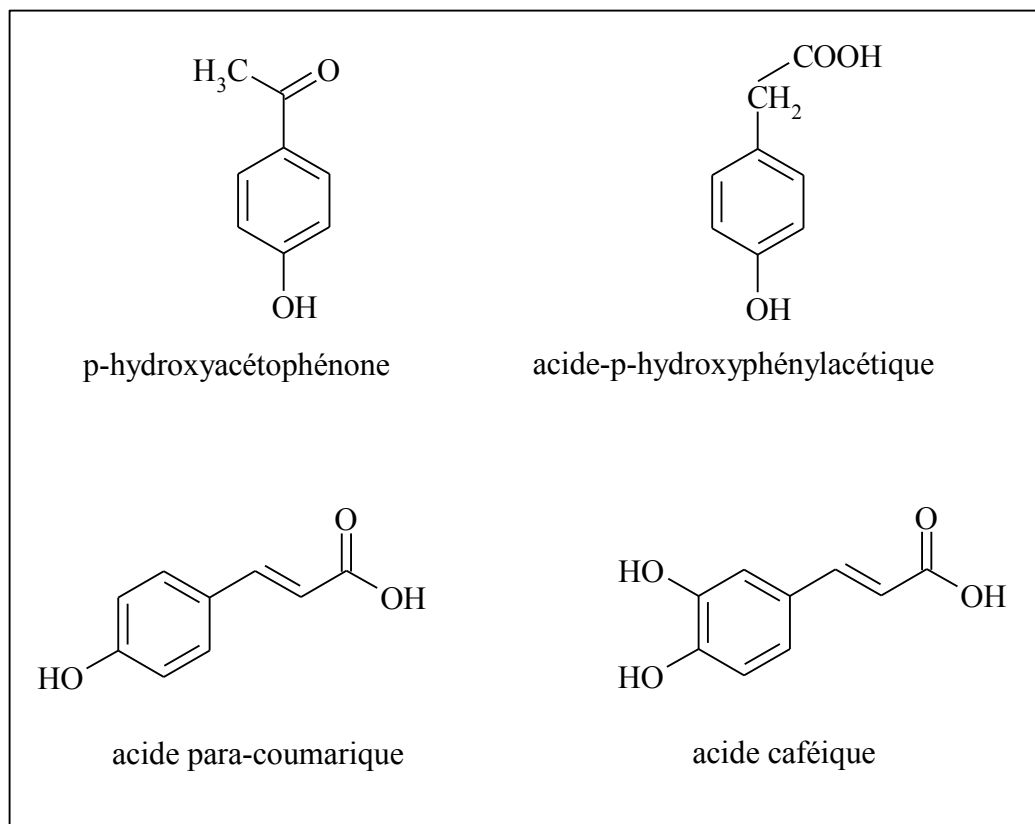


Figure 16 Exemple de polyphénols à squelette C6-C2 et C6-C3

#### 1.10.1.2 Les stilbènes

Les stilbènes sont synthétisés par l'addition de 1 à 3 molécules de malonyl-CoA aux acides cinnamiques, qui dérivent de la voie de biosynthèse des phénylpropanes. Le stilbène est, par définition, le 1,2-diphényléthène. Les stilbènes, quant à eux, représentent les dérivés hydroxylés ou autres du stilbène et sont fréquemment retrouvés dans les plantes. Regroupés avec les bibenzyles, qui ont aussi un squelette C6-C2-C6, ils forment la famille des stilbénoides (Figure 17) (Stevanovic and Perrin, 2009). On attribue aux stilbènes un rôle de fongicides en plus de protéger les arbres contre l'attaque des insectes (Shibutani *et al.*, 2004). On trouve les stilbènes dans les espèces du genre *Alnus* (les ormes) alors que la pinosylvine (3,5-dihydroxystilbène) est un constituant commun du bois de cœur des pins. Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène), un stilbène très reconnu pour ses propriétés anti-inflammatoires, a été identifié dans les épinettes (*Picea* spp.) et dans *Pinus sibirica* (Gromova et al., 1977).

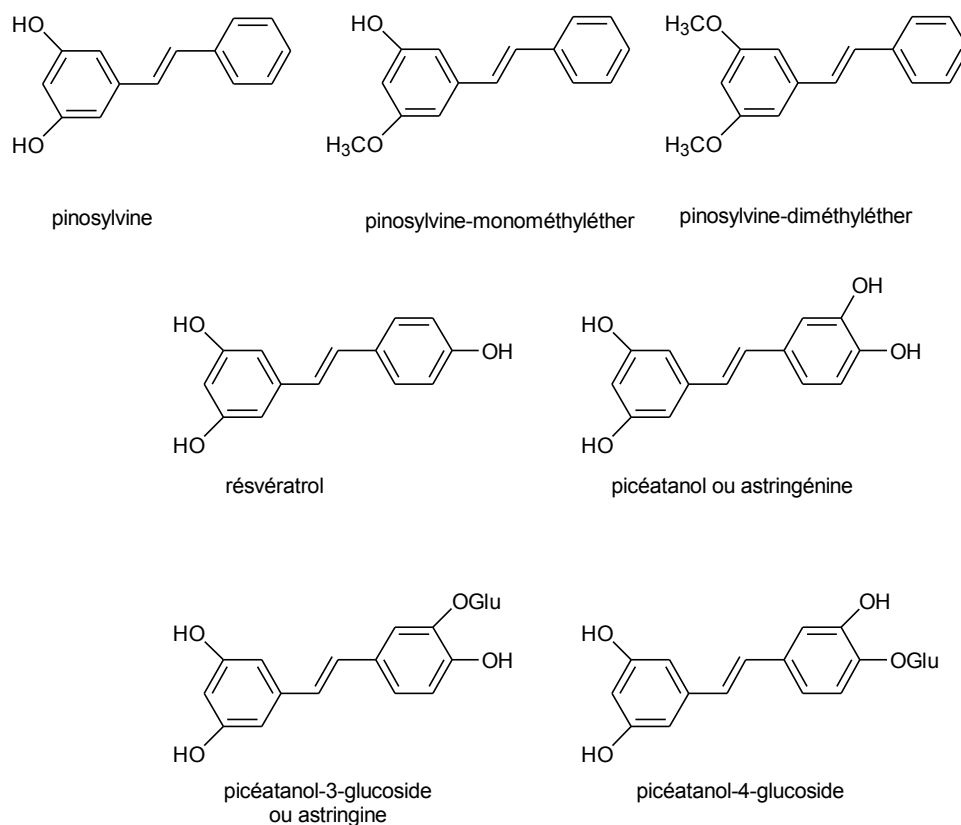


Figure 17 Quelques stilbènes pouvant être retrouvés dans les tissus des arbres. Tirée de Stevanovic and Perrin, 2009

### 1.10.1.3 Les lignanes et neolignanes

Les lignanes et néolignanes sont des dimères naturels du phénylpropane, dont la biosynthèse est contrôlée enzymatiquement et donne des liaisons différentes entre les carbones des chaînes propane. Ainsi, lorsque les unités phénylpropane sont liées par des liaisons C-C au niveau des positions 8 et 8', le composé est considéré comme un lignane (Figure 18). Si les phénylpropanes dimères sont liés autrement que par les liaisons C-C 8-8', il s'agit d'un néolignane (Moss, 2000). Ainsi, on trouve des néolignanes contenant les liaisons 8-O-4', 3-O-4' (oxynéolignanes), 3-3', 8-3', 1-3' etc, (Moss, 2000).



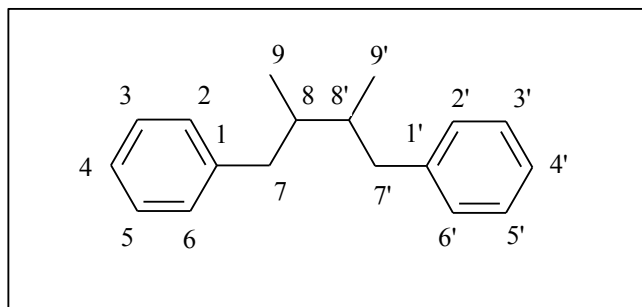


Figure 18 Structure de base des lignanes

Plusieurs types de lignanes sont présents dans le bois d'espèces de résineux appartenant aux genres *Picea*, *Pinus*, *Larix*, *Abies*, *Tsuga*, *Thuja* et *Araucaria*, et dans les feuillus des genres *Alnus*, *Quercus*, et *Populus*. Les bois tropicaux sont aussi riches en lignanes (Stevanovic and Perrin, 2009). En 2003, Willfor et collaborateurs ont identifié plusieurs lignanes dans les nœuds et le bois du tronc de *Picea abies* dont le 7-hydroxymatairésinol, le liovil, le sécoisolaricirésinol, l'alpha-conidendrine et le matairésinol (Figure 19) (Willfor *et al.*, 2003). En général, on considère que le bois de nœuds des résineux contient des quantités importantes de lignanes, beaucoup plus élevées que celles retrouvées dans le bois normal (Anderegg and Rowe, 1974). En effet, une vaste étude effectuée en 2004 ayant pour but de comparer les taux et la composition d'extraits du bois et des nœuds de différents épicéas (*Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Picea sitchensis* et *Picea pungens*) a démontré que les teneurs totales en lignanes dans *Picea abies* et *Picea glauca* ont été comparables, mais qu'elles étaient significativement plus élevées dans le bois des nœuds que dans le bois du tronc. Toutefois, ces teneurs ont été moins élevées pour l'épinette noire (*Picea mariana*) provenant des États-Unis (Willfor *et al.*, 2004). Dans les épicéas étudiés, les lignanes ont été retrouvés sous forme libre, non glycosylés où le 7-hydroxymatairésinol a été identifié comme étant le principal lignane présent dans ces extraits. De nos jours, le hydroxymatairésinol est commercialisé en tant que produit de santé naturel, sous le nom de HMRlignan<sup>TM</sup>.

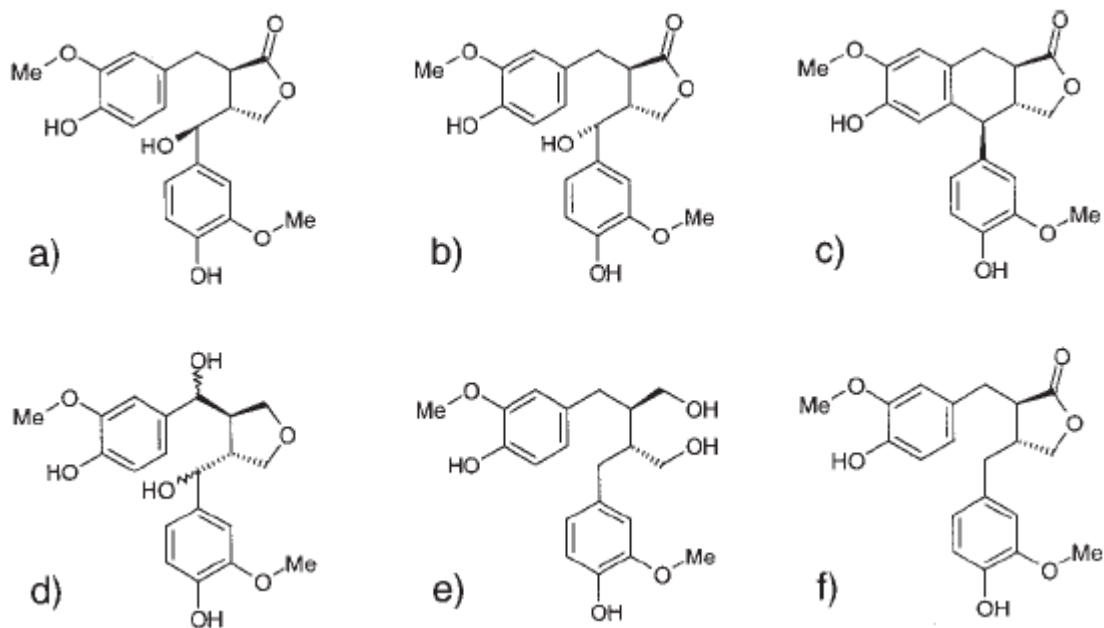


Figure 19 Quelques lignanes identifiés dans les tissus de *Picea abies*. Tirée de Willfor *et al.*, 2003

(a) 7'(S)-hydroxymatairésinol; (b) 7'(R)-hydroxymatairésinol; (c) alpha-conidendrine; (d) liovil; (e) secoisolaricirésinol; (f) matairésinol.

Les lignanes font partie du système de défense chimique de la plante et sont traditionnellement considérés comme des métabolites secondaires du duramen (Stevanovic and Perrin, 2009). Ils sont reconnus pour leur activité phyto-œstrogénique participant à la régulation des taux hormonaux (Aehle *et al.*, 2011). On appelle les phyto-œstrogènes les molécules d'origine végétale qui agissent dans l'organisme comme des hormones naturelles (les œstrogènes), bien qu'avec une moindre puissance. Ainsi, si l'organisme produit trop d'œstrogènes, les phyto-œstrogènes peuvent partiellement bloquer leurs effets négatifs, par contre, s'il y a une déficience, ils peuvent combler une partie des besoins. Les lignanes sont également considérés comme de puissants agents antioxydants et anti-inflammatoires (Pellegrini *et al.*, 2010).

Le (-)-matairesinol est un intermédiaire central de la biosynthèse de nombreux lignanes, dont la podophyllotoxine, un agent antiviral obtenu à partir des rhizomes et des racines de plantes vivaces du genre *Podophyllum* (famille des *Podophyllaceae*) (Xia et al., 2000). La podophyllotoxine est le principe actif du Condyllox<sup>®</sup> ou Condylone<sup>®</sup>, utilisé en clinique pour le traitement des condylomes. De nos jours, la production de podophyllotoxine se fait à partir de l'exploitation d'espèces végétales, ce qui menace progressivement leur survie dans l'habitat naturel (Abrams *et al.*, 2012). Les dérivés semi-synthétiques de la podophyllotoxine (étoposides, téniposides et étopophos) sont présentement utilisés pour le traitement du cancer de poumon et des testicules, des lymphomes, de la maladie de Kaposi etc. (Figure 20) (Gordaliza, 2007).

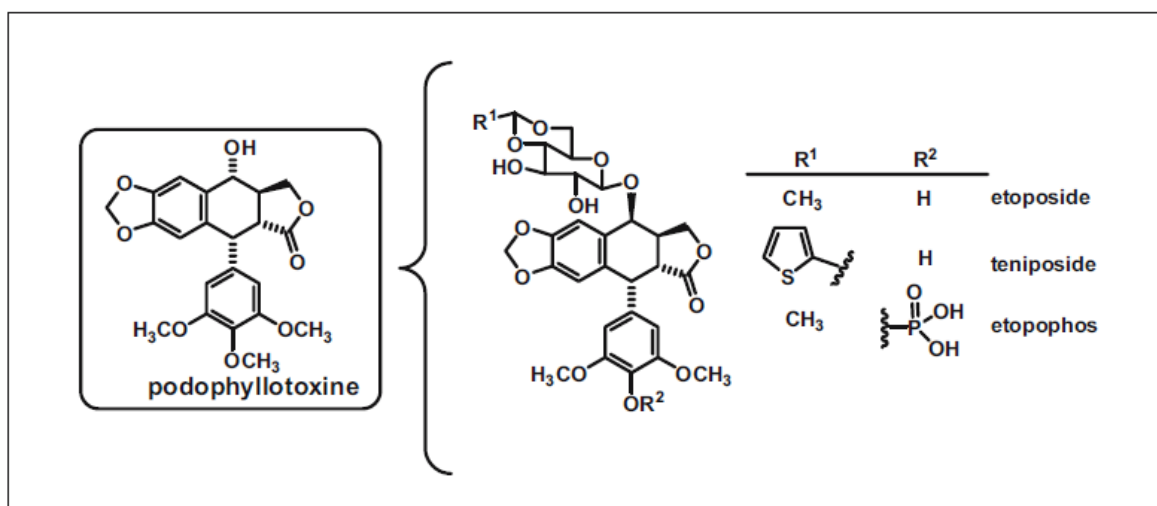


Figure 20 Structure chimique des dérivés semi-synthétiques de la podophyllotoxine, utilisés en clinique comme des agents anticancéreux. Tirée de Gordaliza, 2007

#### 1.10.1.4 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes partagent la même voie de biosynthèse que la lignine et sont représentés par des composés ayant des squelettes C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, c'est-à-dire d'une partie à la base de phénylpropane. En effet, ils sont des molécules largement distribuées dans le règne végétal qui sont couramment consommées sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé (Stevanovic and Perrin, 2009). Leur structure moléculaire est caractérisée par

un squelette carboné de type diphenyl 1,3-propane qui comprend 15 atomes de carbone répartis en deux cycles benzéniques notés A et B reliés entre eux par la structure chromane à trois carbones (C) (Figure 21). Les flavonoïdes jouent un rôle clé dans la pigmentation, la défense chimique contre les prédateurs et la reproduction des plantes (Stevanovic and Perrin, 2009). Plusieurs sous-groupes de flavonoïdes existent selon le degré d'insaturation et d'oxydation de l'hétérocycle à savoir: les flavones, les flavanones, les flavanes et les isoflavones (Figure 21). Les flavonoïdes existent généralement dans la nature sous forme hydroxylée, pouvant également être combinés à diverses molécules (le plus souvent en faisant la partie aglycone de nombreux glycosides), ce qui explique la grande variété de ces composés (Stevanovic and Perrin, 2009). La présence de glucides ou de groupements méthyle sur les hydroxyles phénoliques est très fréquente.

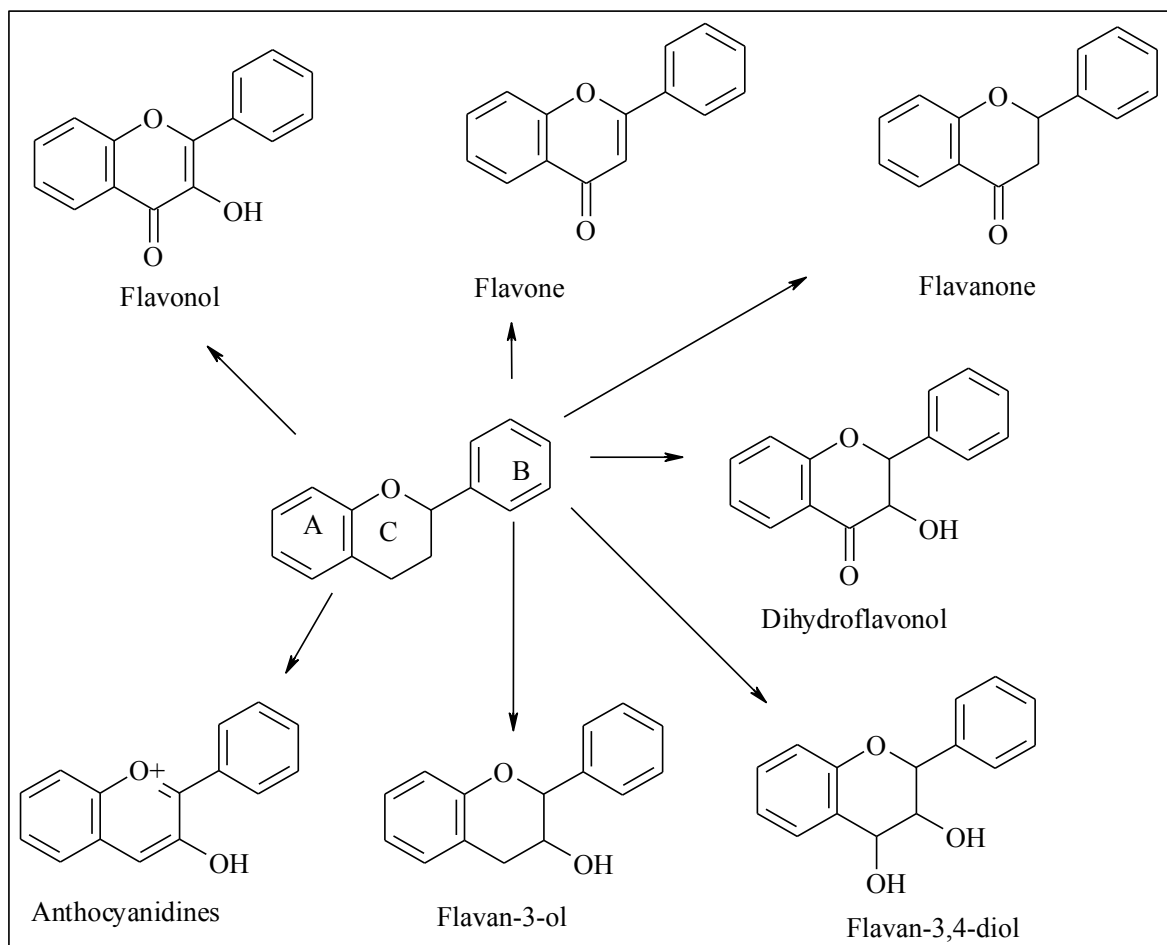


Figure 21 Familles des flavonoïdes

Les glycosides (hétérosides) des flavonols, principalement ceux du kaempférol, de la quercétine et de la myricétine représentent les polyphénols prédominants dans le feuillage des plantes vasculaires. En fait, le kaempférol et la quercétine sous forme libre ou glycosilée ont été identifiés dans différents tissus d'espèces appartenant au genre *Picea et Abies* (Figure 22) (Slimestad, 2003; Song *et al.*, 2011). Les flavonols représentent un des marqueurs du caractère ligneux des plantes. On ne les trouve qu'exceptionnellement dans les algues (Stevanovic and Perrin, 2009).

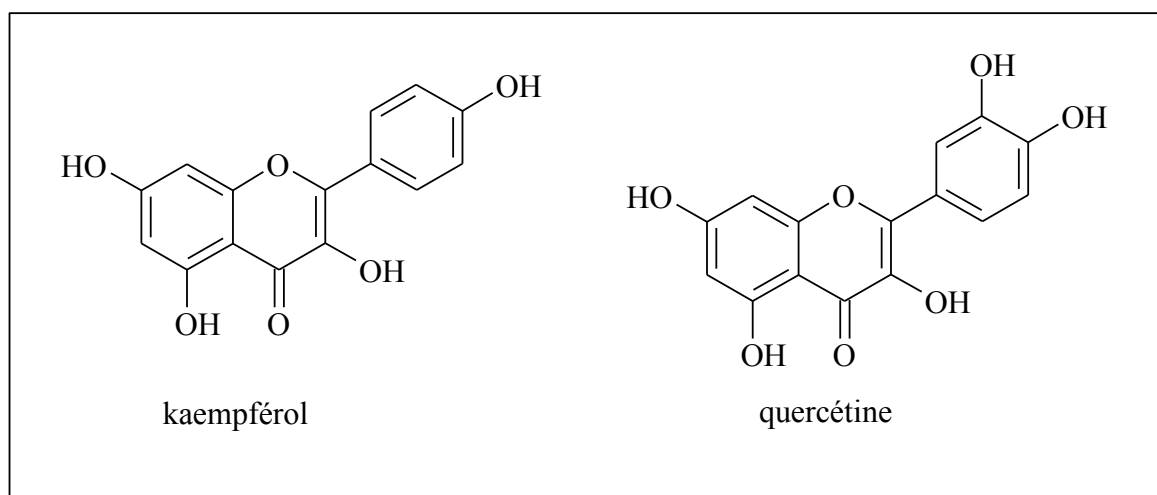


Figure 22 Structure chimique du kaempférol et de la quercétine, fréquemment retrouvés dans les tissus d'espèces appartenant au genre *Picea*

Les anthocyanidines (du grec *anthos*, fleur et *kyanos*, bleu) constituent un des pigments les plus importants des plantes; leur solubilité dans l'eau les distingue des pigments lipophiles tels que la chlorophylle et le  $\beta$ -carotène. Ils sont responsables des teintes bleues, mauves, violettes, rouges, écarlates et oranges brillants des plantes supérieures (Stevanovic and Perrin, 2009). L'hydroxylation du cycle A des anthocyanidines est toujours de type 5,7-dihydroxy, tandis que le cycle B est hydroxylé en 4' et les substituants sur les carbones 3' et 5' varient selon le composé (Stevanovic and Perrin, 2009). Les anthocyanines, quant à elles, sont des glycosides d'anthocyanidines; étant donc solubles dans l'eau. Bien que pour la plupart des flavonoïdes, la chaîne aliphatique propane soit incluse dans un hétérocycle pyrane, il existe aussi d'autres molécules pour lesquelles cette chaîne présente des squelettes différents à savoir: les chalcones, les aures et les isoflavones (Figure 23).

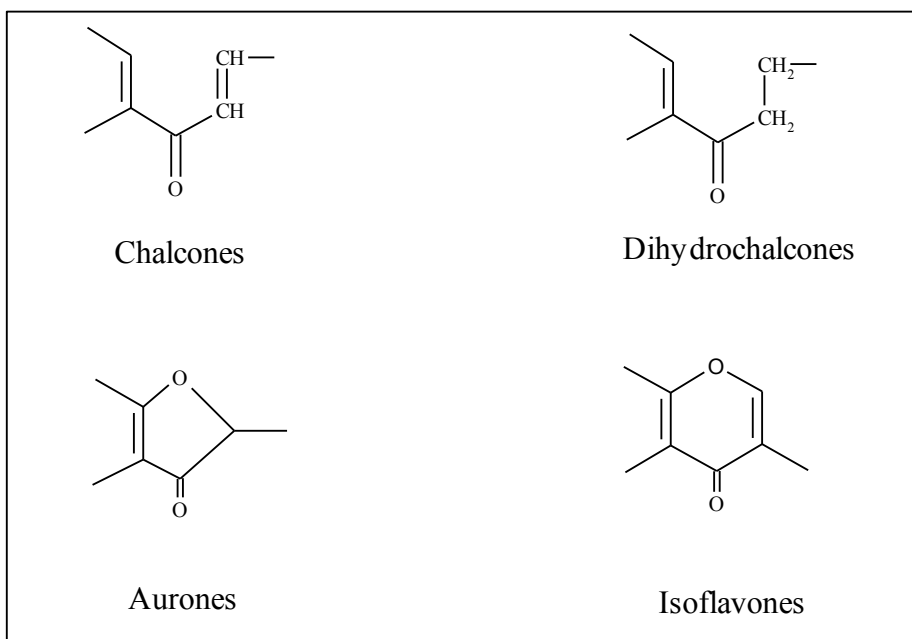


Figure 23 Structure et nomenclature de flavonoïdes à squelette propane

#### 1.10.1.5 Les tannins

Les tannins ou tanins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau, dont les masses molaires se situent entre 500 et 3000 Da. En plus de présenter les réactions caractéristiques des phénols, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Bate-Smith, 1962). Cette réactivité avec les protéines est à l'origine des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau au cours de sa transformation en cuir. Les tannins sont très répandus dans le règne végétal, leur teneur et leur nature varient d'une espèce à l'autre. On distingue, d'après leur structure et leurs propriétés, deux types de tannins: les tannins hydrolysables et les tannins condensés. Ainsi, alors que les tannins condensés sont présents dans la plupart des plantes vasculaires, les tannins hydrolysables sont généralement limités aux dicotylédones (Stevanovic and Perrin, 2009).

De nos jours, il est reconnu que le rôle biologique des tannins dans les plantes est surtout lié à la protection contre les infections, les insectes ou bien encore contre les herbivores (Aron and Kennedy, 2008). Ces différentes propriétés sont principalement reliées à leurs capacités à interagir avec les protéines, à chélater les métaux et à leur activité antioxydante

(He *et al.*, 2008). Ces trois capacités combinées à leurs effets anti-inflammatoires et antiprolifératifs sont également à l'origine des effets bénéfiques des tannins sur la santé humaine (Afaq and Katiyar, 2011).

#### 1.10.1.5.1 Les tannins hydrolysables

En général, les tannins hydrolysables ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tannins condensés. Les tannins hydrolysables sont caractérisés par une partie centrale qui est constituée d'un polyol (le plus souvent le glucose) dont les fonctions hydroxyles sont estérifiées avec l'acide gallique. On dénombre deux types de tannins hydrolysables: a) les gallotannins qui libèrent de l'acide gallique et leurs dérivés galloylés (depsides) et b) les ellagitannins qui libèrent par hydrolyse de l'acide gallique ainsi que les acides ellagique, hexahydroxydiphénique, valonique etc. (Stevanovic and Perrin, 2009) (Figure 24).

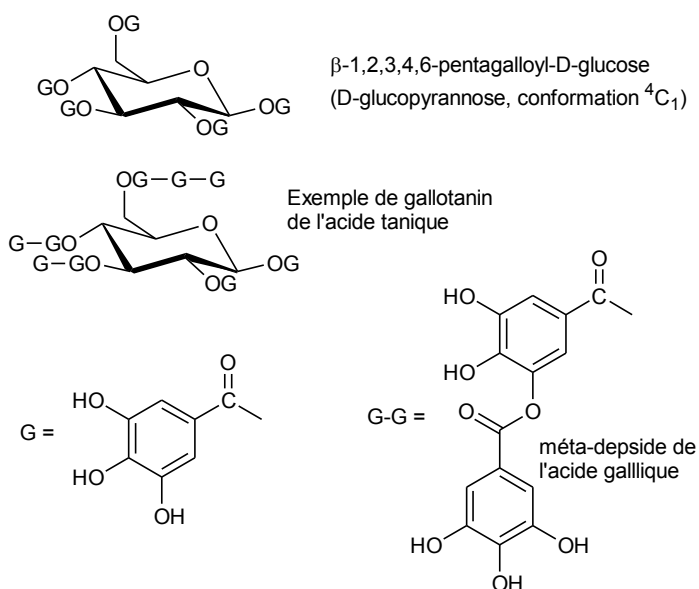


Figure 24 Exemples de gallotannins. Tirée de Stevanovic and Perrin, 2009

Les gallotannins sont définis comme des polyesters galloylés du glucose. La transition des gallotannins simples vers les gallotannins complexes se fait par ajout de divers résidus galloyle au pentagalloylglucose pour former des groupes depside caractéristiques (Niemetz and Gross, 2005).

Les tannins ellagiques sont par définition les esters de l'acide hexahydroxydiphénique et du glucose. Ces esters sont produits par couplage oxydatif des esters galliques avec formation de nouvelles liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène, et aussi par des ruptures oxydatives et hydrolytiques des cycles aromatiques (Stevanovic and Perrin, 2009). Les ellagitannins sont très répandus dans les dicotylédones ligneuses où ils se trouvent fréquemment accompagnés par les gallotanins. Les ellagitannins peuvent être retrouvés dans les coupules de *Quercus valonea*, dans les gousses de *Caesalpinia brevifolia* (Algarobila) et dans le bois de cœur de châtaignier (*Castanea sativa* et *Castanea dentata*) et de chêne (*Quercus robur*). De même, le bois d'eucalyptus contient des tannins hydrolysables de type ellagique (Stevanovic and Perrin, 2009).

#### *1.10.1.5.2 Les tannins condensés ou proanthocyanidines*

Les proanthocyanidines ou tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols et de flavan-3,4-diols. Leur nom, proanthocyanidines, est dû au fait qu'ils forment, suite à la dégradation par l'acide chlorhydrique en milieu alcoolique, des pigments anthocyaniques de coloration rouge, incluant la cyanidine et plus rarement la delphinidine (Stevanovic and Perrin, 2009). Les proanthocyanidines peuvent être classés en deux catégories selon leur degré de polymérisation d'unités monomériques: les oligomères (allant des dimères aux pentamères) et les polymères (à partir des hexamères) (Stevanovic, 2005).

La diversité des unités monomères et le type de liaisons interflavanes liant les monomères entre eux, entraînent un nombre considérable de proanthocyanidines différentes. Suivant le nombre et la position des groupes hydroxyles que l'on trouve sur le noyau flavanol, on distingue différentes classes de proanthocyanidines (Hemingway *et al.*, 1982): les procyanidines, les prodelphinidines, les profisetinidines, les prorobinetinidines, les proguibourtinidines, les proteracacinidines, les proapigenidines, les proluteolinidines, les protricinidines, les propelargonidines et d'autres minoritaires (Figure 25).



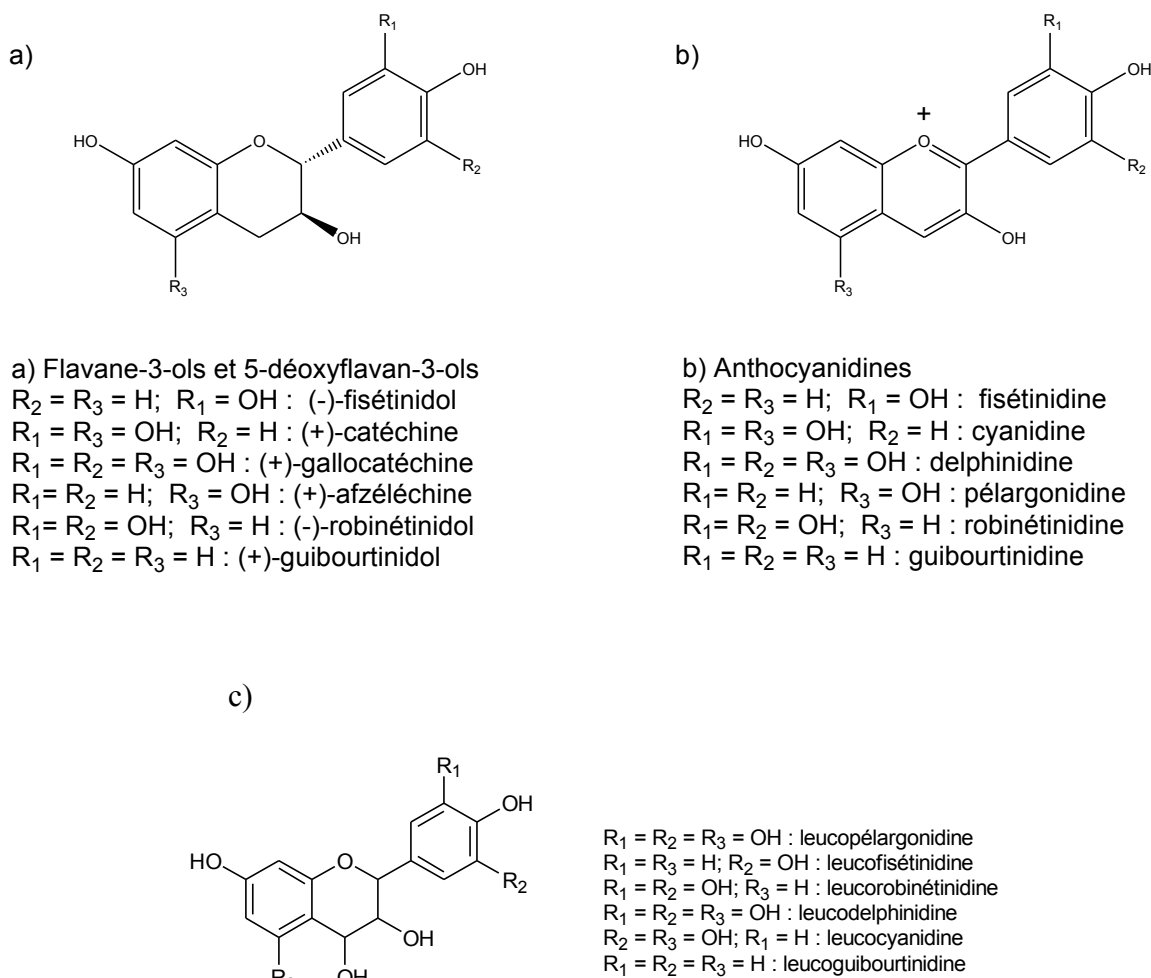


Figure 25 Unités des tanins condensés. Tirée de Stevanovic and Perrin, 2009

(a) flavan-3-ols et 5-déoxyflavan-3-ols; (b) anthocyanidines; (c) flavan-3,4-diols ou leucoanthocyanidines.

Les procyanidines, sont des oligomères et des polymères constitués d'unités flavan-3-ols. Les deux unités monomériques les plus abondantes étant la (+)-catéchine et la (-)-epicatéchine. Cette dernière peut aussi être présente sous forme estérifiée par l'acide gallique. Concernant les dimères, deux types de procyanidines peuvent être rencontrés: Les procyanidines de type B qui résultent de la condensation de deux unités flavan-3-ol liées entre elles par une liaison inter monomérique de préférence de type C4-C8 et les procyanidines de type A qui sont liées de préférence par des liaisons C4-C6 et qui possèdent en plus une liaison éther entre l'oxygène portée par les carbone C5 ou C7 de

l'unité terminale et le carbone C2 de l'unité supérieure. Les procyanidines de types A, moins abondantes que celles de types B peuvent être obtenues à partir de ces dernières via une oxydation intramoléculaire. Les tannins condensés ont été longtemps nommés leucoanthocyanidines par référence à leur absence de coloration. On réserve actuellement ce nom aux flavan-3,4-diols (Stevanovic and Perrin, 2009).

### **1.11 Méthodes d'extraction des polyphénols dans des matrices végétales**

L'extraction des polyphénols à partir des plantes est un processus qui requiert des soins particuliers afin de protéger l'intégrité de ces molécules. Ainsi, l'obtention de rendements d'extraction élevés dépendra en partie des précautions prises pendant la manipulation afin d'éviter l'oxydation et l'isomérisation pouvant survenir dans les échantillons naturels (Antolovich *et al.*, 2000). L'addition d'antioxydants pendant l'extraction et l'utilisation de températures basses et d'atmosphères inertes ont été proposées afin de protéger les polyphénols contre l'oxydation, la dégradation thermique et d'autres changements chimiques, physiques et biochimiques (Antolovich *et al.*, 2000). Le but est de garantir la fidélité entre le profil phénolique du produit naturel de départ et celui de l'extrait obtenu.

En général, on considère que le choix de la méthode d'extraction dépendra principalement de la nature des composés qu'on vise extraire (par ex. flavonoïdes, acides phénoliques, tannins, etc.) (Antolovich *et al.*, 2000). De nos jours, il existe plusieurs techniques qui sont utilisées pour l'extraction des polyphénols. La macération, reconnue comme une méthode traditionnelle, a été couramment employée (Budic-Leto *et al.*, 2005; Spigno and Faveri, 2007). Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. De plus, elle se déroule à température ambiante, ce qui permet de conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques susceptibles de changer sous l'influence de la température. L'extraction au Soxhlet, combinée avec des techniques de percolation et d'immersion a aussi été largement employée afin d'obtenir des rendements importants de polyphénols (Al-Bandak and Oreopoulou, 2007; Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2003). Cette méthode est très appréciée car elle permet de faire des extractions en continu tout en restant simple et relativement peu coûteuse. Cependant, les manipulations séquentielles, les longs temps

d'extraction et le travail à des températures d'ébullition peuvent constituer des inconvénients.

L'extraction assistée par ultrasons est une autre technique fréquemment employée qui utilise des solvants liquides (Proestos and Komaitis, 2006). À l'intersection des deux principes de base, soit celui des ultrasons et celui des extractions, il est possible de considérer l'interaction des ondes ultrasoniques sur les performances d'extraction de composés organiques présents dans les plantes. Les ultrasons possèdent plusieurs avantages dont celui de briser les parois cellulaires des organismes végétaux ainsi que celui de provoquer des effets de capillarité dans la matière végétale (Lavoie and Stevanovic, 2007).

L'extraction en phase solide (EPS) constitue aussi une autre option rapide et économique puisqu'elle réduit de manière significative le volume des solvants requis. Elle est utilisée dans le but d'extraire les composés à partir d'une matrice liquide ou comme complément à l'extraction par solvants (Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2003). L'EPS peut également être utilisée comme méthode de fractionnement et/ou purification. En effet, l'extraction en phase solide avec des cartouches C18 a été régulièrement utilisée pour l'extraction sélective d'acides phénoliques et de flavonoïdes présents dans les vins rouges (Pinelo *et al.*, 2006), le jus de canneberge (Ferguson *et al.*, 2004) et les pommes (OhnishiKameyama *et al.*, 1997). Elle a également permis d'identifier les composés benzéniques volatils (en incluant les composés phénoliques) présents dans plusieurs types de bois (Flamini *et al.*, 2007).

L'extraction en utilisant différents pH a aussi été utilisée dans le but d'extraire sélectivement des composés phénoliques ayant des solubilités différentes. C'est ainsi que ce type d'extraction a été employé afin d'extraire des composés phénoliques du vin (Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2003). Pour ce faire, l'alcool du vin a premièrement été évaporé à une température inférieure à 30 °C en vue de préserver l'intégrité des polyphénols susceptibles de se dégrader sous l'influence de la température. Subséquemment, le pH des échantillons a été ajusté à 7 et une extraction au chloroforme a permis d'obtenir les composés lipophyliques présents dans l'extrait. Les composés phénoliques plus polaires ont été ultérieurement recueillis par ajustement de la phase aqueuse à pH 6 suivi d'une autre extraction au chloroforme (Escribano-Bailón and Santos-

Buelga, 2003). Bien que ce type d'extraction ait été employé de manière reproductible pour séparer les acides phénoliques, la catéchine et les dihydrochalcones, les faibles rendements d'extraction ont limité son utilisation.

L'extraction liquide supercritique a acquis ces dernières années beaucoup d'essor. L'avantage principal de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pour l'extraction (Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2003). La basse viscosité des fluides supercritiques confère une capacité élevée pour la diffusion permettant l'accès du solvant aux composés phénoliques liés aux parois cellulaires. En outre, tous les processus de dégradation possibles, tels qu'oxydations ou isomérisations, sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit et que le processus d'extraction peut être suivi en absence de lumière et d'air (Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2003). Cette technique a été utilisée avec l'éthanol pour l'extraction de polyphénols provenant du raisin (Chafer *et al.*, 2005) et des oignons (Martino and Guyer, 2004). De plus, elle a été utilisée pour obtenir un haut rendement de polyphénols à partir des sous-produits de l'industrie vinicole (Louli *et al.*, 2004). Toutefois, cette technique présente un inconvénient relié à la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui est le solvant d'extraction le plus utilisé, ce qui génère une haute sélectivité d'extraction ne permettant pas de solubiliser les composés phénoliques plus polaires. Dans plusieurs cas, pour obtenir des rendements plus élevés, il est nécessaire d'ajouter des solvants plus polaires ou d'effectuer des changements chimiques aux composés qui seront extraits afin de diminuer leur polarité. L'extraction assistée par micro-ondes, quant à elle, est une nouvelle technique qui combine l'utilisation de la micro-onde et d'autres méthodes d'extraction traditionnelles. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que la réduction du temps d'extraction, l'utilisation de faibles quantités de solvants et l'obtention des rendements d'extraction élevés (Hemwimon *et al.*, 2007; Kiss *et al.*, 2000).

Il est possible de constater que les solvants jouent un rôle très important dans plusieurs méthodes d'extraction préalablement énoncées. De ce fait, lors des extractions aux solvants, il est nécessaire de tenir compte des facteurs qui pourraient influencer l'efficacité de l'extraction, à savoir: la nature du solvant, le pH du milieu d'extraction, la température aussi bien que la taille et la forme des particules (Antolovich *et al.*, 2000). Compte tenu que

les extraits polyphénoliques peuvent faire partie des produits de santé naturels, il est également essentiel d'utiliser des solvants considérés comme admissibles sur le plan toxicologique (Directive sur les solvants résiduels, 1999). En fait, certains solvants sont connus pour leur toxicité inacceptable (Tableau 8, classe 1), tandis que d'autres sont associés à une toxicité moindre (Tableau 8, classe 2) et doivent être utilisés avec prudence en vue de protéger les patients des réactions secondaires. Finalement, il y a des solvants faiblement toxiques, qui doivent être utilisés en respectant les bonnes pratiques de fabrication. Ces solvants sont privilégiés lors de l'obtention d'extraits naturels qui feront partie intégrante de la formulation de nouveaux produits de santé naturels (Tableau 8, classe 3).

Tableau 8 Classification des solvants selon l'évaluation du risque. Tiré de Directive sur les solvants résiduels. Santé Canada, 1999

<b>Classe 1 (solvants à éviter)</b>	<b>Classe 3 (solvants faiblement toxiques)</b>
Benzène	Acétate d'éthyle
Tétrachlorure de carbone	Acétate de méthyle
1,2 Dichloroéthane	Acétate de butyle
1,1 Dichloroéthène	Acétate d'isopropyle
1,1,1 Trichloroéthane	Acétate d'isobutyle
	Acétate de propyle
	Acétone
	Acide formique
<b>Classe 2 (solvants à limiter)</b>	Anisole
Acétonitrile	Butan-1-ol
Chlorobenzène	Butan-2-ol
Chloroforme	Cumène
Cyclohexane	Diméthylsulfoxyde
1,2 Dichloroéthène	Éthanol
Dichlorométhane	Éther de tert-butylméthyle
1,2 Diméthoxyéthane	Éther éthylique
N,N Diméthylacétamide	Formate d'éthyle
N,N Diméthylformamide	Heptane
1,4 Dioxane	Méthyléthylcétone
2-Ethoxyéthanol	Méthylisobutylcétone
Éthylèneglycol	Méthylisobutylcétone
Formamide	2-Méthylpropan-1-ol
Hexane	3-Méthylbutan-1-ol
Méthanol	Pentan-1-ol
2-Méthoxyéthanol	Pentane
Méthylbutylcétone	Propan-2-ol

Méthylcyclohexane	Propan-1-ol
N-méthylpyrrolidone	Tétrahydrofurane
Nitrométhane	
Pyridine	
Sulfolane	
Tétraline	
Toluène	
1,1,2 Trichloroéthène	
Xylène	

Bien qu'il puisse exister plusieurs solvants permettant d'extraire les polyphénols, les plus utilisés jusqu'à maintenant sont l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle (Tableau 9). En effet, la présence de sucres liés aux polyphénols, les rendent très solubles dans l'eau. Par conséquent, les combinaisons de solvants avec l'eau s'utilisent fréquemment dans le but d'extraire les glycosides. Les aglycones, quant à elles, sont plus solubles dans les solvants apolaires (Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2003). Les mélanges acétone/eau sont très utilisés afin d'extraire plusieurs types de polyphénols (Goni and Serrano, 2005). En 2006, Turkmen et collaborateurs ont analysé l'efficacité de divers solvants par rapport aux rendements d'extraction de polyphénols du thé noir. L'acétone 80% a montré les meilleurs résultats tandis que l'eau a eu une efficacité plus faible que celle des solutions alcooliques (Turkmen *et al.*, 2006). L'acétate d'éthyle, quant à lui, a été utilisé pour l'obtention d'extraits riches en acides phénoliques, flavonoïdes et anthocyanines (Ignat *et al.*, 2011). Ce solvant est également employé pour la purification d'extraits bruts, permettant d'obtenir des fractions enrichies en flavonoïdes et en proanthocyanidines oligomères (Diouf *et al.*, 2009; Rosales-Castro *et al.*, 2011). Le méthanol 70-80% a donné d'excellents rendements d'extraction de flavones, flavonoles et catéchines à partir de fruits (Bocco *et al.*, 1998) et de légumes (Escarpa *et al.*, 2002). En fait, lorsque mélangé avec l'eau (50:50 v:v), il est capable d'extraire plus efficacement les polyphénols liés aux matrices fibreuses polaires que l'acétone (Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2003). Toutefois, son utilisation est restreinte à cause de sa toxicité (Ignat *et al.*, 2011).

Tableau 9 Solvants fréquemment utilisés pour l'extraction des polyphénols. Modifié d'Ignat *et al.*, 2011

Composés phénoliques	Solvants
Acides phénoliques, flavonols et anthocyanines	Acétate d'éthyle
Anthocyanines, acides phénoliques, catéchines, flavanones, flavones, flavonols, procyanidines, acide ellagique	Méthanol et ses mélanges avec l'eau (50-90% v:v)
Anthocyanines, flavonols, acides phénoliques	Éthanol et ses mélanges avec l'eau (10-90% v:v)
Lignanes, flavonols, acides phénoliques	Éther diéthylique
Proanthocyanidines, flavonoïdes, stilbènes, acides phénoliques	Eau chaude (80-100 °C)
Tannins, acides phénoliques	NaOH (2 N-10 N)
Acides phénoliques	Éther de pétrole
Flavonols, acides phénoliques	Acétone-Eau (10-90% v:v)
Flavonols, acides phénoliques, phénols simples, anthocyanines	n-Hexane, iso-octane, acétate d'éthyle

## 1.12 Les polyphénols et le genre *Picea*

### 1.12.1 Le genre *Picea*

Le genre *Picea* comprend une quarantaine d'espèces réparties sur l'hémisphère nord connues sous le nom d'épicéas (Europe) ou d'épinettes (Québec). Au Canada, on compte 9 espèces du genre *Picea*. Trois d'entre elles étant indigènes au Québec, à savoir: l'épinette blanche (*Picea glauca*), l'épinette noire (*Picea mariana*), et l'épinette rouge (*Picea rubens*). En effet, l'épinette noire (*Picea mariana*) constitue l'essence résineuse la plus répandue dans les forêts canadiennes (Figure 26) (Royer *et al.*, 2010).

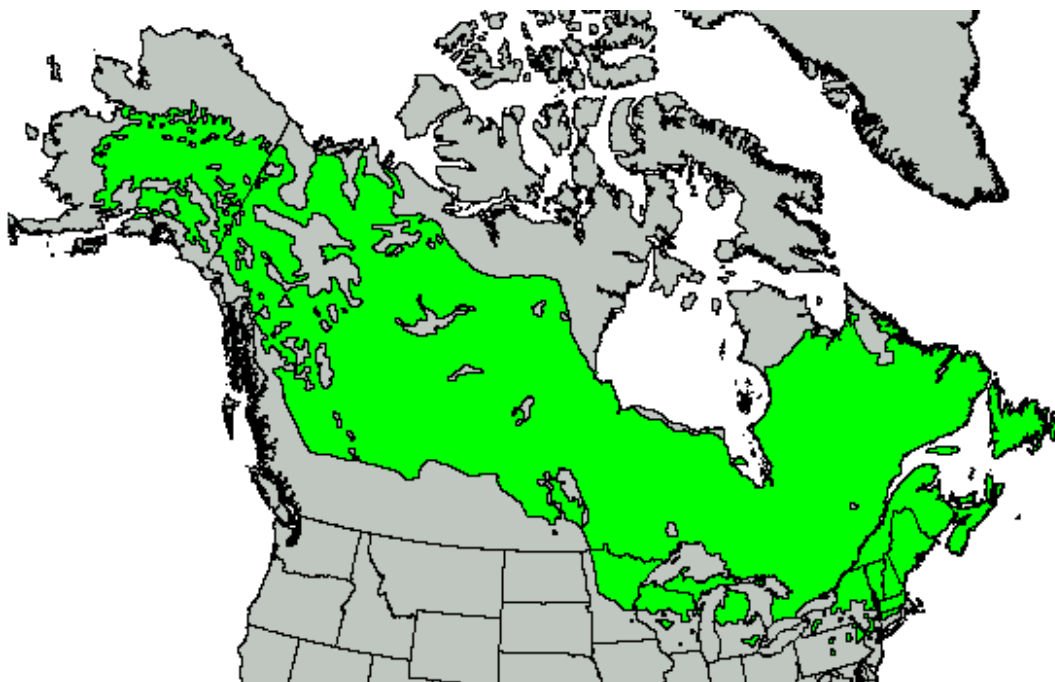


Figure 26 Distribution de l'épinette noire (*Picea mariana*) au Canada et aux États-Unis.

Tirée de [http://www.conifers.org/pi/Picea\\_mariana.php](http://www.conifers.org/pi/Picea_mariana.php)

#### 1.12.2 Utilisation traditionnelle de divers tissus de l'épinette noire (*Picea mariana*)

Il existe peu d'informations disponibles par rapport aux propriétés médicinales des essences appartenant au genre *Picea* au Canada. L'étude ethnopharmacologique la plus représentative est celle effectuée par Arnason en 1981 (Arnason *et al.*, 1981). Le tableau 10 montre l'ensemble des données regroupées par Arnason et par d'autres sources bibliographiques existantes concernant les utilisations traditionnelles de l'épinette noire. Ainsi, il est possible de constater que plusieurs tissus de cette essence ont été utilisés par différentes cultures (Algonquins, Potawatomis, Cris et esquimaux du Nord du Québec) pour le traitement d'affections cutanées. Les utilisations traditionnelles des divers tissus donnent des pistes intéressantes permettant de cibler les extractibles bioactifs ayant un potentiel pour le développement de produits pharmaceutiques et/ou de santé naturels (Royer *et al.*, 2010).



Tableau 10 Utilisations traditionnelles de différents tissus de l'épinette noire. Modifié de Royer *et al.*, 2010.

Culture	Tissu utilisé	Méthode d'administration	Propriétés thérapeutiques attribuées	Références
Ojibwas	Feuilles	Thé Broyées et appliquées	Tonifiant, douleurs dorsales Maux de tête	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Ojibwas	Résines	Gomme	Laxatif	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Ojibwas	Écorces	Broyées (chauffées et inhalées)	Douleurs dorsales	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Ojibwas	Écorces et racines	Thé	Maux d'estomac, faiblesse générale	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Ojibwas	Aiguilles et écorces	-	Stimulants et toniques	(Reagan, 1928)
Algonquins	Aiguilles	Thé	Améliorer l'état de santé	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Algonquins	Résines	Gomme	Désinfectant Laxatif	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Algonquins	Résines	Baume	Après l'accouchement	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Algonquins	Branches	Infusion	Guérir l'intérieur	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Potawatomis du Wisconsin	Écorce interne	Pâte	Inflammations cutanées	(Smith, 1933)

Montagnais	Ramilles	Décoction	Remède contre la toux et maux de gorge	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Micmac	Écorces	-	Maux de gorge	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Cree	Résines	Pâte	Traitement des plaies, coupures ou brûlures infectées	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Cree	Résines	Gomme	Maux de gorge et ventre	(Arnason <i>et al.</i> , 1981)
Cree	Cônes	Décoction	Diarrhées, infections des yeux, de la bouche, de la gorge ou des dents	(Bérubé-Gagnon, 2006)
Cree	Bourgeons et les extrémités des branches	-	Effet tonique et pour la prévention de problèmes cardiaques	(Lamont, 1977)
Les Esquimaux du Nord du Québec	Résine	Pommade de graisse et de la gomme	Traitement des plaies pustuleuses	(Bérubé-Gagnon, 2006)
	Résine	Décoction de la gomme ou d'aiguilles	Infections respiratoires	(Bérubé-Gagnon, 2006)

### 1.12.3 Caractérisation des polyphénols dans les écorces d'essences appartenant au genre *Picea*

Les composés polyphénoliques représentent une des principales classes de composés présentes dans les écorces d'essences appartenant au genre *Picea*. Pourtant, la plupart des études retrouvées dans la littérature proviennent de l'Europe où l'essence la plus étudiée est

de loin l'épinette de Norvège (*Picea abies*) (Royer *et al.*, 2010). Certains travaux menés en Finlande ont déterminé les taux d'extractibles des écorces de *Picea abies* sur base de la masse d'écorce sèche, en fonction (a) du type d'écorces, (b) du solvant utilisé et enfin (c) de la saison de récolte. Ainsi, il est possible de constater que la composition de l'écorce externe de cette espèce diffère significativement de celle de l'écorce interne (Tableau 11).

Tableau 11 Rendement en extractibles dans les écorces de l'épinette de Norvège (*Picea abies*). Tiré du final report. Wood material science and engineering research program, 2007

Solvant	Écorces récoltées		Écorces récoltées		Composés majoritaires
	en hiver		en été		
	(rendement %)		(rendement %)		
	Interne	Externe	Interne	Externe	
Éther de pétrole	4,0	3,1	1,8	5,2	Acides résiniques, acides gras,
Dichlorométhane	1,2	1,4	0,6	2,6	Terpenoïdes
Acétone	15,1	7,0	17,6	7,9	Glucosides des stilbènes, tannins
Eau	12,3	7,0	10,0	6,8	Glucose, fructose, sucrose
Acétone/Eau (2:1)	1,7	8,0	1,9	7,9	Tannins

Plus particulièrement, il a été démontré que l'écorce interne contient plus de glucosides de stilbènes que l'écorce externe. Toutefois, le rendement de la fraction enrichie en stilbènes ne varie que très peu selon la saison de récolte (Final-report, 2007). En dehors des stilbènes, d'autres composés polyphénoliques sont également présents dans les écorces de *Picea abies* tels que flavonoïdes (catéchine, épicatechine et taxifoline), proanthocyanidines (Tisler *et al.*, 1986), lignanes (hydroxymatairésinol) et acides phénoliques (acide *para*-coumarique) (Pan and Lundgren, 1995).

Dès les années 1970, les composés polyphénoliques de l'écorce de plusieurs essences canadiennes ont suscité l'intérêt des scientifiques. En 1971, Manners et Swan ont isolé trois dérivés de stilbènes à partir des écorces de l'épinette d'Engelmann (*Picea engelmannii*), l'épinette blanche (*Picea glauca*), l'épinette noire (*Picea mariana*), l'épinette rouge (*Picea rubens*) et l'épinette de Sitka (*Picea sitchensis*) (Manners and Swan, 1971). Connus sous les noms d'astringine, isorhapontine et isorhapontigénine (Figure 27), ces composés

hautement antioxydants (Fauconneau *et al.*, 1997), sont également impliqués dans le système de défense des arbres contre les termites et les champignons. Dans son étude, Manners et Swan ont isolé ces composés en utilisant un traitement séquentiel incluant l'extraction acétonique des écorces broyées, suivi par une reprise de la matière extraite séchée dans le méthanol et enfin par une purification de l'extrait par lavage de la solution méthanolique à l'aide de l'éther de pétrole. Cette dernière étape a notamment permis d'éliminer les composés terpéniques (lipophiles) et de conserver les composés polyphénoliques plus hydrosolubles, y compris les stilbènes. Cette procédure a également permis l'identification de la taxifoline, un flavonoïde reconnu pour ses propriétés antioxydantes, dans les écorces de *Picea mariana*, *Picea engelmannii*, *Picea glauca* et *Picea rubens* (Manners and Swan, 1971). La présence de la taxifoline dans l'écorce de l'épinette noire a récemment été confirmée par notre équipe (Diouf *et al.*, 2009). Un quatrième stilbène, l'astringénine, a pu être isolée spécifiquement dans l'épinette d'Engelmann, l'épinette de Sitka et l'épinette blanche, se retrouvant à l'état de trace dans les écorces des épinettes rouge et noire. La distribution de l'astringénine et l'isorhapontine dans l'épinette de Sitka a révélé leur abondance dans l'écorce mais leur faible teneur dans les racines, les aiguilles ou l'aubier (Underwood and Pearce, 1991).

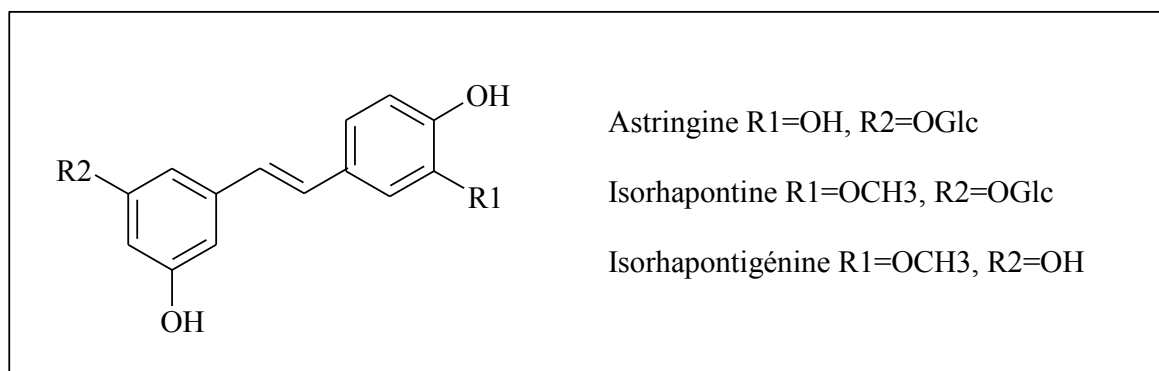


Figure 27 Structure chimique des stilbènes astringine, isorhapontine et isorhapontigénine, retrouvés dans les écorces d'espèces appartenant au genre *Picea*

Récemment, Wada et collaborateurs ont identifié plusieurs polyphénols dans l'extrait méthanolique obtenu à partir d'écorces de *Picea jezoensis* var. *jezoensis* (Wada et al., 2007). Ainsi, ces auteurs ont identifié deux nouveaux flavonostilbénoides nommés

jezonocinols A et B. De la même façon, ils ont pu isoler d'autres polyphénols tels que l'alcool dihydrodiconiférylique, l'isolaricirésinol, l'acide protocatéchuique et la taxifoline (Wada *et al.*, 2009).

Les extraits d'écorces d'essences appartenant au genre *Picea* sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, notamment pour leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique (McCune and Johns, 2002; Pietarinen *et al.*, 2006). Au-delà des propriétés antioxydantes, d'autres activités biologiques sont liées à la présence de polyphénols dans ces extraits. Dans le cas de l'épinette blanche et de l'épinette de Norvège, de fortes activités antifongiques ont été déterminées (Evensen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004). Les extraits du bois de cœur et de l'écorce interne de l'épinette blanche (*Picea glauca*) se sont également avérés antimicrobiens envers plusieurs souches de bactéries (RitchKrc *et al.*, 1996).

On remarque dans notre approche bibliographique que les études concernant la caractérisation chimique des écorces de l'épinette noire sont insuffisantes, la plus exhaustive étant celle effectuée en 1971 par Manners et Swan. On peut donc conclure qu'il est nécessaire d'améliorer les connaissances quant à la caractérisation des polyphénols dans les écorces de cette essence.

### **1.13 Les polyphénols en tant qu'agents anti-TNF $\alpha$**

Plusieurs études *in vitro* ont démontré la capacité des polyphénols à agir au niveau de: a) l'inhibition de la production et de la sécrétion du TNF- $\alpha$  et b) l'inhibition de l'activité du TNF- $\alpha$  dans les cellules (Habtemariam, 2000; Paul *et al.*, 2006).

#### **1.13.1 Polyphénols ayant un effet inhibiteur sur la synthèse et/ou la sécrétion de TNF- $\alpha$**

Les effets inhibiteurs des polyphénols sur la production de TNF- $\alpha$  dans plusieurs types cellulaires sont majoritairement reliés à l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B (Habtemariam, 2000). Toutefois, d'autres mécanismes ont été proposés, soit l'augmentation des niveaux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans les monocytes et les macrophages, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion du TNF dans ces cellules (Siegmond *et al.*, 1997) ou bien l'inhibition des métalloprotéases chargées de la

transformation de la forme transmembranaire du TNF vers la forme soluble. Quelques exemples de polyphénols ayant un effet inhibiteur sur la production et/ou la sécrétion de TNF- $\alpha$  *in vitro* sont mentionnés dans le tableau 12.

Tableau 12 Exemples de polyphénols ayant démontré un effet inhibiteur sur la production et/ou la sécrétion de TNF- $\alpha$

Polyphénol (concentrations ayant un effet sur la synthèse et/ou la sécrétion du TNF- $\alpha$ )	Type cellulaire	Mécanisme	Références
<i>trans</i> -resveratrol ( $\geq 0.1 \mu\text{M}$ )	Macrophages RAW 264.7	Inhibition de NF- $\kappa\text{B}$	(Wadsworth and Koop, 1999)
Acide nordihydroguaiarétique ( $2.8 \mu\text{M}$ )	Cellules mononucléaires du sang	Inhibition de NF- $\kappa\text{B}$	(Eugui <i>et al.</i> , 1994)
Curcumine ( $0.5\text{-}10 \mu\text{M}$ )	Monocytes et macrophages	Inhibition de NF- $\kappa\text{B}$	(Abe <i>et al.</i> , 1999)
Lutéoline $\leq 1 \mu\text{M}$	Macrophages	Inhibition de NF- $\kappa\text{B}$	(Xagorari <i>et al.</i> , 2001)
Capsaïcine ( $100\text{-}300 \mu\text{M}$ )	Cellules myéloblastiques ML-1a	Inhibition de NF- $\kappa\text{B}$	(Singh <i>et al.</i> , 1996)
Tetrahydrocannabinol ( $1\text{-}10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Macrophages	Inhibition des métalloprotéases	(Zheng and Specter, 1996)
Tangéritine ( $30 \mu\text{M}$ )	Monocytes	Augmentation des niveaux d'AMPc	(Manthey <i>et al.</i> , 1999)
Glycoside de l'aricirésinol ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Macrophages RAW 264.7	Pas déterminé	(Cho <i>et al.</i> , 1998)
Pinorésinol ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Macrophages RAW 264.7	Pas déterminé	(Cho <i>et al.</i> , 1998)

### 1.13.2 Polyphénols ayant un effet inhibiteur sur l'activité du TNF- $\alpha$ dans les cellules

Les polyphénols peuvent bloquer la signalisation induite par le TNF- $\alpha$  dans divers types cellulaires, tout en agissant à plusieurs niveaux. Les mécanismes pharmacologiques les plus importants qui ont été proposés sont l'inhibition de l'activation des facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B ou AP-1) ou bien l'inhibition de l'activation des MAPK (Aggarwal *et al.*, 2006) (Tableau 13).

Tableau 13 Exemples de polyphénols ayant un effet inhibiteur sur l'activité du TNF- $\alpha$  dans les cellules

<b>Polyphénol</b> <b>(concentrations ayant un effet inhibiteur sur les fonctions du TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<b>Type cellulaire</b>	<b>Mécanisme</b>	<b>Références</b>
Curcumine (20 $\mu$ M)	Kératinocytes HaCaT	Inhibition des MAPKs et de NF- $\kappa$ B	(Cho <i>et al.</i> , 2007)
Picéatannol (50 $\mu$ M)	Cellules myéloïdes Cellules épithéliales Lymphocytes	Inhibition de NF- $\kappa$ B	(Ashikawa <i>et al.</i> , 2002)
Resveratrol (5 $\mu$ M)	Cellules myéloïdes Cellules épithéliales Lymphocytes	Inhibition de NF- $\kappa$ B et AP-1	(Manna <i>et al.</i> , 2000)
Epigallocatechine gallate (3-100 $\mu$ M)	Cellules cancéreuses du poumon A549	Inhibition de NF- $\kappa$ B	(Chen <i>et al.</i> , 2002)
Verbascoside (50 $\mu$ M)	Kératinocytes normaux humains	Inhibition de NF- $\kappa$ B	(Pastore <i>et al.</i> , 2011)
Avenantramides (1 partie par milliard)	Kératinocytes normaux humains	Inhibition de NF- $\kappa$ B	(Sur <i>et al.</i> , 2008)
Taxifoline (250 $\mu$ M)	Fibroblastes murins L-929	Pas déterminé	(Habtemariam, 1997)
Lutéoline (50 $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> )	Cellules endothéliales	Inhibition de NF- $\kappa$ B	(Choi <i>et al.</i> , 2004)

Capsaïcine (200-300µM)	Cellules myéloblastiques ML-1a	Inhibition de NF-κB	(Singh <i>et al.</i> , 1996)
---------------------------	--------------------------------------	---------------------	------------------------------

La revue de la littérature permet de constater que les études ayant analysé l'action des polyphénols en tant qu'agents anti-TNF- $\alpha$  sur les kératinocytes, ont utilisé des cellules normales ou immortalisées. En fait, au mieux de notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée en utilisant un modèle en monocouche proprement psoriasique. Ceci constitue une limitation importante au niveau de la compréhension du rôle de ces molécules pour le traitement du psoriasis, considérant que les kératinocytes psoriasiques ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles qui les différencient d'autres types de kératinocytes (Giustizieri *et al.*, 2001; Rozieres *et al.*, 2006).

## 1.14 Les polyphénols et les produits de santé naturels

### 1.14.1 Les produits de santé naturels

Les produits de santé naturels (PSN) se présentent régulièrement sous forme de comprimés, de gélules, de teintures, de solutions, de crèmes, d'onguents et de gouttes. En fait, il s'agit de produits le plus souvent faits à base de plantes médicinales, bien qu'ils puissent aussi être fabriqués à partir de microorganismes ou provenir de sources animales et marines (Santé Canada, 2004). Les PSN sont des produits utilisés pour diverses raisons, notamment pour prévenir ou traiter un malaise ou une maladie, réduire un risque pour la santé ou maintenir une bonne santé (Santé Canada, 2004). Étant donné qu'ils se commercialisent comme produits en vente libre, ils doivent être utilisés sans danger pour les patients. Toutefois, à cause de leur plus faible brevetabilité ils bénéficient malheureusement de moins d'études cliniques, et par conséquent de moins d'études de toxicité. Le développement de nouveaux PSN sur des bases rigoureuses doit donc reposer sur des résultats obtenus lors d'essais précliniques et cliniques pertinents permettant aux patients de faire des choix éclairés concernant leur utilisation.



Au Canada on retrouve trois produits de santé naturels homologués qui peuvent présentement être utilisés dans le traitement du psoriasis. En tant que produits homologués, ils ont été examinés par Santé Canada (agence régulatrice en matière de Santé du Canada) et jugés sûrs, efficaces et de haute qualité dans les conditions d'utilisation recommandées. Deux d'entre eux sont vendus sous forme de capsules ayant comme ingrédient médicinal les parties aériennes séchées de *Scrophularia nodosa* L, une plante herbacée utilisée traditionnellement pour soulager les symptômes du psoriasis (Hoffmann, 2003). Fait intéressant, il semblerait que les composés polyphénoliques (flavonoïdes et acides phénoliques), constituent une des principales molécules bioactives présentes dans cette plante (Crisan *et al.*, 2009). Ainsi, des composés tels que l'acide *para*-coumarique, l'acide férulique, la lutéoline, le kaempférol, la quercétine et le rutoside ont récemment été déterminés dans les feuilles et les tiges de cette plante (Crisan *et al.*, 2009).

#### 1.14.2 Importance de la caractérisation chimique pour la normalisation d'extraits polyphénoliques

L'utilisation d'extraits polyphénoliques dans la formulation de produits de santé naturels implique l'identification des molécules qui les constituent, lesquelles sont considérées comme des « biomarqueurs », ayant une grande importance pour la normalisation et le contrôle de la qualité des extraits naturels (Santé Canada, 2004 ). En effet, la caractérisation chimique conduisant à l'identification de ces composés dits « biomarqueurs » peut être utilisée pour la normalisation d'extraits polyphénoliques et/ou pour leur identification surtout en tenant compte de la variabilité inhérente quant à la composition chimique des échantillons naturels (Santé Canada, 2004 ). Ainsi, ces composés peuvent être choisis selon la stabilité des constituants, la facilité technique de l'analyse, le temps et les coûts de l'analyse et sont généralement utilisés pour déterminer, de par leur présence, leur absence ou leur niveau relatif, si le processus d'extraction s'est déroulé comme prévu. Les composés marqueurs n'ont pas nécessairement d'agents pharmacologiques actifs, pouvant donc se classer comme suit (Santé Canada, 2004 ):

- a) Constituant actif : Constituant biochimique dont l'effet thérapeutique est connu et acceptable. La concentration de ce constituant biochimique particulier peut être

modifiée par normalisation à une concentration reproductible soit celle du composé se trouvant naturellement dans la plante ou celle d'un extrait plus concentré.

- b) Composé marqueur : Le constituant biochimique actif est inconnu. Le composé marqueur utilisé est caractéristique du produit de santé naturel, mais ne contribue pas à l'activité thérapeutique. Le composé marqueur peut aussi servir à contrôler l'uniformité des extraits d'une extraction à l'autre.

#### 1.14.3 Extraits polyphénoliques normalisés

On regroupe sous le nom d'extraits naturels normalisés les extraits dont les constituants biochimiques ou les composés « biomarqueurs » sont présents à une concentration minimale précise ou encore se trouvent à l'intérieur d'un extrait naturel donné. Cet objectif est atteint par la caractérisation et la quantification chimique d'un ou de plusieurs « biomarqueurs » dont l'activité pharmacologique est connue ou pas (Santé Canada, 2004 ). Le recours à ce principe consiste à supposer que les constituants chimiques d'un extrait donné varient dans la même proportion que le composé « biomarqueur »; ainsi, si chaque extrait contient la même quantité normalisée de ce biomarqueur, la concentration des autres éléments devrait elle aussi rester relativement uniforme (Santé Canada, 2004 ).

De nos jours, il existe plusieurs extraits polyphénoliques normalisés. Parmi ceux-ci on retrouve l'extrait des feuilles du thé vert (*Camelia sinensis*), l'extrait d'écorces de *Pinus maritima* (Pycnogenol<sup>®</sup>, Oligopin<sup>®</sup> ou Flavangenol<sup>®</sup>), l'extrait des pépins de raisin (*Vitis vinifera*) et l'extrait de canneberges (*Vaccinium macrocarpon*) (Bononi and Tateo, 2007; Shimada *et al.*, 2012; Srividhya *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Ces extraits, conçus pour offrir des concentrations précises de polyphénols bioactifs, sont utilisés dans la formulation de produits de santé naturels pour le traitement et la prévention de plusieurs maladies, pouvant également servir comme additifs dans la préparation de nouveaux produits.

### 1.15 Les polyphénols dans le traitement du psoriasis

Les polyphénols sont parmi les composés naturels les plus étudiés pour le traitement du psoriasis (Edeas, 2007). Reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, antiprolifératives et

anti-inflammatoires, ils ont démontré un potentiel pharmacologique pour le traitement de cette maladie.

### 1.15.1 Le resvératrol

Le resvératrol est un stilbène qui existe sous forme de deux stéréoisomères (plus précisément deux diastéréoisomères géométriques *trans* et *cis*), pouvant également se trouver dans la nature sous forme glycosylée (picéide) (Figure 28). La forme *trans* est majoritaire et considérée comme étant celle qui possède l'activité biologique la plus puissante (Kim *et al.*, 2011). Le resvératrol est présent dans certains aliments dont les raisins et les cacahuètes (Katalinic *et al.*, 2010). Il a également été identifié dans l'écorce de *Picea abies* (Mannila *et al.*, 1993) et dans les racines de *Polygonum cuspidatum*, une plante médicinale utilisée en Chine et au Japon (Zhang *et al.*, 2009). On le retrouve également dans le vin (Nevado *et al.*, 1999) où on lui attribue une partie de ses effets bénéfiques sur la santé. Des études de stabilité ont démontré que le *trans*-resvératrol sous forme de poudre est stable lorsqu'exposé à 75% d'humidité et à 40 °C de température en présence d'air (Prokop *et al.*, 2006). Également, son contenu dans les raisins change très peu, même après des étapes de fermentation et de longues périodes d'entreposage (Bertelli *et al.*, 1998).

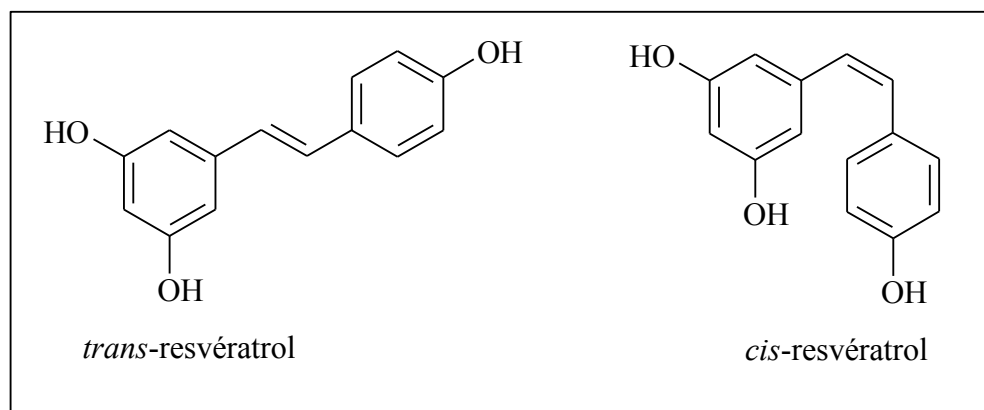


Figure 28 Structure chimique des isomères du resvératrol

En raison de ses propriétés anti-angiogéniques, il a été suggéré que le resvératrol puisse être un candidat thérapeutique possible dans le traitement du psoriasis (Srivastava *et al.*, 2010). En effet, une étude *in vitro* récemment effectuée a démontré que ce composé est capable

d'inhiber la migration et la prolifération des cellules endothéliales aussi bien que la formation de capillaires, deux étapes importantes de l'angiogenèse (Srivastava *et al.*, 2010). De plus, le resvératrol (12  $\mu$ M) a démontré un effet inhibiteur sur la sécrétion de l'élastase par les neutrophiles (Hrenn *et al.*, 2006), une enzyme présente dans les lésions psoriasiques qui peut dégrader les constituants de la peau (kératines, élastine et collagène) et stimuler la migration des neutrophiles vers le site d'inflammation aussi bien que l'hyperprolifération des kératinocytes (Meyer-Hoffert *et al.*, 2004; Wiedow *et al.*, 1995). Le resvératrol (0,25-100  $\mu$ M) peut également agir en tant qu'agent antiprolifératif pour les kératinocytes (Holian and Walter, 2001).

L'étude la plus représentative utilisant le resvératrol pour le traitement du psoriasis est probablement celle publiée par Pelliccia et collaborateurs en 2001. En effet, ces auteurs ont réalisé une étude clinique prospective, multicentrique, en double aveugle dans le but d'évaluer l'efficacité clinique du resvératrol administré par voie topique pour le traitement du psoriasis en plaques ( $BSA \leq 40\%$ , âge  $\geq 18$  ans) (Pelliccia *et al.*, 2001). Au total, 48 patients ont été recrutés et divisés en 4 sous-groupes comme suit: a) patients traités avec du resvératrol (pommade contenant 1% du resvératrol); b) groupe contrôle traité avec le véhicule; c) groupe traité avec un analogue de la vitamine D3 (calcipotriol 50 mg/g) ; d) groupe traité avec la combinaison du resvératrol et du calcipotriol (1% resvératrol/calcipotriol 50 mg/g). Tous ces sous-groupes ont été comparables quant à l'âge, le sexe et la sévérité du psoriasis.

Les patients ont été traités deux fois par jour pendant un mois avec les différents traitements préalablement énoncés. À la fin de cette période, 80% des patients traités avec le resvératrol ont montré une amélioration significative de leur psoriasis, comparativement à 10% des patients dans le groupe contrôle, 47% des patients dans le groupe traité avec le calcipotriol et 95% des patients dans le groupe traité avec la combinaison resvératrol/calcipotriol (Pelliccia *et al.*, 2001). Une amélioration significative de la qualité de vie des patients a également été remarquée dans le groupe traité avec le resvératrol comparativement au groupe contrôle (Pelliccia *et al.*, 2001). Les résultats de ce travail ont montré le potentiel pharmacologique du resvératrol seul ou en combinaison avec le calcipotriol pour le traitement du psoriasis léger à modéré.

### 1.15.2 La capsaïcine

La capsaïcine (8-méthyle N-vanillyle 6-nonénamide) est un composé phénolique principalement retrouvé dans le piment (*Capsicum*) (Figure 29). C'est précisément grâce à la capsaïcine que nous ressentons une sensation de brûlure lorsqu'elle est présente dans les aliments, ce qui est considéré comme un élément gustatif intéressant. Du point de vue biologique, ce composé permet aux plantes qui le produisent d'être moins exposées à la prédation. Des études ont démontré que la capsaïcine agit en réduisant la substance «P», un neuropeptide présent dans les terminaisons nerveuses, qui participe à la transmission des signaux de douleur au cerveau (Bring *et al.*, 2012).

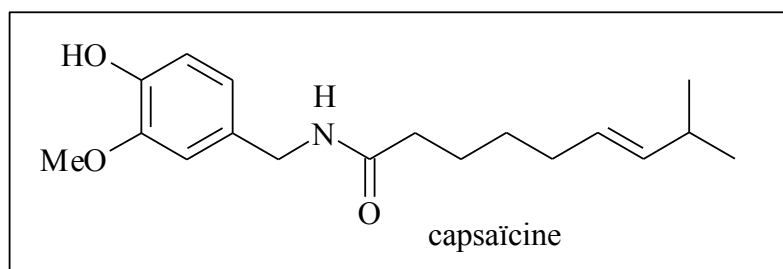


Figure 29 Structure chimique de la capsaïcine

Plusieurs études cliniques démontrent le potentiel pharmacologique de la capsaïcine pour le traitement du psoriasis, fondamentalement au niveau de la diminution du prurit qui accompagne cette maladie. En effet, en 1986 une étude clinique incluant 44 patients atteints de psoriasis modéré à sévère (BSA  $\geq 10\%$ ) a évalué les effets de l'administration topique de la capsaïcine sur cette maladie (Bernstein *et al.*, 1986). La capsaïcine a été administrée sous forme de crème (0,01 ou 0,025%) pendant 6 semaines sur une partie du corps des patients affectés par le psoriasis et comparée à une crème ayant la même apparence, mais ne contenant que le véhicule, laquelle a été administrée sur une autre partie du corps des patients (Bernstein *et al.*, 1986). Après 6 semaines de traitement, une amélioration clinique significative du psoriasis a été observée auprès de 67,6% des patients sur la partie du corps traitée avec la capsaïcine comparativement à 44,1% des patients traités avec le véhicule. Des réductions au niveau de l'érythème, des brûlures, des picotements et des démangeaisons ont été remarquées par près de la moitié des patients suite à l'application topique de ce composé (Bernstein *et al.*, 1986).

En 1990, une autre étude clinique ayant pour but d'évaluer les effets de l'administration topique de la capsaïcine pour le traitement du psoriasis a été publiée. Dans cette étude, 10 patients atteints de psoriasis sévère (BSA= 15-30%) ont été traités avec une crème contenant 0,025% de capsaïcine pendant 8 semaines sur une partie de leur corps alors que l'autre partie du corps était traitée avec le véhicule (Kurkcuoglu and Alaybeyi, 1990). À la fin de l'étude, 7 patients ont montré une amélioration significative de leur psoriasis accompagnée d'une diminution significative de l'érythème, des brûlures, des picotements et des démangeaisons (Kurkcuoglu and Alaybeyi, 1990).

En 1993, Ellis et collaborateurs ont effectué un essai clinique multicentrique en double aveugle dans le but d'évaluer l'efficacité clinique de la capsaïcine administrée par voie topique pour le traitement du psoriasis (Ellis *et al.*, 1993). Pour ce faire, 197 patients atteints de psoriasis (BSA  $\geq$  5%) ont été recrutés et divisés en deux sous-groupes: a) patients traités avec la capsaïcine sous forme de crème 0,025% (n=98) ; et b) patients traités avec une crème contenant le véhicule (n=99). Après 4 et 6 semaines de traitement, une amélioration clinique significative du psoriasis a été observée dans le groupe ayant reçu la crème contenant de la capsaïcine comparativement au groupe contrôle (p=0,024 et 0,030 respectivement) (Ellis *et al.*, 1993). Une diminution significative du prurit à la suite du traitement avec la capsaïcine a aussi été remarquée par les patients.

Bien que le mécanisme d'action précis responsable des effets antipsoriasiques de la capsaïcine ne soit pas connu, il semblerait que cette molécule puisse inhiber la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules immunitaires, tout en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires (Aggarwal and Shishodia, 2004). Également elle semble agir en inhibant la vasodilatation, le prurit et la douleur qui sont présents dans le psoriasis (Zegarska *et al.*, 2006). Un autre mécanisme qui a été proposé implique la liaison de la capsaïcine à son récepteur TRPV1 (*transient receptor potential vanilloïde 1*), ce qui serait suivi d'une diminution de la translation du HIF-1 $\alpha$  mRNA (*hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit*) et de l'inhibition de la hyperprolifération des kératinocytes (Yu, 2011).

### 1.15.3 Les polyphénols du thé vert

Les polyphénols du thé vert représentent 36% de la matière sèche provenant des feuilles de la plante *Camellia sinensis*. Parmi ceux-ci, on trouve des flavonoïdes tels que: l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG); l'épigallocatechine (EGC); l'épicatéchine-3-gallate (ECG) et l'épicatéchine (EC) (Figure 30). L'épigallocatechine-3-gallate est considérée comme étant le plus abondant et le plus puissant polyphénol bioactif du thé vert (Isbrucker *et al.*, 2006; Mukhtar and Ahmad, 2000).

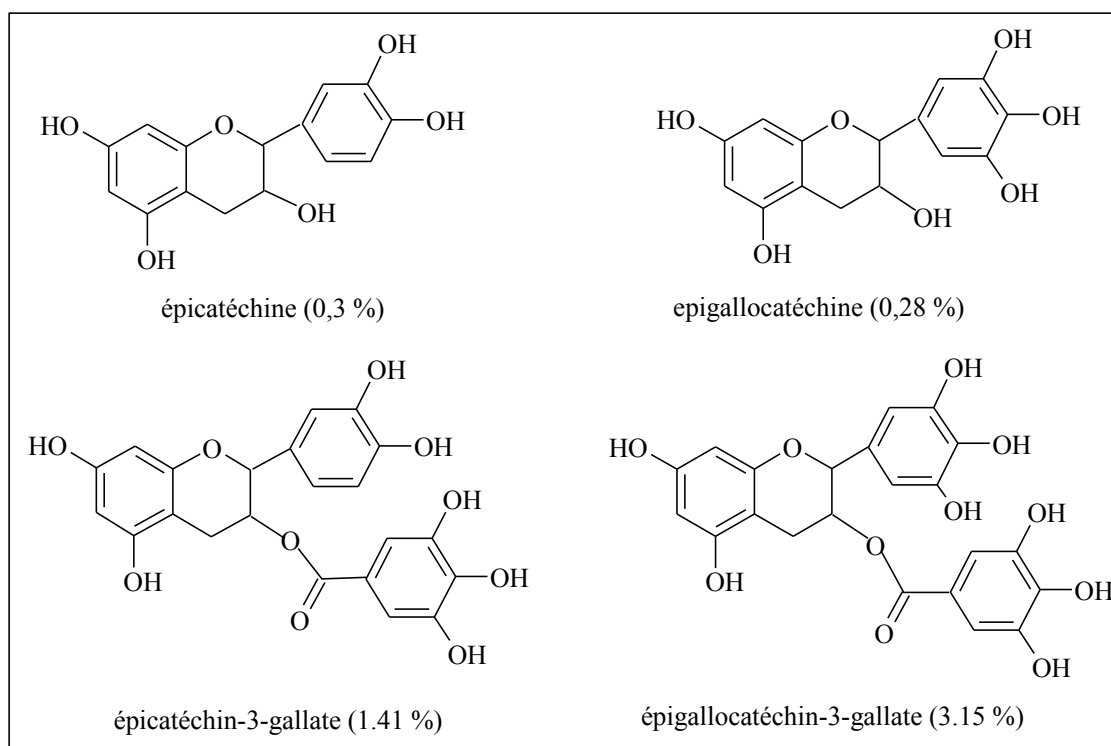


Figure 30 Des dérivés majeurs de l'épicatéchine retrouvés dans le thé vert

Parmi les études les plus représentatives utilisant les extraits du thé vert pour le traitement du psoriasis, celle effectuée par Hsu et collaborateurs se démarque (Hsu *et al.*, 2007). Ces chercheurs ont étudié l'influence des polyphénols du thé vert sur l'expression de la caspase 14 dans les kératinocytes normaux humains (KNH) et dans la peau d'une souris génétiquement modifiée ayant une peau semblable à la peau psoriasique humaine. La caspase 14 appartient à la famille des caspases, un groupe de protéases à cystéine impliquées dans le phénomène d'apoptose (Hu *et al.*, 1998). Elle est exprimée uniquement

dans l'épiderme, mais à la différence d'autres caspases, ne semble pas être impliquée dans la cascade pro-apoptotique (Lippens *et al.*, 2000). La caspase 14 participe à la différenciation terminale des kératinocytes normaux et possède un rôle important dans la formation du *stratum corneum* (Eckhart *et al.*, 2000). Au sein de la peau psoriasique, son expression y est diminuée (Pistrutto *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005). Les résultats de cette étude ont démontré que l'épigallocatechine-3-gallate était capable d'induire l'expression de la caspase 14 dans les kératinocytes humains. De plus, l'application topique d'extraits de thé vert a réduit significativement les symptômes de la pathologie chez des souris modifiées génétiquement, en régulant justement l'expression de la caspase 14 dans ce modèle animal.

Bien que l'utilisation du psoralène (un dérivé de coumarine contenant un cycle de furane) et de la radiation ultra-violette A (PUVA) soit hautement effective dans le traitement du psoriasis (Peritz and Gasparro, 1999), les résultats d'études cliniques démontrent que cette thérapie peut conduire au développement de carcinomes et de mélanomes (Honigsmann *et al.*, 1980). De ce fait, des stratégies afin de réduire ces risques sont hautement désirables. Zhao (1999) et collaborateurs ont étudié les effets protecteurs de l'extrait normalisé du thé vert contre les dommages cutanés induits par le psoralène et la radiation UVA (Zhao *et al.*, 1999). Pour ce faire, l'extrait a été utilisé par voie orale et cutanée sur des souris chauves et sur la peau de deux volontaires sains. Les résultats de cette étude ont démontré que l'administration orale de l'extrait normalisé de thé vert avant et durant la PUVA thérapie a significativement réduit l'hyperplasie et l'hyperkératose de la peau de souris. Lorsque l'extrait normalisé a été appliqué sur les équivalents cutanés EpiDerm<sup>®</sup>, l'accumulation de la protéine p53 a été inhibée. Cette protéine fonctionne en intégrant les réponses cellulaires au stress. Selon la nature du stress, trois rôles particuliers sont dévolus à p53 soit : l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire par apoptose ou l'activation de la différenciation cellulaire (Maltzman and Czyzyk, 1984). Le prétraitement de la peau humaine avec 0,2 mg par cm<sup>2</sup> d'extrait normalisé de thé vert a généré une élimination presque complète de l'érythème induite par la PUVA thérapie (Zhao *et al.*, 1999). Comme conclusion les auteurs ont suggéré que l'extrait normalisé de thé vert combiné à la PUVA thérapie pourrait être utilisé pour le traitement de maladies telles que le cancer et le psoriasis afin de diminuer l'inflammation et les dommages à l'ADN induits par cette modalité (Zhao *et al.*, 1999).



Une augmentation de l'activité de la protéine kinase C (PKC) a été observée dans les fibroblastes et les kératinocytes psoriasiques (Nagao *et al.*, 1988; Raynaud and Evain-Brion, 1991). Ainsi, dans le but d'évaluer le potentiel inhibiteur des flavonoïdes sur cette enzyme, Tammela et collaborateurs ont utilisé les polyphénols du thé vert et les ont comparés avec d'autres types de flavonoïdes. Les résultats ont montré que l'EGCG a été l'inhibiteur le plus puissant, suivi de l'épicatéchin gallate (EG) tandis que les flavonoïdes myricétine, quercétine et kaempférol ont montré une activité inhibitrice inférieure (Tammela *et al.*, 2004).

Le fait que l'EGCG et le méthotrexate aient des ressemblances structurales (Figure 31) a motivé une recherche dans le but de vérifier l'action inhibitrice de ce flavonoïde sur l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) (Navarro-Peran *et al.*, 2005). En bloquant cette enzyme, l'EGCG pourrait empêcher la production de thymidine, un constituant essentiel à la production d'ADN. Ce mécanisme est à l'origine des effets antiprolifératifs du méthotrexate dans le psoriasis (Heydendael *et al.*, 2003). Les résultats de cette recherche ont démontré que l'EGCG interfère avec la croissance des cellules de lymphomes chez la souris (L1210) via l'inhibition de l'activité de la DHFR. De plus, elle est capable d'inhiber fortement l'enzyme DHFR de foie de poulet, mais pas celle de foie de bœuf. Ainsi, il a donc été suggéré que les polyphénols galloylés pourraient être utilisés pour le traitement du cancer et du psoriasis étant donné leur capacité d'inhiber la dihydrofolate réductase (Mukhtar and Ahmad, 2000).

L'une des applications possibles de l'EGCG dans le psoriasis est reliée à sa capacité de susciter la différenciation cellulaire dans les kératinocytes normaux (KNH) de façon exponentielle (Hsu *et al.*, 2003). Ainsi, une étude conduite par Hsu et son équipe a démontré que l'EGCG (50-100  $\mu\text{M}$ ) était capable d'induire la différenciation cellulaire des KNH, ce qui a été mesuré en utilisant le marquage contre la kératine1, la filaggrine et la transglutaminase1. Ces résultats sont en accord avec ceux de Balasubramanian et collaborateurs lesquels ont démontré que l'EGCG induisait l'expression de l'involucrine et la conversion des kératinocytes indifférenciés en cornéocytes, tout en diminuant la prolifération cellulaire (Balasubramanian *et al.*, 2002). Compte tenu des résultats obtenus par ces équipes, il a été conclu que l'EGCG possède un potentiel thérapeutique pour le

traitement de désordres cutanés caractérisés par une prolifération accrue et des dérèglements au niveau de la différenciation cellulaire, voire le psoriasis.

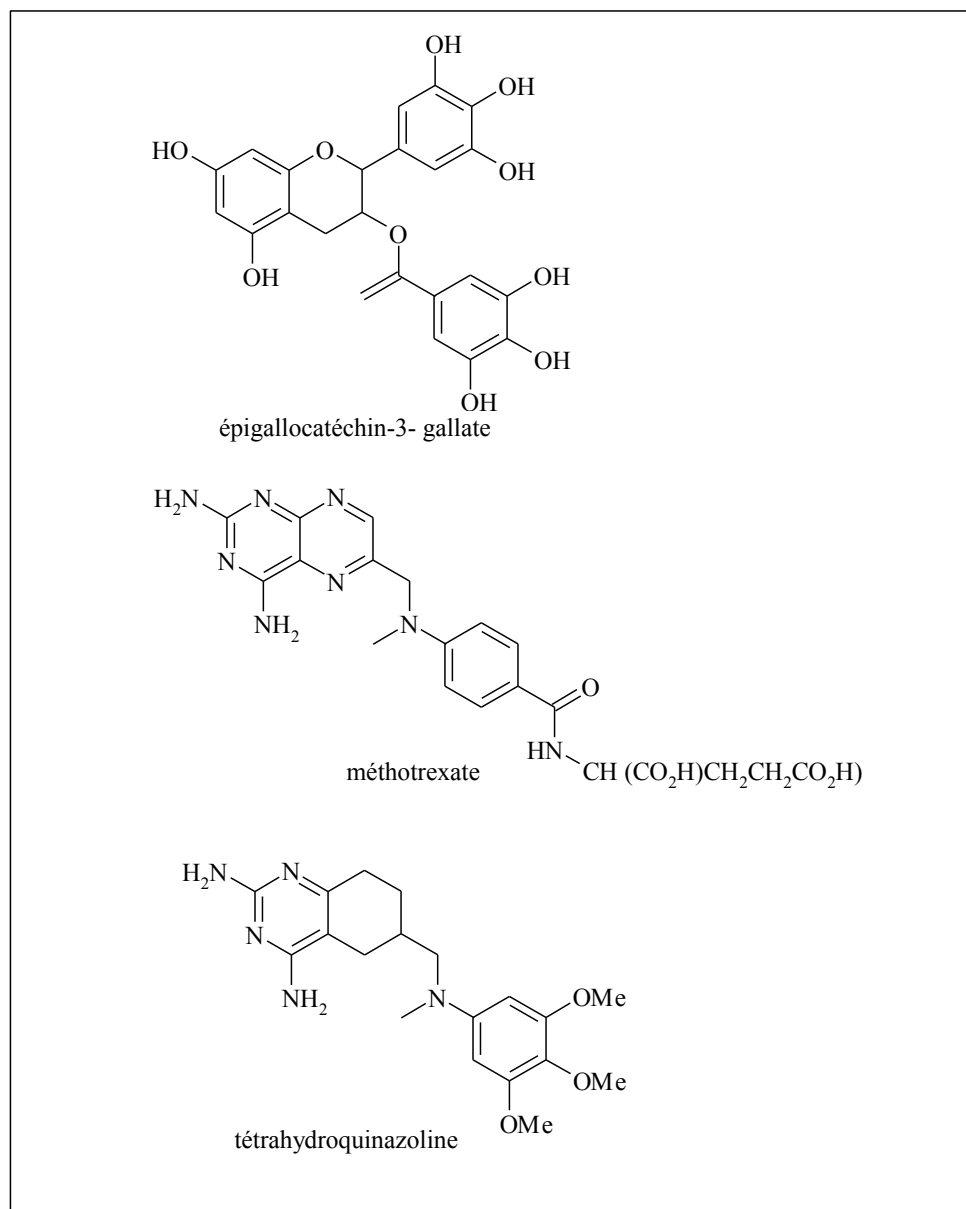


Figure 31 Ressemblances structurales entre l'épigallocatechin-3-gallate et les inhibiteurs de l'enzyme dihydrofolate réductase (méthotrexate et tétrahydroquinazoline). Tirée de Navarro-Perán *et al.*, 2005.

#### 1.15.4 La curcumine

La curcumine est le constituant actif le plus important de l'extrait du rhizome d'une plante herbacée tropicale, le *Curcuma longa* L. appartenant à la famille des Zingibéracées, que l'on cultive en Asie du Sud Est, en Inde particulièrement, dont les composants principaux sont présentés à la Figure 32 (Ammon and Wahl, 1991).

Son utilisation dans le traitement du psoriasis vient principalement des connaissances traditionnelles (Mukherjee and Wahile, 2006) qui l'ont décrite comme un polyphénol ayant une haute efficacité (Gurib-Fakim, 2006; Kurd *et al.*, 2008). En fait, la curcumine est l'un des composés les plus étudiés pour le traitement de nombreuses pathologies (Camacho-Barquero *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2011). C'est ainsi qu'il existe plusieurs articles portant sur ce polyphénol qui ont été publiés dans des revues spécialisées de langue anglaise (Strimpakos and Sharma, 2008a). L'une des raisons qui ont motivé l'étude de cette molécule vient du fait que la curcumine a plusieurs cibles moléculaires lui permettant d'avoir un effet pharmacologique sur des pathologies diverses (Zhou *et al.*, 2011).

Quant à ses effets protecteurs sur la peau, il a été suggéré que ceux-ci pourraient être expliqués par sa capacité à piéger des espèces réactives de l'oxygène (ERO), mais aussi par ses propriétés anti-inflammatoires permettant l'inhibition du facteur NF- $\kappa$ B (Marin *et al.*, 2007; Thangapazham *et al.*, 2007). La curcumine est capable de diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  au sein des kératinocytes HaCaT stimulés avec le TNF- $\alpha$  (Cho *et al.*, 2007). En effet, dans son structure chimique on retrouve les groupements suivants : méthoxyle, hydroxyle phénolique et cétone (Figure 32). En modifiant cette structure, au moins 60 composés ont été synthétisés (Robinson *et al.*, 2005). Il semble que ce soit précisément le groupement hydroxyle phénolique qui puisse jouer le rôle le plus significatif dans sa capacité antioxydante (Suzuki *et al.*, 2005).

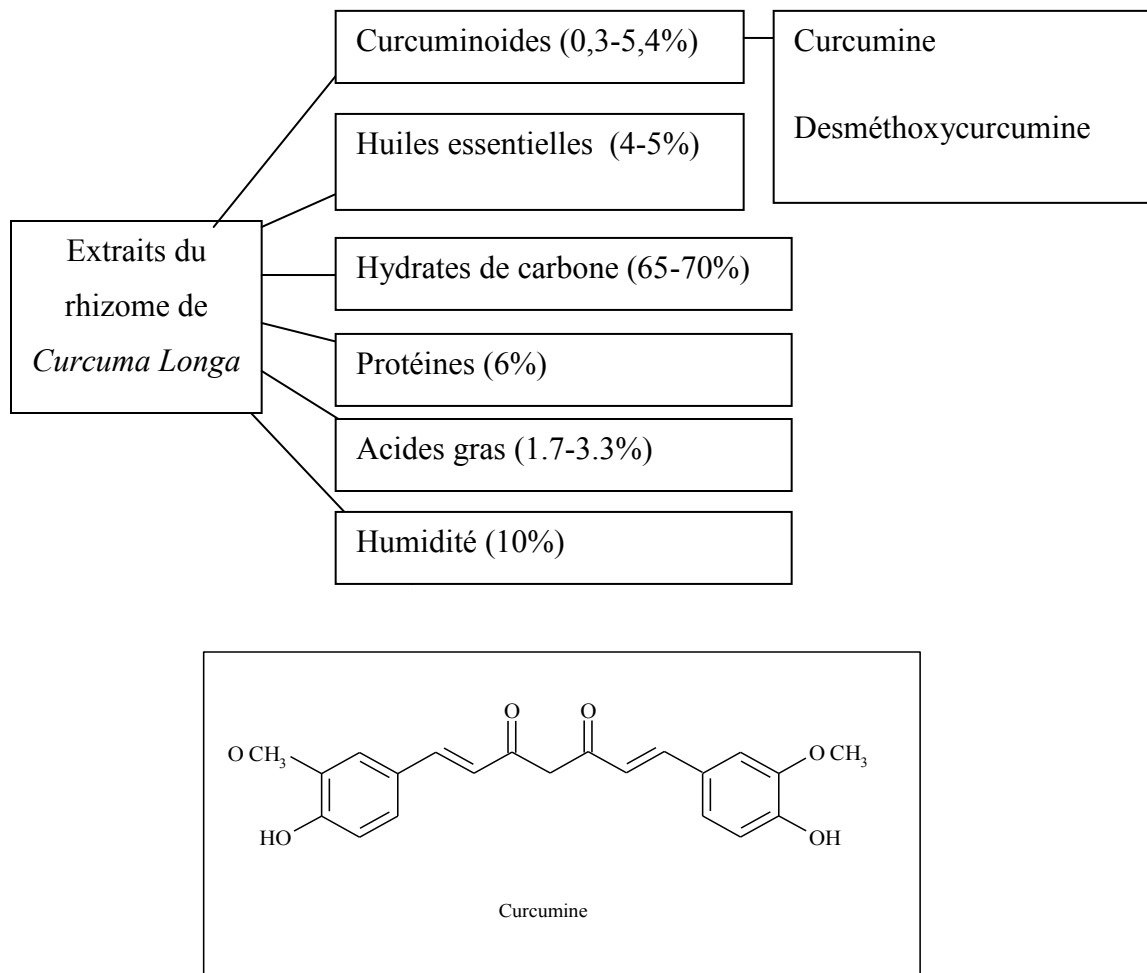


Figure 32 Des constituants de l'extrait du rhizome de *Curcuma longa* L.

On suppose qu'un composé antipsoriasique à succès doit, entre autres, montrer une très basse toxicité pouvant restaurer l'homéostasie de la peau. Ceci impliquerait la suppression de l'hyperprolifération des kératinocytes et l'amélioration du processus de différenciation. De ce fait, Pol et collaborateurs ont proposé une approche non radioactive afin de prédire le caractère antiprolifératif des produits antipsoriasiques (Pol *et al.*, 2003). Pour valider leur méthode, les chercheurs ont utilisé la curcumine, le dithranol, le méthotrexate, l'indométacine, l'acide rétinolique et la cyclosporine A. Les résultats ont montré que le dithranol détient un effet antiprolifératif marqué, mais pas les autres produits antipsoriasiques testés. Toutefois, la curcumine, à des concentrations de  $10^{-5}$  M, a inhibé la

croissance des kératinocytes. Les auteurs l'ont donc considérée comme étant un produit qui pourrait être utilisé dans le traitement du psoriasis (Pol *et al.*, 2003).

Récemment, les chercheurs ont posé l'hypothèse que le psoriasis pourrait être une réponse anormale et exagérée d'un processus de cicatrisation de plaies (Mizutani *et al.*, 2003). Or, il est connu que pour amorcer une cicatrisation de plaie, cela requière l'activation de la protéine de signalisation STAT3 qui est normalement présente aux abords de la plaie. Parallèlement, il a été découvert que les lésions psoriasiques *in vivo* démontraient un niveau significativement élevé de STAT3 actif, particulièrement au sein des noyaux de kératinocytes. Ainsi, un lien est suggéré entre les facteurs de croissance et les cytokines proinflammatoires avec l'activation de STAT3 pendant le développement et le maintien du psoriasis puisque l'IL-6 serait responsable de la phosphorylation et de l'activation des facteurs de transcription STAT3. De ce fait, des agents qui permettent de supprimer la phosphorylation de STAT3 pourraient avoir un potentiel pour le traitement du psoriasis. Une étude réalisée par Bharti et son équipe sur des cellules de myélome multiple à prolifération rapide (MM) a démontré que la curcumine inhibe réversiblement la phosphorylation de STAT3 (Bharti *et al.*, 2003). Comparativement à AG490, un inhibiteur connu du Janus kinase 2, la curcumine était plus rapide et plus puissante. De plus, des cellules MM résistantes à la dexaméthasone ont été sensibles à l'effet de la curcumine. Ces résultats ont démontré que ce produit naturel pourrait être un candidat thérapeutique pour le traitement de maladies qui impliqueraient l'hyperprolifération et l'activation du facteur de transcription STAT3, voire le psoriasis (Bharti *et al.*, 2003).

Le facteur de croissance épidermique (EGF) a été associé à l'hyperprolifération des kératinocytes psoriasiques (Iizuka *et al.*, 2004b). Ainsi, la phosphorylation de son récepteur, par l'enzyme phosphorylase kinase (PhK) (Yuan *et al.*, 1993) pourrait être considérée comme un événement qui a une influence sur la prolifération des kératinocytes psoriasiques. En général, les patients atteints de psoriasis possèdent une activité augmentée de la PhK (Heng *et al.*, 1994). Reddy et Aggawal ont démontré que la curcumine peut inhiber sélectivement cette enzyme (98%) et dans un grade plus faible la PKC (50%) (*protein kinase C*) (Reddy and Aggarwal, 1994). Ainsi, l'inhibition de la phosphorylation

du récepteur du EGF par la curcumine (Korutla *et al.*, 1995; Korutla and Kumar, 1994) pourrait être une conséquence de ses effets inhibiteurs sur la PhK.

L'activité de la curcumine sur la PhK dans le psoriasis a été évaluée auprès de 40 patients divisés en quatre groupes : a) un groupe de 10 patients atteints non traités ; b) 10 patients atteints traités avec le calcipotriol ; c) 10 patients atteints traités avec la curcumine; et d) un groupe contrôle de volontaires en bonne santé (Heng *et al.*, 2000). Les résultats démontrent que dans le groupe traité avec la curcumine, cinq sur dix patients ont eu une amélioration de 90% de la surface des plaques après 2-6 semaines, tandis que les 5 restants ont montré une amélioration de 50-85% après 3-8 semaines. Par contre, l'amélioration avec le calcipotriol a été plus modeste étant donné que seulement trois patients sur 10 ont eu 70-80% d'amélioration des plaques après 4-6 mois de traitement et sept patients ont montré 50-65 % d'amélioration après 6-18 mois. Quant à la détermination de l'activité de la PhK, les résultats montrent que cette activité diminue dans l'ordre suivant : patients atteints non traités (1204 unités/mg protéines) > groupe traité avec calcipotriol (550,7 unités/mg protéines) > groupe traité avec curcumine (207,2 unités/mg protéines) > patients en bonne santé (105,4 unités/mg protéines). La parakératose psoriasiforme, considérée comme un marqueur de la proportion de kératinocytes immatures dans le *stratum corneum*, a montré une diminution significative dans le groupe de patients qui a reçu le traitement avec la curcumine. En effet, ce paramètre a diminué dans l'ordre suivant : patients atteints non traités (94,6%) > groupe traité avec calcipotriol (8,4%) > groupe traité avec curcumine (1,4%) (Heng *et al.*, 2000). À la lumière de ces résultats, les auteurs ont conclu que l'efficacité clinique de la curcumine semble être associée à sa capacité inhibitrice sur la PhK. Toutefois, les sites d'union sur cette enzyme n'ont pas encore été établis (Heng *et al.*, 2000).

Kurd et collaborateurs ont étudié l'effet des curcuminoïdes administrés par voie orale sur 18 patients atteints de psoriasis (Kurd *et al.*, 2008). Les patients choisis avaient au moins 18 ans et détenaient au minimum 6% de leur surface corporelle touchée par des plaques. Des patients avec psoriasis en gouttes, pustuleux, érythrodermique et inversé ont été exclus, aussi bien que ceux qui avaient utilisé des traitements systémiques trois mois avant le début de l'étude. Les résultats ont démontré un effet antipsoriasique plutôt bas des curcuminoïdes

chez les patients. Les auteurs l'ont attribué à la voie d'administration utilisée. En effet, l'administration orale de la curcumine a une très basse biodisponibilité chez les animaux et les humains (Holder *et al.*, 1978; Ireson *et al.*, 2002; Ravindranath and Chandrasekhara, 1980, 1981). Les auteurs ont suggéré d'utiliser la voie d'administration topique afin d'obtenir de meilleurs résultats par rapport à l'efficacité de ce composé (Kurd *et al.*, 2008).

Bien que quelques études expérimentales aient prouvé l'efficacité de la curcumine pour le traitement du psoriasis, il est à noter que certains articles démontrent que ce composé, lorsqu'administré sur la peau, peut produire des dermatites allergiques (Liddle *et al.*, 2006; Thompson and Tan, 2006). De plus, la curcumine administrée en grandes doses par voie cutanée peut augmenter la formation d'espèces réactives de l'oxygène, notamment de peroxyde d'hydrogène, devenant ainsi un agent prooxydant (Schallreuter and Rokos, 2006). Son application combinée avec l'EGCG génère un effet antagonique sur la différenciation des kératinocytes. Ainsi, l'EGCG augmente l'expression de l'involucrine tandis que la curcumine la diminue (Eckert *et al.*, 2004, 2006).

#### 1.15.5 Les polyphénols de l'écorce du pin maritime français (*Pinus pinaster*)

Les polyphénols de l'écorce du pin maritime français, sont commercialisés par différentes compagnies en tant qu'extraits naturels normalisés sous les noms de Pycnogénol<sup>®</sup>, d'Oligopin<sup>®</sup> ou encore de Flavangenol<sup>®</sup>. On considère que ces extraits se composent principalement de proanthocyanidines (étant constitués d'entre deux et douze unités de monomères de catéchine et d'épicatéchine) de la taxifoline, et des acides phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide coumarique et l'acide férulique (Saleem *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2007) (Figure 33).

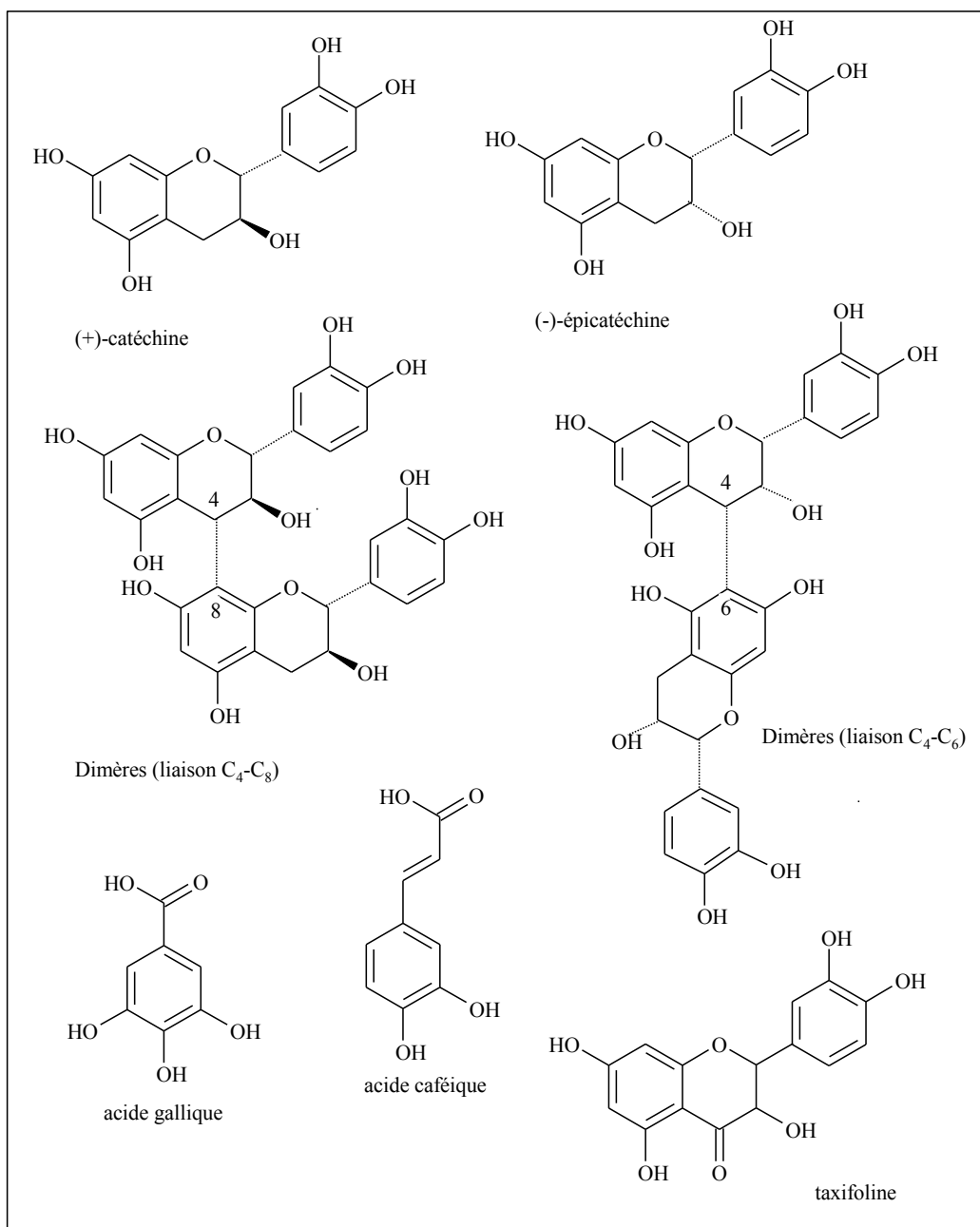


Figure 33 Quelques composés phénoliques identifiés dans l'extrait normalisé de l'écorce du pin maritime français. Tirée Weber *et al.*, 2007.

En raison de ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, le Pycnogénol<sup>®</sup> a été utilisé pour évaluer l'interaction des lymphocytes T et des kératinocytes suite à leur activation avec l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Bito *et al.*, 2000). Les résultats ont montré que, après l'addition de Pycnogénol<sup>®</sup>, l'adhésion des lymphocytes T aux kératinocytes induite par IFN- $\gamma$  fût supprimée via l'inhibition de l'expression de la molécule d'adhésion



intercellulaire (ICAM-1) (Bito *et al.*, 2000). L'ICAM-1 est une immunoglobuline impliquée dans la reconnaissance des antigènes ainsi que dans le phénomène d'adhésion cellulaire. L'INF- $\gamma$  induit dans des kératinocytes humains l'expression d'ICAM-1 ce qui est considéré comme une étape critique dans le processus inflammatoire cutané (Caughman *et al.*, 1992). Une augmentation de l'expression d'ICAM-1 a été démontrée dans des conditions d'inflammation cutanée, par exemple dans le psoriasis (Bennion *et al.*, 1995). D'ailleurs, les lymphocytes T jouent un rôle clé dans le maintien de la maladie. À la lumière des résultats obtenus, les auteurs ont suggéré que le Pycnogénol<sup>®</sup> possédait un potentiel thérapeutique contre les maladies de la peau où l'inflammation et l'adhésion cellulaire sont présentes, voire le psoriasis (Bito *et al.*, 2000).

Une diminution importante de l'expression de gènes codant pour les calgranulines A et B dans la lignée de kératinocytes immortalisés HaCaT, a aussi été observée par d'autres chercheurs suite à l'administration de Pycnogénol<sup>®</sup> (Rihn *et al.*, 2001). En effet, ces protéines, de faible poids moléculaire et liées au calcium, ont été détectées anormalement dans les kératinocytes psoriasiques (Carlsson *et al.*, 2005; Madsen *et al.*, 1991). Les résultats de cette étude ont suggéré que le Pycnogénol<sup>®</sup> pourrait être employé comme une alternative thérapeutique pour le traitement du psoriasis (Rihn *et al.*, 2001).

Les protéines kinases jouent un rôle clé dans la régulation de différents processus cellulaires d'importance cruciale pour les cellules des mammifères tels que l'inflammation, la prolifération et l'activation de facteurs de transcription. La phosphorylation des protéines est considérée comme l'un des moyens de moduler l'activité biologique d'une manière rapide et réversible. En général, les patients atteints de psoriasis possèdent une activité augmentée de la PhK et de la PKC (Heng *et al.*, 1994). Ainsi, il est supposé qu'un produit capable de diminuer l'activité de ces enzymes pourrait être considéré comme un candidat possible pour le traitement du psoriasis. De ce fait, l'effet sur l'activité de la PhK et la PKC du Pycnogénol<sup>®</sup> et d'un de ses constituants, l'acide caféique, ont été évalués (Nardini *et al.*, 2000). Les résultats ont montré que les deux composés ont inhibé fortement l'activité de PhK, le Pycnogénol<sup>®</sup> étant l'inhibiteur le plus puissant ( $ID_{50}=15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  correspondant à  $51 \mu\text{M}$  de catéchines). Par rapport à la PKC, les deux produits testés ont montré une bonne activité inhibitrice, mais le Pycnogénol<sup>®</sup> était également le plus puissant. Une inhibition presque complète de l'activité de la PKC a été observée à une concentration de

Pycnogénol<sup>®</sup> de 80 µg.mL<sup>-1</sup> (Nardini *et al.*, 2000). Ces résultats démontrent que l'acide caféique est donc un constituant actif du Pycnogénol<sup>®</sup>. L'effet supérieur du Pycnogénol<sup>®</sup> en tant qu'inhibiteur prouve que l'extrait possède d'autres constituants actifs qui ont une interaction synergique avec l'acide caféique sur l'activité des protéines kinases. Ces résultats contribuent à améliorer notre compréhension par rapport aux activités antiprolifératives du Pycnogénol<sup>®</sup>, à travers la régulation de l'activité de la PhK et la PKC.

### **1.16 Forces et faiblesses au regard de l'utilisation des polyphénols pour le traitement du psoriasis**

Si l'on fait une analyse globale des études qui ont suggéré l'utilisation des polyphénols pour le traitement du psoriasis, on pourra retenir que les publications sont relativement récentes, presque toutes comprises entre les années 1990 et 2012. L'origine de cet intérêt semble être motivée par trois facteurs : a) les polyphénols sont aujourd'hui reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, antiprolifératives et anti-inflammatoires; b) le psoriasis est une maladie qui ne peut pas encore être complètement guérie, malgré les avancées obtenues; c) les thérapies actuellement disponibles sont limitées par leur efficacité et leur toxicité. En effet, les thérapies topiques et systémiques disponibles pour le traitement du psoriasis ne fonctionnent pas dans 100% des cas et peuvent induire des réactions indésirables pour les patients. Par ailleurs, les nouvelles thérapies biologiques augmentent le risque d'infections à long terme, étant aussi limitées par leur coût élevé. Ces aspects sont à la base d'une insatisfaction croissante des patients psoriasiques envers les traitements disponibles, ce qui s'accompagne d'une diminution significative de leur qualité de vie (Krueger *et al.*, 2001). Par conséquent, les patients, découragés, cherchent d'autres alternatives thérapeutiques non conventionnelles (Ben-Arye *et al.*, 2003). *Une analyse de l'impact du psoriasis sur la qualité de vie des patients aussi bien qu'une revue des traitements naturels antipsoriasiques récemment brevetés est présentée à l'annexe 1.*

La nature chronique de la maladie et la nécessité de compter sur des traitements efficaces, peu toxiques et abordables justifient l'utilisation d'alternatives thérapeutiques basées sur des produits naturellement disponibles, riches en polyphénols. De ce fait, il n'est pas surprenant que les patients atteints de psoriasis utilisent fréquemment des produits naturels à base de plantes afin de traiter leur maladie. Effectivement, l'utilisation non négligeable de

ces produits pour le traitement du psoriasis démontre l'importance d'établir des stratégies d'évaluation adéquates sur des bases scientifiques.

De nos jours, il est connu que les composés d'origine naturelle présentent une très grande diversité chimique comparativement aux composés synthétiques et un plus large éventail d'activités biologiques (Rollinger *et al.*, 2006). Selon une révision effectuée par Newman et collaborateurs par rapport aux produits naturels comme source de nouveaux médicaments entre 1981-2002, il existe quatre médicaments antipsoriasiques provenant de sources naturelles (Newman and Cragg, 2007; Newman *et al.*, 2003). Trois d'entre eux sont dérivés de plantes et modifiés par semi-synthèse et le dernier se fabrique entièrement par synthèse chimique; le pharmacophore étant une molécule d'origine naturelle. On sait qu'une de ces molécules est le psoralène (un dérivé de coumarine contenant un cycle de furane), obtenu à partir des semences de *Psoralea corylifolia*, lequel est utilisé dans la PUVA thérapie comme agent photosensibilisateur (Dewick, 1997). L'anthraline et l'acide salicylique sont d'autres exemples de produits naturels (polyphénols) présentement utilisés pour le traitement du psoriasis.

Une autre raison qui pourrait justifier les recherches utilisant des produits naturels riches en polyphénols est sans doute la nécessité de disposer de nouvelles molécules ciblant les processus impliqués dans la pathogenèse de la maladie. En effet, une des caractéristiques des polyphénols est leur multifonctionnalité leur permettant d'agir sur plusieurs cibles biologiques. Cette polyvalence quant à leur mécanisme d'action pourrait s'avérer un avantage pour le traitement du psoriasis surtout en considérant que dans cette maladie, plus d'une quarantaine d'événements cellulaires sont en cause. Or, si l'on fait une analyse de la capacité des polyphénols à inhiber les actions du TNF- $\alpha$ , il est possible de constater que le mécanisme d'action qui a été décrit jusqu'à maintenant présente quelques différences comparativement à celui des médicaments biologiques. En effet, les polyphénols semblent agir en inhibant fondamentalement la signalisation du sTNF- $\alpha$  après sa liaison au récepteur de type 1, sans affecter la signalisation du mTNF via le récepteur de type 2. Cette approche permettrait théoriquement d'inhiber les effets pathologiques du TNF tout en diminuant les effets toxiques qui se produisent par l'inhibition totale et parfois irréversible du TNF avec les médicaments biologiques (Van Hauwermeiren *et al.*, 2011). Toutefois, d'autres études

doivent encore être effectuées afin de déterminer les avantages et inconvénients reliés à l'utilisation des polyphénols comme agents anti-TNF- $\alpha$  pour le traitement du psoriasis.

En effet, il reste beaucoup de travail à faire dans la recherche de nouveaux candidats thérapeutiques polyphénoliques pour le traitement du psoriasis et l'on doit encore considérer la plupart des études rapportées comme étant non conclusives. Ainsi, jusqu'à présent quelques faiblesses peuvent être remarquées dans les recherches exécutées. L'une de ces déficiences dans les études *in vitro* effectuées est précisément l'utilisation de modèles peu représentatifs de la maladie. Effectivement, la plupart des études réalisées en utilisant des polyphénols ont utilisé des cellules normales ou des enzymes isolées, donc les résultats obtenus ne pourront probablement pas être extrapolables aux cellules psoriasiques lesquelles présentent plusieurs différences (phénotypiques, fonctionnelles et génétiques) comparativement aux cellules normales. Par ailleurs, le fait que le psoriasis soit une maladie multicausale rend difficiles les comparaisons entre les résultats des recherches *in vitro* puisque plusieurs voies de signalisation et de récepteurs moléculaires ont été étudiés.

Quant aux études réalisées avec des modèles animaux, ces dernières ne pourront probablement pas être directement transférables au psoriasis humain dans le but de développer de nouveaux médicaments antipsoriasiques, compte tenu des différences qui existent entre la peau humaine et animale et des limites inhérentes à ces modèles. *Une révision complète des défis reliés au développement de nouveaux produits antipsoriasiques est présentée à l'annexe 1.*

Des problèmes méthodologiques d'études cliniques utilisant des polyphénols pour le traitement du psoriasis peuvent également être appréciés. Ainsi, plusieurs études n'ont pas de comparaison adéquate avec un traitement standard de référence, ce qui empêche de démontrer les avantages du nouveau traitement comparativement aux thérapies existantes. De plus, dans plusieurs études, le nombre de patients est insuffisant, ce qui limite la puissance statistique des essais et la probabilité d'obtenir des résultats statistiquement significatifs suite aux traitements avec des composés polyphénoliques. En outre, les études cliniques qui ont été effectuées avec les polyphénols sont majoritairement des études à court terme, ce qui est contradictoire avec le traitement à long terme requis dans le psoriasis. De plus, quelques études cliniques effectuées ne tiennent pas compte des résultats

d'études précédentes de biodisponibilité. De ce fait, on ne sait pas si l'absence d'efficacité thérapeutique des produits polyphénoliques étudiés est due à la faible biodisponibilité ou à l'incapacité des produits d'agir sur les voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse de cette maladie. En effet, une des particularités de certains polyphénols (p.ex. le resvératrol) est sa faible biodisponibilité par voie orale. Plusieurs études montrent que 70 % du resvératrol est absorbé dans l'intestin, apparaissant à l'état de trace dans le plasma sanguin 30 min après ingestion (Walle *et al.*, 2004 ; Boocock *et al.*, 2007). La formation des métabolites comme le resvératrol-3-*O*-glucuronide (ou 4'-*O*-glucuronide), semble être reliée au rôle bénéfique de ce composé sur la santé humaine (Wang *et al.*, 2004). Par voie topique, très peu de recherches sont disponibles concernant la biodisponibilité des polyphénols. Dans une étude récemment effectuée, l'absorption percutanée de 3 polyphénols (catéchine, resvératrol et curcumine) sur la peau de l'oreille de porc a été vérifiée (Abla and Banga, 2012). Les résultats ont montré que les polyphénols analysés ont pénétré la peau à partir du véhicule propylène glycol. L'ordre de la quantité de ces composés dans le *stratum corneum* était catéchine > resvératrol > curcumine. Sur la quantité totale des polyphénols dans la peau, environ 90% ont été retenus dans le *stratum corneum* (Abla and Banga, 2012). Les résultats de ce travail ont suggéré que les polyphénols s'accumulent préférentiellement dans le *stratum corneum*, d'où ils sont rélargués vers l'épiderme viable, ce qui permettrait l'administration topique de ces composés au sein des formulations pour des applications cosmétiques ou pharmacologiques.

Dans le futur, le travail scientifique réalisé avec les extraits naturels polyphénoliques pourra probablement conduire au développement de nouveaux produits antipsoriasiques fiables et rigoureusement caractérisés. En fait, la nature chimique complexe des extraits naturels, leur richesse structurale et la possibilité que les molécules qui les composent puissent agir en synergie, pourraient constituer un avantage pour le traitement du psoriasis. Toutefois, l'utilisation des extraits en tant que nouveaux produits antipsoriasiques impose des défis additionnels surtout au niveau de l'assurance de la qualité des nouvelles formulations. Ainsi, la planification de stratégies adéquates de normalisation chimique des extraits seuls et au sein des formulations s'avère une étape essentielle pour le développement de ces nouveaux produits. Les évaluations toxicologiques des extraits polyphénoliques qui seront

utilisés par voie topique avant d'être exposés à la peau psoriasique aussi bien que la réalisation d'études pertinentes de biodisponibilité cutanée, seront également très importantes dans le futur afin de minimiser les effets indésirables et de garantir l'efficacité thérapeutique de ces nouveaux produits (Thornfeldt, 2005; Zhou *et al.*, 2004). On apprécie également la nécessité d'effectuer plus d'études épidémiologiques auprès de populations diverses mettant en jeu l'incidence de la maladie et les facteurs génétiques, environnementaux aussi bien que les habitudes diététiques et l'utilisation de produits naturels contenant des polyphénols. Ces dernières pourraient fournir quelques pistes additionnelles nous permettant de mieux comprendre pourquoi l'incidence de la maladie est beaucoup plus grande chez les Caucasiens que chez les Africains, les Asiatiques ou les Indiens.

### 1.17 Objectifs de la recherche

Ce travail de thèse a pour objectif général d'étudier l'action pharmacologique d'extraits polyphénoliques issus d'écorces d'essences industrielles canadiennes pour le traitement du psoriasis. Pour ce faire, nous avons suivi une démarche expérimentale multidisciplinaire nous permettant de:

1. Identifier l'extrait brut polyphénolique le plus prometteur parmi plusieurs extraits obtenus à partir d'écorces de quatre essences industrielles canadiennes, à savoir le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*), le sapin baumier (*Abies balsamea*), le pin gris (*Pinus banksiana*) et l'épinette noire (*Picea mariana*)
2. Effectuer la purification de l'extrait brut le plus prometteur et déterminer la structure moléculaire des composés majoritaires présents dans l'extrait purifié
3. Déterminer l'effet pharmacologique de l'extrait purifié sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$  en utilisant un modèle en monocouche essentiellement psoriasique

#### **Identifier l'extrait brut polyphénolique le plus prometteur**

En sachant que le psoriasis implique le déséquilibre des mécanismes de protection antioxydants aussi bien que l'hyperprolifération des kératinocytes, dans cette première étude nous nous sommes proposés d'étudier les propriétés antioxydantes, toxiques et antiprolifératives d'extraits bruts polyphénoliques issus d'écorces de quatre essences industrielles canadiennes (bouleau jaune, épinette noire, sapin baumier et pin gris) en les comparant à celles du produit commercial Oligopin<sup>®</sup> obtenu à partir de l'écorce du *Pin maritime* français. À l'aide des méthodes spectrophotométriques, nous avons également déterminé dans cette étude les taux en polyphénols totaux, flavonoïdes, acides phénoliques et proanthocyanidines dans ces extraits bruts, lesquels ont été obtenus en utilisant deux protocoles d'extraction, à savoir la macération utilisant un mélange éthanol/eau (90:10 v:v) et l'extraction à l'eau chaude.

**Effectuer la purification de l'extrait brut le plus prometteur et déterminer la structure moléculaire des composés majoritaires présents dans l'extrait purifié**

En tenant compte de l'importance de la caractérisation chimique pour l'utilisation rationnelle d'extraits polyphénoliques pouvant faire partie de la formulation de nouveaux produits antipsoriasiques, nous nous sommes proposés, dans cette deuxième étude, d'effectuer une purification de l'extrait brut le plus prometteur à l'aide d'une extraction liquide-liquide dans le but de produire une fraction enrichie en polyphénols. Par la suite, nous avons effectué l'isolement et la quantification des molécules majoritaires contenues dans cette fraction par flash chromatographie et par chromatographie en phase liquide à haute performance. Puis, la structure moléculaire des molécules isolées a été déterminée par spectrométrie de masse et par spectroscopie de RMN.

**Déterminer l'effet pharmacologique de l'extrait purifié sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$  en utilisant un modèle en monocouche proprement psoriasique**

En sachant que le TNF- $\alpha$  joue un rôle central dans la pathogenèse du psoriasis et que jusqu'à maintenant les études *in vitro* menées en utilisant des polyphénols sur les kératinocytes ont été réalisées en utilisant des cellules normales ou immortalisées, dans cette troisième étude nous nous sommes proposés d'étudier l'effet pharmacologique de l'extrait purifié sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$  en utilisant un modèle en monocouche essentiellement psoriasique. Des techniques telles que l'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), le RT-PCR (*reverse transcriptase PCR*) et l'immunobuvardage ont été mises à profit pour déterminer l'action de cet extrait sur: a) la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, CX3CL1/fractalkine ; b) l'expression d'ICAM-1; c) la production de VEGF; d) la production de monoxyde d'azote ; e) la production de l'élafine et enfin f) l'activation de NF- $\kappa$ B au sein des kératinocytes psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$ . Dans plusieurs cas, les résultats ont été comparés à ceux obtenus en utilisant des kératinocytes normaux.



**Chapitre 2. Propriétés antioxydantes, toxiques et antiprolifératives d'extraits polyphénoliques issus d'essences canadiennes sur des kératinocytes normaux et psoriasiques**

## 2.1 Avant-propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé *Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes* qui a été publié dans le *Journal of Ethnopharmacology* 132:251-258, 2010.

J'ai réalisé la majorité des expériences de ce projet. J'ai effectué le séchage, broyage et tamisage des écorces de 4 essences canadiennes. J'ai déposé des témoins dans l'herbier Louis Marie et ai fait les extractions utilisant différents protocoles d'extraction. Par ailleurs, j'ai déterminé les différentes classes de composés polyphénoliques dans les extraits. Les analyses concernant la réactivité chimique de l'extrait par différentes méthodes physicochimiques ont été réalisées en collaboration avec Mariana Royer et Papa Niokhor Diouf. La toxicité des extraits et l'analyse des propriétés antiprolifératives ont été réalisées en collaboration avec Alexandra Duque-Fernandez. Finalement, j'ai rédigé l'article sous la supervision du Dre Tatjana Stevanovic et du Dre Roxane Pouliot.

## 2.2 Résumé

Dans cette étude, nous nous sommes proposé d'établir pour la première fois la possible utilisation d'extraits polyphénoliques obtenus à partir d'écorces d'essences canadiennes pour le traitement du psoriasis. Pour ce faire nous avons étudié: a) leurs capacités antioxydantes; b) leurs propriétés toxicologiques sur les kératinocytes normaux humains et enfin c) leurs effets sur la croissance des kératinocytes normaux et psoriasiques. Les extraits polyphénoliques ont été obtenus en utilisant deux protocoles d'extraction, soit la macération et l'extraction à l'eau chaude. La capacité des extraits à piéger des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote telles: le peroxyde d'hydrogène, le monoxyde d'azote, l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyle et peroxyde, a été analysée à l'aide de méthodes spectrophotométriques. La méthode du MTT et le test d'exclusion du bleu trypan ont été utilisés pour évaluer la toxicité initiale des extraits les plus antioxydants sur les kératinocytes normaux après 24 et 48 h d'exposition. Les effets de ces extraits sur la croissance des kératinocytes normaux et psoriasiques, à des concentrations inférieures à la dose minimale toxique, ont été également déterminés après 48 h d'exposition. L'extrait brut de bouleau jaune obtenu par macération et celui d'épinette noire (*Picea mariana*) obtenu par extraction à l'eau chaude (BS<sub>HWE</sub>) ont présenté la capacité antioxydante la plus élevée parmi les extraits analysés, mais BS<sub>HWE</sub> a été le moins toxique. La toxicité initiale des extraits sur les kératinocytes normaux par le test d'exclusion du bleu trypan et par la méthode de MTT après 24 h, a été attribuée à la teneur en acides hydroxycinnamiques et en proanthocyanidines dans les extraits. L'extrait BS<sub>HWE</sub>, a inhibé la croissance des kératinocytes normaux humains et des kératinocytes psoriasiques non-lésionnels, mais il n'a pas montré d'effets antiprolifératifs sur les kératinocytes psoriasiques lésionnels. Du fait que BS<sub>HWE</sub> ait présenté une teneur élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes, tout en montrant une plus faible toxicité sur les kératinocytes normaux humains ainsi qu'une adéquate réactivité chimique vers différents espèces réactives de l'oxygène et de l'azote comparativement aux autres extraits étudiés, ce dernier a été considéré comme étant l'extrait brut le plus prometteur obtenu à partir d'essences canadiennes.

## 2.3 Article

# **Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes**

Martha-Estrella García-Pérez<sup>1,2</sup>, Mariana Royer<sup>2</sup>, Alexandra Duque-Fernandez<sup>1</sup>, Papa Niokhor Diouf<sup>2,3</sup>, Tatjana Stevanovic<sup>2</sup>, Roxane Pouliot<sup>1</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Centre LOEX de l'Université Laval, Génie tissulaire et régénération: LOEX - Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec, Aile-R, 1401 18<sup>e</sup> rue, Québec, Qc, Canada, G1J 1Z4 and Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6. <sup>2</sup> Centre de Recherche sur le Bois, Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6. <sup>3</sup> Service de Recherche et d'Expertise en Transformation des Produits Forestiers (SEREX), 25 rue Armand-Sinclair, porte 5, Amqui, QC, G5J 1K3

### **Address for reprint requests:**

Roxane Pouliot, Ph.D

Centre LOEX de l'Université Laval, Génie tissulaire et régénération: LOEX - Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec, Aile-R, 1401 18<sup>e</sup> rue, Québec, Qc, Canada, G1J 1Z4 and Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6. (1) 418 990 8255 ext. 1706. Fax: (1) 418 990 8248

E-mail address: [roxane.pouliot@pha.ulaval.ca](mailto:roxane.pouliot@pha.ulaval.ca)

### 2.3.1 Abstract

In a first attempt for establishing the possible utilization of polyphenolic extracts from barks of Canadian species in psoriasis treatment, we aimed to study a) their antioxidant capacity b) their toxicological properties on normal human keratinocytes c) their effect on the growth of normal and psoriatic keratinocytes. Polyphenolic extracts were obtained by maceration and hot water extraction. Scavenging capacity was evaluated towards hydrogen peroxide, hydroxyl, superoxide, nitric oxide and peroxy radicals. MTT assay and Trypan blue dye exclusion method were used for evaluating the initial toxicity of the most antioxidant extracts on normal human keratinocytes during 24 and 48 h. The effects of extracts on the growth of normal and psoriatic keratinocytes at non-toxic concentrations were determined after exposure for 48 h. Yellow birch crude extract obtained by maceration (YB<sub>Mac</sub>) and black spruce crude extract obtained by hot water extraction (BS<sub>HWE</sub>) were determined to have the highest antioxidant capacity, but BS<sub>HWE</sub> was less toxic on normal keratinocytes. Toxicity of extracts by MTT and trypan blue dye exclusion methods after 24 h was attributed to their content of hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins. BS<sub>HWE</sub> inhibited the growth of normal and non-lesional psoriatic keratinocytes, but was not selective for lesional psoriatic keratinocytes. Given that the black spruce crude extract obtained by hot water extraction presented an elevated content of total phenols and flavonoids and showed a low toxicity on normal keratinocytes as well as an adequate chemical reactivity towards different radicals, it was considered as the most valuable crude extract obtained from barks of Canadian species.

### 2.3.2 Introduction

Psoriasis is a common, chronic, recurring disorder with well-characterized macroscopic skin alterations affecting 2% of the world's population (Schon and Boehncke, 2005). Two fundamentally different cell types interact in the formation of a psoriatic lesion: epidermal keratinocytes and mononuclear leukocytes. The factors produced by keratinocytes that directly affect T cells and antigen presenting cells and vice versa have been suggested as potentially responsible of the pathogenesis of this skin disorder (Lowes *et al.*, 2007).

Scientific information also supports the view that an insufficient antioxidant system contributes to the psoriasis pathogenesis (Zhou *et al.*, 2009). In psoriatic skin context, reactive species are generated by keratinocytes and activated leukocytes, mostly neutrophils (Pelle *et al.*, 2005). Lactoferrin released by specific neutrophil granules can promote neutrophil-endothelial cell adhesion and, as a source of iron, may promote the Fenton reaction with the generation of the hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Rocha-Pereira *et al.*, 2004). The increased levels of other reactive species, such as nitric oxide ( $\text{NO}^\bullet$ ) have been determined in skin of psoriatic patients (Ormerod *et al.*, 1998). Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and superoxide anion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) can be generated by the action of the enzyme xanthine oxidase, which displays a higher activity in psoriatic epidermis (Kizaki *et al.*, 1977). Additionally, cytokines such as tumor necrosis factor alpha can contribute to  $\text{H}_2\text{O}_2$  production (Young *et al.*, 2008). Psoriatic skin is also characterized by an advanced state of lipid peroxidation (Yildirim *et al.*, 2003). Thus, it has been suggested that the antioxidant treatment could be part of a more specific and effective therapy for the management of this skin disease (Young *et al.*, 2008).

Although recent focus of studying therapeutic targets in psoriasis has shifted to a model dealing with multi-factors, it is generally acknowledged that hyperproliferation of keratinocytes is a hallmark of this disease. Many of the current topical therapies such as dithranol and vitamin D analogues focus on the arrest of keratinocytes hyperproliferation (Mason *et al.*, 2002); however their utilization has been associated with unpleasant side effects and practical difficulties for patients (Mason *et al.*, 2002). Therefore, the

identification of new antiproliferative agents with low toxicity remains important and represents an area of active research.

Natural polyphenols, recognized as potent antioxidants, are multifunctional molecules that can act as anti-inflammatory (Grimm *et al.*, 2006) and anti-proliferative agents (Lizarraga *et al.*, 2007) through the modulation of multiple signaling pathways. This characteristic could be advantageous for the treatment of multi-causal diseases, such as psoriasis. Polyphenols are ubiquitous constituents of plants and in the forest trees they are mainly available from barks (Mattew *et al.*, 1997). Standardized French maritime pine (*Pinus pinaster* Sol.) bark extract (PBE), a mixture particularly rich in polyphenolic compounds, has been suggested as potentially useful for the treatment of psoriasis. PBE has shown to downregulate calgranulin A and B genes in HaCaT keratinocytes (Rihn *et al.*, 2001) and to inhibit interferon-gamma induced adhesion of T cells to keratinocytes by inhibiting inducible inter-cellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (Bito *et al.*, 2000).

Some reports show that North American natives made extensive use of barks and resins from trees for treating dermatological conditions (Chandler *et al.*, 1979; Moerman 1998; Foster and Duke 1990). For instance, a poultice of the inner bark of black spruce (*Picea mariana* (Miller) B.S.P) was used as a topical anti-inflammatory (Foster and Duke, 1990). The resin obtained from balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) was considered as a healing agent for the treatment of burns, bruises, ulcers, wounds and sores (Foster and Duke, 1990). The inner bark of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.), was also applied as a poultice in the treatment of deep cuts (Moerman, 1998). Birch tar oil from the bark of birch species was used for treating psoriasis (Weigand, 1999). Although evidence exists about the traditional use of barks from Canadian wood species in the treatment of dermatological conditions, to the best of our knowledge, there are currently no studies available demonstrating their toxicity and/or antiproliferative properties on skin-related cells.

Taking into account the ethnomedical use of barks from Canadian wood species by North American native peoples as a part of topical preparations and the fact that their biological properties remain largely uninvestigated, the present study aimed to study: a) the antioxidant activities of ethanolic and hot water extracts from barks of Canadian wood species; b) the toxicological effects of the extracts with highest antioxidant capacities on

normal human keratinocytes over a period of 24 and 48 h; c) the antiproliferative properties of these extracts on the growth of normal and lesional and non-lesional psoriatic keratinocytes. In addition, the antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of crude extracts from barks of Canadian species were compared with those of the standardized French maritime pine bark extract (Oligopin<sup>®</sup>).



### 2.3.3 Materials and Methods

#### **Medicinal materials**

Barks of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton, YB), black spruce (*Picea mariana* (Miller) B.S.P, BS), balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill., BF) and jack pine (*Pinus banksiana* Lamb., JP) were from St-Lambert de Lauzon, Chaudière-Appalaches region, Quebec, Canada and were identified by Alain Cloutier Ph.D., Professor of wood anatomy at Université Laval. Voucher specimens were deposited in the herbarium Louis-Marie of Université Laval, Québec, QC, Canada with reference numbers: QFA 0579233, QFA 0579234, QFA 0579231, and QFA 0579232 respectively.

#### **Preparation of crude extracts**

##### *Maceration*

Twenty grams of oven dry and ground (40-60 mesh) barks were extracted with 90% aqueous ethanol (200 mL) (Fisher Scientific Chemicals, Tustin, CA, USA) under continuous shaking (220 rpm) for 24 hours at room temperature as described by Diouf et al. (2009b).

##### *Hot water extraction*

Fifty grams of oven dry ground (40-60 mesh) barks were first extracted with 500 mL water under reflux for 1 hour and solids were separated by filtration with a Whatman No.4 filter paper and washed with 500 mL of hot water. The aqueous filtrate (1 L) was freeze-dried to yield crude extracts.

#### **Crude extracts composition**

##### *Determination of total phenol content*

Total phenol contents of crude extracts were determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu method as previously described by Diouf *et al.*, (2009b). Total phenol content was expressed as milligrams of gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) equivalents (GAE) per gram of dry extract (mg GAE/g dry extract).

#### *Determination of total flavonoid content*

The total flavonoid content of crude extracts was determined spectrophotometrically following the method described by Brighente *et al.*, (2007). Results were expressed as milligrams of quercetin (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, USA) equivalents (QE) per gram of dry extract (mg QE/g of dry extract).

#### *Determination of total hydroxycinnamic acids content*

Total hydroxycinnamic acid content was determined as described in European Pharmacopoeia (4<sup>th</sup> end, 2002) for *Fraxini folium*. Total hydroxycinnamic acid content was expressed as milligrams of chlorogenic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) equivalents (ChAE) per gram of dry extract (mg ChAE/g of dry extract).

#### *Determination of proanthocyanidin content*

Anthocyanidin formation in a hydrochloric medium with ferric ammonium sulphate (Laboratoire MAT, Québec, QC, Canada) as a catalyst was performed as described by Porter *et al.*, (1986). The proanthocyanidin content was expressed as milligrams of cyanidin chloride (Indofine Chemical Co, Hillsborough, NJ, USA) equivalents (CChE) per gram of dry extract (mg CChE/g of dry extract).

### **Antioxidant activity of extracts**

#### *General*

Extracts from barks of Canadian wood species were screened for their antioxidant capacities by using a battery of *in vitro* assays. In all tests (excluding that measuring peroxy radical scavenging activity) the percentage of scavenging was calculated according to the equation (1):

$$\% \text{ Scavenging} = 100 \times \frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{extract}})}{A_{\text{control}}} \quad (1)$$

where  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of the mixture without extract,  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the mixture with the extract and  $A_{\text{extract}}$  is the absorbance of the extract.

The effective concentration required to scavenge by half the formation of reactive species ( $EC_{50}$ ) was estimated using a non-linear regression algorithm. Lower is the  $EC_{50}$  value, the more efficient is the extract. Standardized French maritime pine bark extract (Oligopin<sup>®</sup>) (DRT Nutraceutics, Dax, France), well-known for its antioxidant properties (Pietta *et al.*, 1998), was used in all tests as a positive control. All analyses were done in triplicates and average values are presented.

#### *Superoxide anion radical scavenging activity*

Superoxide anion scavenging activity of extracts at concentrations ranging from 100 to 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  was determined as described by Nishimiki *et al.* (1972) with slight modifications. Briefly, 1 mL of a solution of nitroblue tetrazolium (100  $\mu\text{mol}$  in phosphate buffer, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was mixed with 1 mL of  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide solution (468  $\mu\text{mol}$  in phosphate buffer, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1 mL of the dried extracts dissolved in 50% of aqueous methanol. The reaction started by adding 100  $\mu\text{L}$  of phenazine methosulphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution (60  $\mu\text{mol}$  in phosphate buffer, pH 7.4). The reaction mixture was incubated at 30 °C for 15 min and the absorbance at 560 nm was measured.

#### *Hydrogen peroxide scavenging activity*

The ability of extracts to scavenge  $\text{H}_2\text{O}_2$  was determined at concentrations ranging from 10 to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  according to the method of Ruch *et al.* (1989) with slight modifications. Dried extracts (3.4 mL) dissolved in phosphate buffered saline (pH 7.4) were mixed with 0.6 mL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (40 mM). Ten minutes later, absorbance was determined at 230 nm.

#### *Hydroxyl radical scavenging activity in salicylic acid system*

Hydroxyl radical scavenging activity of extracts was measured as described by Smirnoff and Cumbes, (1996) with slight modifications. Two mL of extracts at concentrations ranging from 200 to 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 0.6 mL of 8 mM ferrous sulphate (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA), 0.5 mL of 20 mM hydrogen peroxide (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) and 2 mL of 3 mM salicylic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were mixed and incubated at 37 °C for 30 minutes. Then, 0.9 mL of distilled water were added to each vials and final solution was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min. After centrifugation, the absorbance was measured at 510 nm.

#### *Nitric oxide-radical scavenging activity*

The NO-scavenging activity of extracts was determined by the method of Sreejayan and Rao. (1997) with slight modifications. Briefly, 375 µL of serial diluted extracts (100-2000 µg/mL) were mixed with 25 mM sodium nitroprusside (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) dissolved in PBS (pH 7.4). The mixture was incubated at 37 °C for 2.5 hours. After incubation, samples were placed in dark for 20 minutes. Thereafter, 750 µL of Griess reagent (Fluka, Ronkonkoma, NY, USA) was added and the absorbance at 548 nm was recorded after 40 min at room temperature. For this test, curcumin a well-known nitric oxide scavenger, was also used as a standard reference.

#### *Peroxyl radical scavenging activity*

Peroxyl radical scavenging activity was measured by the inhibition of pyrogallol red (PGR) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oxidation by the peroxyl radicals generated from 2,2'-azo-bis-2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described by Lopez-Alarcón and Lissi. (2005). The percentage of scavenging was calculated according to equation (2):

$$\% \text{ Scavenging} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{sample blank}} - A_{\text{sample test}}}{A_{\text{control blank}} - A_{\text{control test}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

where  $A_{\text{sample blank}}$  is the absorbance of the mixture without AAPH;  $A_{\text{sample test}}$  is the absorbance of the mixture with the extract and AAPH;  $A_{\text{control blank}}$  is the absorbance of

the mixture without the extract and AAPH, whereas Acontrol test is the absorbance recorded for the mixture without extracts.

### **Toxicological evaluation of the extracts with highest antioxidant capacity on normal human keratinocytes**

#### *General*

The toxicological evaluation of the extracts with highest antioxidant capacity was performed by using two tests: the MTT assay and the dye exclusion test. In both tests, triplicate wells were incubated with fresh medium in the absence or presence of extracts or Oligopin<sup>®</sup> dissolved in cell culture medium containing 1% ethanol at 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Extracts dissolved in culture medium were filtered on 0.22  $\mu\text{m}$  Millex GV filters (Millipore, Nepean, ON, Canada) and exposed to keratinocytes during 24 and 48 hours. The main outcome criterion used for evaluating the extracts toxicity was the determination of the initial toxicity value (IC<sub>90</sub>). IC<sub>90</sub> represents the minimal toxic dose causing 10% reduction of cell viability compared with untreated cells, which were set to represent 100% of viability (Teepe et al., 1993). This value was estimated from dose-response curve, using a non-linear regression algorithm. Data were presented as means  $\pm$  standard deviation from three experiments.

#### *Culture cells*

Normal human keratinocytes (NHK) obtained from a breast reduction surgery at passage 1 were cultured ( $6.7 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) in the presence of a feeder layer of irradiated 3T3 mouse fibroblasts ( $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) in a combination of Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DMEM) with Ham's F12 (3:1) supplemented with 5% Fetal Clone II serum (Hyclone, Scarborough, ON, Canada), 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  insulin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 0.4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  hydrocortisone (Cedarlane, Hornby, ON, Canada),  $10^{-10}$  M cholera toxin (ICN Biochemical, Montréal, QC, Canada), 10 ng.mL<sup>-1</sup> human epidermal growth factor (EGF) (Austral Biological, San Ramon, CA), 100 UI.mL<sup>-1</sup> penicillin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  gentamicin (Schering, Pointe-Claire, QC, Canada). All cultures were incubated at 37 °C in an 8% CO<sub>2</sub> air atmosphere and changed

three times a week with the media previously described. At 80% confluence, keratinocytes were subsequently subcultured after differential dissociation of the feeder layers with 0.05% trypsin (Intergen, Toronto, ON, Canada)-0.01% ethylenediamine tetraacetic acid (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, USA) for 5 min. Cells at passage 3 were used in this study.

#### *MTT assay*

Normal human keratinocytes were plated into 96-well plates at  $1.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> with  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> of 3T3 feeders for 3 days until 70% confluence. Another series of feeder cells culture also seeded at  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> were used to further evaluate the contribution of irradiated cells to formazan formation. After 24 and 48 hours of exposition, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and a solution of methyl tetrazolium MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was added to each well during 2 hours. Then, culture medium (0.2 mL) was aspirated and replaced with an equal volume of acidic isopropanol (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) to dissolve the intracellular dark-blue formazan crystal formed. After a few minutes at room temperature, absorbance was read at 570 nm. The cytotoxicity to keratinocytes was then determined by subtracting the cell viability measured in keratinocyte + feeder culture with that in feeder-alone culture as described by Poon and Burd (2004).

#### *Trypan blue dye exclusion test*

Normal human keratinocytes were plated into 6-well plates at  $2.6 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> with  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> of 3T3 feeders for 5 days until 70% confluence. Another series of feeder cells culture also seeded at  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> were used to further estimate the contribution of irradiated cells. Cells were exposed to extracts and culture medium during 24 and 48 hours and then each well was trypsinized, centrifuged and concentrated in 500  $\mu\text{L}$ . Cells number contained in 100  $\mu\text{L}$  was further determined by using a Coulter counter (Beckman Coulter Z2, Mississauga, ON, Canada). Trypan bleu 0.4% (100  $\mu\text{L}$ ) was added for 2 minutes to an equal volume of cells suspension. Three randomly chosen visual fields were examined in each sample and dead (stained) and viable (unstained) cells counted

(approximately 80 cells per observation field) (Lee et al., 2005). The percentage of keratinocyte viable cells (KVC) was determined according to the equation (3):

$$\% KVC = 100 \times \frac{[\textit{live cells (K + 3T3)}] - [\textit{live cells (3T3)}]}{[\textit{dead + live cells (K + 3T3)}] - [\textit{dead + live cells (3T3)}]} \quad (3)$$

### **Anti-proliferative properties of extracts with highest antioxidant capacity on the growth of normal and psoriatic keratinocytes**

#### *Keratinocytes cell lines*

Lesional and non-lesional psoriatic keratinocytes (PK) at passage 1 were obtained from two 51 years-old Caucasian females' patients as described by Jean *et al.* (2009). The study was conducted in agreement with the Helsinki declaration and performed under the guidelines of the research ethics committee of the "Centre hospitalier affilié universitaire de Québec". Normal human keratinocytes obtained from a breast reduction surgery were used at passage 1. Psoriatic cells were seeded at  $1.3 \times 10^4$  keratinocytes/cm<sup>2</sup> on a lethally irradiated mouse 3T3 fibroblasts feeder layer and cultured as previously described. At 80% confluence, keratinocytes were trypsinized and subsequently subcultured. Cells at passage 3 were further used in order to determine the effect of natural extracts on the growth of keratinocytes.

#### *Effects of natural extracts on normal and psoriatic keratinocyte cell growth*

Keratinocytes were seeded at  $8.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> on a feeder layer of irradiated 3T3 mouse fibroblasts until 50% of confluence. At this time, medium was refreshed in the absence or presence of the extracts or Oligopin<sup>®</sup>. Extracts were prepared in cell culture medium containing 0.17% ethanol and added to cultured cells after filtration on 0.22 µm Millex GV filters at concentrations lower than IC<sub>90</sub> values. After the exposition to extracts during 48 hours, keratinocytes were trypsinized and counted using a Coulter counter (Beckman Coulter Z2, Mississauga, ON, Canada).

**Statistical analysis**

Experimental results were expressed as means  $\pm$  SD of three measurements. Results were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) ( $p < 0.05$ ) and means separated by Duncan's test. The non-parametric Spearman's correlation test was used for correlations ( $p < 0.05$ ). Differences in keratinocyte cell number after the extract exposition were compared to untreated cells and analyzed by Student's t-test ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed by using SAS program 8.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).



### 2.3.4 Results and discussion

#### Extraction yields and chemical composition of crude extracts from Canadian species obtained by maceration and hot water extraction

Extraction yields and chemical composition of crude extracts from Canadian wood species are presented in Table 14. In general, higher yields were obtained by hot water extraction (HWE) from all species, except for YB. These differences could be explained by the large differences in solubility of various compounds present in barks and by a higher mass transfer at high water temperature. In the case of YB, the high proportion of lipophilic compounds present in the bark of this specie (Krasutsky, 2006) could be responsible for the absence of significant differences in the extraction yields obtained by HWE.

Table 14 Extraction yields, total phenol content, flavonoids, hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins of crude extracts from Canadian species obtained by ethanolic maceration and hot water extraction

Extracts	Yields * (%)	Total Phen (mg GAE/g)	Total Flav (mg QE/ g)	Total CinnAc (mg ChAE/g)	PAs content (mg CChE/g)
YB <sub>Mac</sub>	9.29±0.72 <sup>c,d</sup>	314.98±7.83 <sup>c</sup>	17.14±1.51 <sup>d</sup>	140.40±3.13 <sup>b</sup>	43.04±5.62 <sup>b</sup>
YB <sub>HWE</sub>	6.99±0.89 <sup>c,d</sup>	309.07±8.55 <sup>c</sup>	3.35±0.08 <sup>g</sup>	121.94±2.28 <sup>d</sup>	29.95±0.71 <sup>c</sup>
BF <sub>Mac</sub>	13.48±0.35 <sup>b</sup>	182.08±7.69 <sup>e</sup>	19.06±0.17 <sup>c</sup>	82.98 ±1.92 <sup>g</sup>	12.89±1.17 <sup>d</sup>
BF <sub>HWE</sub>	28.87±3.47 <sup>a</sup>	44.01 ±0.34 <sup>f</sup>	8.60±0.80 <sup>f</sup>	58.89 ±1.77 <sup>h</sup>	4.33 ±0.21 <sup>e</sup>
JP <sub>Mac</sub>	6.97±0.28 <sup>c,d</sup>	232.58±2.36 <sup>d</sup>	39.87±0.57 <sup>b</sup>	106.76±3.05 <sup>e</sup>	17.08±1.36 <sup>d</sup>
JP <sub>HWE</sub>	34.21±1.37 <sup>a</sup>	30.75 ±0.48 <sup>g</sup>	10.66±0.46 <sup>c</sup>	54.2 ±0.49 <sup>i</sup>	4.58 ±0.16 <sup>e</sup>
BS <sub>Mac</sub>	5.25±0.54 <sup>d</sup>	193.06±4.21 <sup>e</sup>	16.05±0.17 <sup>d</sup>	129.63±3.67 <sup>c</sup>	13.73±0.50 <sup>d</sup>
BS <sub>HWE</sub>	9.96±0.08 <sup>b,c</sup>	404.29±4.04 <sup>b</sup>	53.40±1.05 <sup>a</sup>	90.28 ±0.92 <sup>f</sup>	11.78±0.11 <sup>d</sup>
Oligopin <sup>®</sup>	-	572.92±12.07 <sup>a</sup>	7.43±0.09 <sup>f</sup>	335.49±3.36 <sup>a</sup>	104.97±9.59 <sup>a</sup>

\*% (w.w<sup>-1</sup> dry bark) Means with different superscript letters in the same column are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA, followed by Duncan test). Total Phen = total phenols content; Total Flav = total flavonoid content; Total CinnAc = total hydroxycinnamic acids content, PAs content = proanthocyanidin content. YB<sub>Mac</sub> = yellow birch extract obtained by maceration; YB<sub>HWE</sub> = yellow birch obtained by hot water extraction; BF<sub>Mac</sub> = balsam fir extract obtained by maceration; BF<sub>HWE</sub> = balsam fir extract obtained by hot

water extraction; JP<sub>Mac</sub> = jack pine extract obtained by maceration; JP<sub>HWE</sub> = jack pine extract obtained by hot water extraction; BS<sub>Mac</sub> = black spruce extract obtained by maceration; BS<sub>HWE</sub> = black spruce extract obtained by hot water extraction

Table 14 shows that different solvents and extraction procedures changed the polyphenolic profile of the extracts. In general, maceration yielded higher content of total phenols (TPhen), flavonoids (Flav), hydroxycinnamic acids (CinnAc) and proanthocyanidines (PAs). These results are consistent with those obtained by Yu *et al.*, (2005) who studied the relation between extraction solvents (ethanol, methanol and hot water) and yields of phenols from peanut. Yellow birch extract (YB<sub>Mac</sub>) presented the highest contents of TPhen, CinnAc and PAs ( $p < 0.05$ ) between the extracts obtained by maceration whereas black spruce extract (BS<sub>HWE</sub>) presented the highest contents of total phenols and flavonoids by HWE ( $p < 0.05$ ).

According to Table 14, Oligopin<sup>®</sup> contains higher amounts of CinnAc, PAs and TPhen compared with extracts from Canadian species. The relative dilution of phenolic compounds with other compounds non-selectively extracted in crude extracts could influence the lower phenolic contents observed in extracts from Canadian species. Interestingly, BS<sub>HWE</sub> presented significantly higher amounts of flavonoids than Oligopin<sup>®</sup>. A significant quantity of taxifolin has been identified in oligomeric fraction (66.7 mg.g<sup>-1</sup> extract) of this extract (Diouf *et al.*, 2009a). Further analyses are needed in order to determine the nature of other flavonoids present in BS<sub>HWE</sub>.

### **Antioxidant capacity of crude extracts from Canadian species obtained by maceration and hot water extraction**

The results of antioxidant capacity of polyphenolic extracts from Canadian wood species and Oligopin<sup>®</sup> by using a battery of *in vitro* assays are presented in Table 15. These assays provide information about the intrinsic chemical reactivity of polyphenolic extracts towards different free radicals and oxidizing agents of biological relevance in psoriasis, irrespective of the physicochemical environments encountered in biological systems. In general, results obtained show that natural extracts respond in a different manner to different radical or

oxidant source which could be explained by their relative differences in polyphenolic chemical composition.

Table 15 Free radical scavenging activity of Canadian bark hot water and ethanolic extracts

Extracts	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	OH <sup>•</sup>	NO <sup>•</sup>	ROO <sup>•</sup>
	EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )
<b>YB</b> <sub>Mac</sub>	69.47±1.36 <sup>c</sup>	238.30±4.13 <sup>c</sup>	406.93±0.55 <sup>g</sup>	1505.66±265.25 <sup>b</sup>	914.42±8.81 <sup>c</sup>
<b>YB</b> <sub>HWE</sub>	68.45±0.39 <sup>c</sup>	296.30±5.67 <sup>d</sup>	858.85±0.94 <sup>b</sup>	1127.66±218.87 <sup>c,d</sup>	Not active*
<b>BF</b> <sub>Mac</sub>	102.67±1.13 <sup>b</sup>	962.80±3.12 <sup>a</sup>	917.58±2.96 <sup>a</sup>	Not active‡	933.15±9.76 <sup>b</sup>
<b>BF</b> <sub>HWE</sub>	93.25±0.98 <sup>c</sup>	812.36±6.73 <sup>b</sup>	Not active*	Not active‡	Not active*
<b>JP</b> <sub>Mac</sub>	72.05±0.96 <sup>d</sup>	773.96±2.63 <sup>c</sup>	645.49±1.17 <sup>e</sup>	889.33±151.06 <sup>d</sup>	Not active*
<b>JP</b> <sub>HWE</sub>	Not active†	Not active*	Not active*	Not active‡	Not active*
<b>BS</b> <sub>Mac</sub>	119.87±0.77 <sup>a</sup>	764.04±2.18 <sup>c</sup>	690.82±0.28 <sup>d</sup>	1475.66±48.41 <sup>b</sup>	780.17±1.21 <sup>d</sup>
<b>BS</b> <sub>HWE</sub>	48.30±0.80 <sup>f</sup>	107.4±1.73 <sup>f</sup>	694.04±0.44 <sup>c</sup>	1352.66±156.07 <sup>b,c</sup>	1116.77±7.71 <sup>a</sup>
<b>Oligopin</b> <sup>®</sup>	28.19±0.80 <sup>g</sup>	61.13±1.86 <sup>g</sup>	622.99±0.17 <sup>f</sup>	2083.33±196.29 <sup>a</sup>	452.23±1.60 <sup>e</sup>

Means with different letters in the same column are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA, followed by Duncan test) † EC<sub>50</sub> > 500 µg.mL<sup>-1</sup>, \* EC<sub>50</sub> > 2000 µg.mL<sup>-1</sup>, ‡ EC<sub>50</sub> > 3000 µg.mL<sup>-1</sup>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Hydrogen peroxyde radical scavenging activity, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> = Superoxyde anion radical scavenging activity, OH<sup>•</sup> = Hydroxyl radical scavenging activity, NO<sup>•</sup> = Nitric oxide-radical scavenging activity, ROO<sup>•</sup> = Peroxyl radical scavenging activity

EC<sub>50</sub> values presented in Table 15 demonstrated that YB<sub>Mac</sub> was the most effective extract to scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>•</sup> and the anion superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) between extracts obtained by maceration, whereas BS<sub>HWE</sub> showed the highest scavenging capacity between the extracts obtained by HWE ( $p < 0.05$ ). However, when extracts from Canadian species were exposed to NO<sup>•</sup> and peroxy (ROO<sup>•</sup>) radicals sources, the ranking of antioxidant activity changed. JP extract was the most efficient extract to scavenge the NO<sup>•</sup> between the extracts obtained by maceration while YB and BS extracts showed a comparable antioxidant capacity between the extracts obtained by HWE ( $p < 0.05$ ). BS extracts obtained by maceration and HWE were the most efficient to scavenge ROO<sup>•</sup> radical ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis also revealed that Oligopin<sup>®</sup> was the most efficient extract to scavenge the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and the ROO<sup>•</sup> radical compared to extracts from Canadian wood species ( $p < 0.05$ ). However, YB<sub>Mac</sub>

exhibited higher antioxidant activity towards  $\text{OH}^\bullet$  than Oligopin<sup>®</sup> and interestingly, most of the tested extracts from Canadian species showed higher scavenging activity than Oligopin<sup>®</sup> towards  $\text{NO}^\bullet$ . Other reports also show that  $\text{YB}_{\text{Mac}}$  and  $\text{BS}_{\text{HWE}}$  significantly reduce  $\text{NO}^\bullet$  production in RAW 264.5 macrophages stimulated with interferon-gamma and polysaccharide of *Salmonella typhimurium* (Diouf *et al.*, 2009 a,b). Taking into account that Oligopin<sup>®</sup> shows a low scavenging activity against the  $\text{NO}^\bullet$  radical ( $\text{EC}_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), curcumin, a well-known  $\text{NO}^\bullet$  scavenger, was used as a positive control for this test. All the extracts were less effective than curcumin ( $\text{EC}_{50} = 16.33 \pm 4.72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Overall, results obtained indicate that  $\text{YB}_{\text{Mac}}$  is the most efficient antioxidant extract obtained by maceration, whereas  $\text{BS}_{\text{HWE}}$  is the most efficient antioxidant extract obtained by HWE as comparing with other studied extracts from Canadian species.

In rationalizing the scavenging capacities of polyphenolic extracts in terms of phenolic class, it became clear from the Spearman's correlation data that the ability of extracts to scavenge  $\text{H}_2\text{O}_2$  was more strongly associated with TPhen ( $r = -0.87$ ;  $p < 0.001$ ) followed by PAs ( $r = -0.52$ ;  $p = 0.009$ ) and CinnAc contents ( $r = -0.40$ ;  $p = 0.049$ ). Similarly, the ability of extracts to scavenge  $\text{O}_2^{\bullet-}$  was strongly correlated with TPhen ( $r = -0.94$ ;  $p < 0.001$ ), whereas the content of CinnAc ( $r = -0.68$ ;  $p = 0.002$ ) and PAs ( $r = -0.60$ ;  $p = 0.002$ ) showed a weaker correlation with this activity. These results suggest that overall antioxidant effect towards the  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^{\bullet-}$  could be due to the synergistic influence of different phenolic classes present in the extracts. Other studies have also demonstrated that TPhen of extracts from *Glycyrrhiza glabra* and *Bahuinia racemosa* are strongly correlated with their scavenging capacity towards  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^{\bullet-}$  respectively (D'Angelo *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2005). The ability of the extracts studied here to scavenge the  $\text{OH}^\bullet$  was strongly correlated with the CinnAc content ( $r = -0.76$ ;  $p < 0.001$ ) and in a lower degree with PAs ( $r = -0.66$ ;  $p = 0.001$ ) and TPhen ( $r = -0.46$ ;  $p = 0.033$ ). These results are in agreement with those reported by Ohsugi *et al.* (1999) which demonstrated that phenolic acids were the most efficient  $\text{OH}^\bullet$  scavengers between the isolated polyphenols from *Rhodiola sacra*. The content of CinnAc was also correlated ( $r = -0.66$ ;  $p = 0.002$ ) with the capacity of extracts to scavenge the  $\text{ROO}^\bullet$  radical which is formed as a product of lipid peroxidation (Dix and Aikens, 1993). Hydroxycinnamic acid derivatives, bearing *ortho*-dihydroxyl and *ortho*-methoxyl groups

are remarkably active towards  $\text{ROO}^\bullet$  radical which has been explained by their ability to make easier the H-atom abstraction (Chen *et al.*, 2007). In this study, the  $\text{NO}^\bullet$  scavenging activity of the extracts presented no correlation with any of the phenolic compound types analyzed ( $p>0.05$ ). Further studies should be performed in order to determine if other polyphenolic substances not measured in this study, such as stilbènes, lignans or neolignans could be responsible for this activity.

### **Toxicological properties of the extracts with highest antioxidant capacity on human keratinocytes**

Previous studies have suggested that cultured human keratinocytes may be predictive of irritancy caused by various surfactants in human subjects (Korting *et al.*, 1994) and the data provided by this model have shown a good correlation with *in vivo* skin irritation (Benassi *et al.*, 2003; Wilhelm *et al.*, 2001). As considering that a successful drug candidate for psoriasis treatment should demonstrate a low toxicity at pharmacological concentrations (Pol *et al.*, 2003), the toxicological properties of the most efficient antioxidant extracts (YB<sub>Mac</sub> and BS<sub>HWE</sub>) and Oligopin<sup>®</sup> were evaluated on normal human keratinocytes (NHK) during 24 and 48 hours by MTT and Trypan blue dye exclusion (TBDE) methods through the determination of the initial toxicity value ( $\text{IC}_{90}$ ) (Teepe *et al.*, 1993). Toxicological properties of the vehicle used (cell culture medium containing 1% ethanol) was not found to have any significant effect on toxicity of keratinocytes by both methods (data not shown).

Results presented in Table 16 demonstrate that after 24 h, initial toxicities of YB<sub>Mac</sub> and Oligopin<sup>®</sup> were comparable as determined by MTT assay, whereas BS<sub>HWE</sub> was significantly less toxic ( $p<0.05$ ). After 48 h, toxicity of YB<sub>Mac</sub> and Oligopin<sup>®</sup> increased, whereas the initial toxicity values of BS<sub>HWE</sub> did not significantly vary. These results are in agreement with previous reports which demonstrated that the exposition during 48 h of 95% ethanolic extract from YB outer bark at  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  was highly toxic on RAW 264.7 macrophages, whereas BS<sub>HWE</sub> at  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  caused no toxicity on these cells (Diouf *et al.*, 2009 a,b).  $\text{IC}_{90}$  values determined by MTT assay during 24 h showed an inverse correlation with content of CinnAc ( $r=-0.75$   $p=0.0199$ ) and PAs ( $r=-0.73$   $p=0.0246$ ),

whereas after 48 h, a weaker inverse correlation was found with CinnAc content ( $r=-0.66$   $p=0.049$ ). MTT assay is considered to be a measure of mitochondrial toxicity (Burlando *et al.*, 2008). CinnAc has shown to be cytotoxic on human fibroblasts as assessed by MTT assay (Cos *et al.*, 2002). Phenol ring from phenolic compounds can induce the dissipation of the mitochondrial membrane potential leading to release of cytochrome c from mitochondria into the cytosol which is an early event during cell death (Galati *et al.*, 2002).

Table 16 Initial cytotoxicity of ethanolic yellow birch extract (YB<sub>Mac</sub>), hot water black spruce extract (BS<sub>HWE</sub>) and Oligopin<sup>®</sup> on normal human keratinocytes

Extracts	MTT assay IC <sub>90</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	Dye exclusion assay IC <sub>90</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )
YB <sub>Mac</sub> (24 h)	204.97 ± 31.52 <sup>b</sup>	115.03± 20.12 <sup>c</sup>
YB <sub>Mac</sub> (48 h)	94.80 ± 24.15 <sup>c</sup>	99.33± 23.20 <sup>c</sup>
BS <sub>HWE</sub> (24 h)	409.41 ± 48.60 <sup>a</sup>	285.03± 35.56 <sup>a</sup>
BS <sub>HWE</sub> (48 h)	400.22± 28.80 <sup>a</sup>	113.37± 18.22 <sup>c</sup>
Oligopin <sup>®</sup> (24 h)	183.55 ± 24.52 <sup>b</sup>	103.82±11.38 <sup>c</sup>
Oligopin <sup>®</sup> (48 h)	108.34± 22.11 <sup>c</sup>	163.03±34.01 <sup>b</sup>

Data are referred to two separate experiments run in triplicate. Means with different letters in the same column are significantly different at  $p<0.05$  (ANOVA, followed by Duncan test). YB<sub>Mac</sub> (24h) (48h) = yellow birch extract obtained by maceration and exposed to human keratinocyte cells during 24 and 48 hours; BS<sub>HWE</sub> (24h) (48 h) = black spruce obtained by hot water extraction and exposed to keratinocytes during 24 and 48 hours; Oligopin<sup>®</sup> (24h) (48 h) = Oligopin<sup>®</sup> exposed to keratinocytes during 24 and 48 hours.

After 48 h, major impacts in initial toxicity could be attributed to the presence of polyphenols metabolites as result of interaction with keratinocytes, which have a vast majority of drug metabolizing enzymes such as cytochrome P450 (CYP1A1, 2E1, 3A4/7, 3A5) (Korkina *et al.*, 2008). Additionally, peroxidase activity is present in keratinocytes (Vyas *et al.*, 2006); therefore the oxidation of phenolics by peroxidases/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could represent an alternative polyphenol-metabolizing pathway (Korkina *et al.*, 2008). The primary products of this reaction are semiquinones and phenoxy radicals which can diffuse

from the active site of the enzymes and oxidize molecules with low redox potentials, thereby causing the formation of reactive oxygen species which contribute to mitochondrial toxicity (Galati *et al.*, 2002).

Results presented in Table 16 demonstrate that after 24 h, the initial toxicities of YB<sub>Mac</sub> and Oligopin<sup>®</sup> determined by TBDE method are comparable, whereas BS<sub>HWE</sub> is significantly less toxic ( $p < 0.05$ ). After 48 h, the initial toxicity of BS<sub>HWE</sub> increased, whereas toxicity of YB<sub>Mac</sub> did not significantly vary and Oligopin<sup>®</sup> showed to be less toxic. IC<sub>90</sub> values determined by TBDE method after 24 h showed an inverse correlation with the content of CinnAc ( $r = -0.73$   $p = 0.0246$ ) and PAs ( $r = -0.66$   $p = 0.049$ ) whereas after 48 h no correlations could be determined between IC<sub>90</sub> and the different classes of phenolic compounds. TBDE method is indicative of irreversible membrane damage (Forrest, 1996). Increased concentrations of CinnAc have demonstrated to cause damage on cell membrane (Moridani *et al.*, 2001), whereas toxicity of proanthocyanidins on membrane integrity of HaCaT keratinocytes has been positively correlated with their mean degree of polymerization (DPM) (Ugartondo *et al.*, 2007). The DPM of crude extract from barks of *Betula spp.* and *Picea mariana* is reported to be 6.4 (Matthews *et al.*, 1997) and 6.0 (Diouf *et al.*, 2009a) respectively. Thus, we could hypothesize that the higher degree of polymerization of YB<sub>Mac</sub> proanthocyanidines and the presence of terpenic compounds in this extract which can be extracted with ethanol at high concentrations (Diouf *et al.*, 2009b) could influence on the higher initial toxicity observed on keratinocyte plasma membrane after 24 h. Terpenic compounds can be toxic to mitochondria and plasma membrane causing the disappearance of the mitochondria respiratory control as well as the loss of plasma membrane integrity (Sikkema *et al.*, 1995). Higher toxicity of BS<sub>HWE</sub> after 48 h could be attributed to the presence of toxic polyphenolic metabolites. However, no direct evidence was found for explaining the significant lower toxicity observed after 48 h of Oligopin<sup>®</sup> exposure.

In order to know how safe the extracts were for keratinocytes at their antioxidant active concentrations, we calculated the relationship between IC<sub>90</sub> values and the antioxidant capacity (EC<sub>50</sub>). We found that antioxidant concentrations of extracts for scavenging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were approximately 1.36-8.47 fold lower than cytotoxic concentrations whereas antioxidant concentrations of BS<sub>HWE</sub> and Oligopin<sup>®</sup> towards O<sub>2</sub><sup>•-</sup> were approximately 1.05-3.72 fold

lower than cytotoxic concentrations. On the contrary, effective antioxidant activity of extracts to scavenge  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ , was obtained at toxic concentration for human keratinocytes. This estimation should not be considered as completely predictive of the antioxidant ineffectiveness of extracts towards these radicals in cell systems at concentrations lower than  $\text{IC}_{90}$ . Chemical reactivity is only a part of antioxidant bioactivity and in cellular context other factors such as the activation/deactivation of antioxidants as consequence of metabolism and the interaction with endogenous antioxidants should be considered.

### **Effects of the extracts with highest antioxidant capacity on normal and psoriatic keratinocyte cell growth**

Figure 34 summarizes the effects of the  $\text{YB}_{\text{Mac}}$ ,  $\text{BS}_{\text{HWE}}$  and Oligopin<sup>®</sup> exposition at concentrations lower than  $\text{IC}_{90}$  on the growth of normal and lesional and non-lesional psoriatic keratinocytes (PK). The vehicle used (cell culture medium with 0.17% ethanol) was not found to have any significant effect on growth of keratinocytes (data not shown). Lesional psoriatic cells have been reported to show greater dose-related responsiveness than normal skin cells to some antipsoriatic treatments such as clobetasol propionate (Priestley *et al.*, 1983). So, the preferential sensitivity of lesional psoriatic cells to polyphenolic extracts intervention was considered as a very important outcome in order to evaluate the potential antipsoriatic properties of extracts as part of a selective treatment.

Results presented in figure 34 show that crude extracts from bark of Canadian wood species and Oligopin<sup>®</sup> presented a modest inhibition on the growth of normal and psoriatic keratinocytes, but were not selective for lesional psoriatic cells after exposure during 48 h.  $\text{YB}_{\text{Mac}}$  at  $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$  was shown to inhibit by 26% the NHK growth, but it failed to induce any change in lesional and non-lesional PK growth.  $\text{BS}_{\text{HWE}}$  at  $110 \mu\text{g.mL}^{-1}$  inhibited by 18 and 21% the growth of normal and non-lesional keratinocytes respectively, whereas the growth of lesional PK was not affected. Some inhibition of the growth of non-lesional PK (22%) was observed after exposure with  $\text{BS}_{\text{HWE}}$  at  $55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , whereas the same extract at  $27.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  stimulated the proliferation of NHK and inhibited the growth of non-lesional PK. Oligopin<sup>®</sup> at  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  inhibited the growth of normal, non-lesional and lesional PK



by 37, 24 and 22% respectively. Interestingly, cell exposure to Oligopin® at 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  selectively inhibited the growth of lesional and nonlesional PK, without any effect on the growth of NHK. Overall, these results indicated that effects of polyphenolic extracts on growth of keratinocytes depend on the concentration and cell type used.

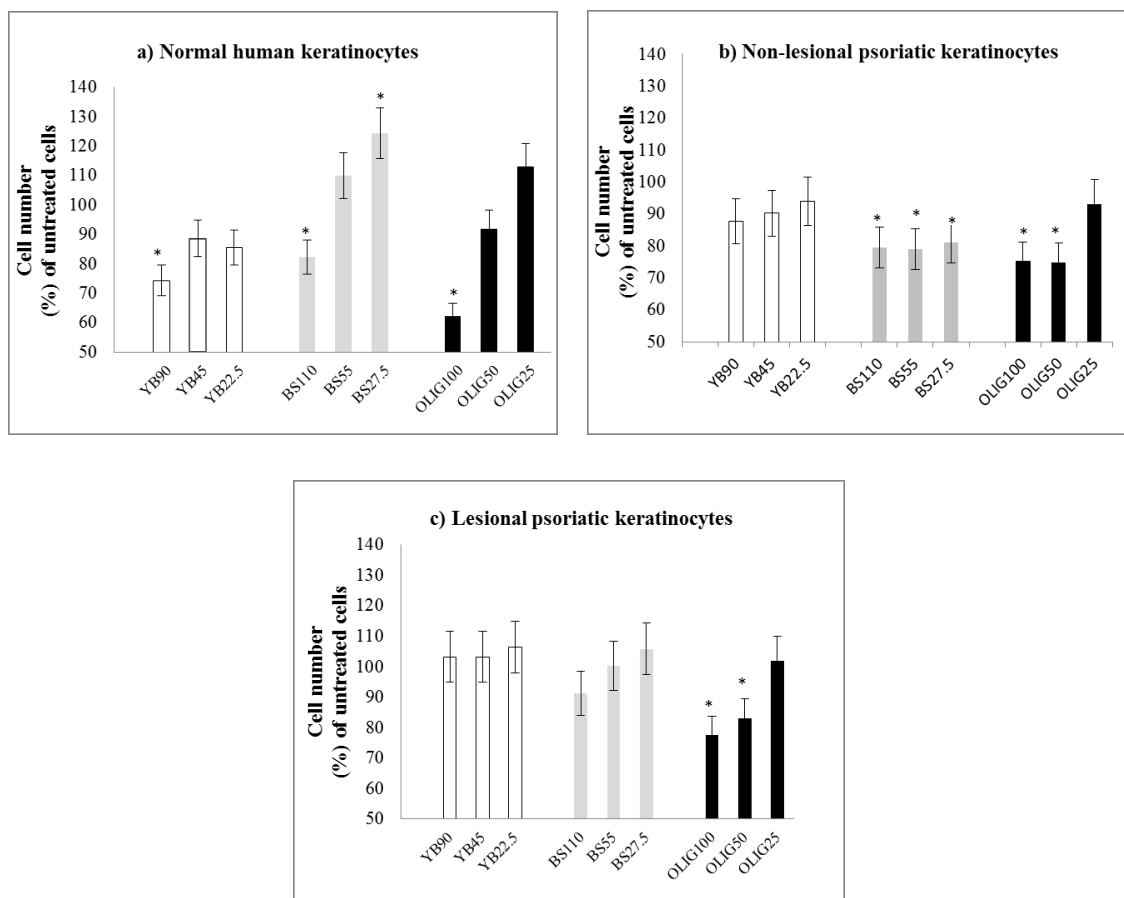


Figure 34 Effects of yellow birch (YB), black spruce (BS) and Oligopin® extracts on the growth of (a) normal, (b) non-lesional psoriatic and (c) lesional psoriatic keratinocytes after exposure during 48 h.

Keratinocytes cells at 50% of confluence were either untreated (cells + cell culture medium) or treated with the extracts during 48 h. Then, cell number was obtained by counting the keratinocytes using a Coulter counter (Beckman Coulter Z2, Mississauga, ON, Canada). All values were expressed as a percent of untreated cells. Data represent mean  $\pm$  SD of two independent experiments, done in triplicate \* $p < 0.05$ . YB (90, 45, 22.5) = yellow birch extract obtained by maceration at 90, 45 and 22.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; BS (110, 55, 27.5) = black

spruce extract obtained by hot water extraction at 110, 55 and 27.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; OLIG (100, 50, 25) = Oligopin<sup>®</sup> extract at 100, 50 and 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Procyanidins and monomeric catechins are the main active polyphenols contained in the standardized pine bark extract Oligopin<sup>®</sup>. Antiproliferative activity of proanthocyanidines of pine bark extract has been related with their ability to induce cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells (Lizarraga *et al.*, 2007). Differences between the antiproliferative activity of the BS<sub>HWE</sub> and Oligopin<sup>®</sup> on lesional PK can be explained by the different chemical composition of these extracts. Crude extract from black spruce obtained by hot water extraction, is a complex mixture of various compounds and should contain higher content of polysaccharides than Oligopin<sup>®</sup> which is the purified ethyl acetate fraction obtained from the hot water crude extract of French maritime pine bark (Masquelier, 1987). Another study has demonstrated that polysaccharide fraction from *Hamamelis virginiana* bark has no influence on proliferation, differentiation and metabolic activity of human keratinocytes (Deters *et al.*, 2001). Therefore, we could hypothesize that the relative dilution of active polyphenolic compounds of the BS<sub>HWE</sub> due to the presence of polysaccharides and other nonactive hydrophilic molecules could be responsible for the lack of antiproliferative activity of BS<sub>HWE</sub> on lesional PK. So, further purification of the active polyphenolic compounds from BS<sub>HWE</sub> would most likely enhance its antiproliferative and biological activity on lesional PK. That is consistent with results obtained by Diouf *et al.* (2009a) which demonstrated that the ethyl acetate fraction obtained from BS<sub>HWE</sub> presented higher antioxidant and anti-inflammatory activities than BS<sub>HWE</sub>.

### 2.3.5 Conclusions

Although barks from Canadian species were extensively used by native North American peoples to treat dermatological conditions, there is a lack of scientific evidence about their pharmacological and toxicological properties on skin related cells. The present study, for the first time, demonstrates the toxicological and antiproliferative properties of polyphenolic extracts from barks of Canadian species on normal and psoriatic keratinocytes.

Given that the crude extract of black spruce bark obtained by hot water extraction (BS<sub>HWE</sub>) presents elevated content of total phenols and flavonoids and shows a low toxicity on NHK as well as an adequate chemical reactivity towards different radicals and some antiproliferative properties as compared with other crude extracts from Canadian species, it can be considered as the most valuable extract obtained from Canadian wood species here studied. However, to enhance its biological properties, it would be necessary to undertake its purification in order to concentrate the polyphenolic mixture. The purification of BS<sub>HWE</sub> crude extract, the identification of its major compounds and the determination of the effects of the purified extract on pathways involved in psoriasis pathogenesis are important steps towards the determination of the therapeutic potential of polyphenols from *Picea mariana* bark for psoriasis treatment.

### 2.3.6 Acknowledgements

The authors are very grateful to Ms. Rina Guignard and Mr. Yves Bédard for their technical advices and to Mr. Yannick Piriou from DRT (Dax, France) for kindly providing Oligopin<sup>®</sup>. The Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and the “Fonds d’enseignement et de recherche” (FER) of the Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, QC, Canada are acknowledged for the scholarship to MEGP. RP was recipient of a research fellowship from the «Fonds de la Recherche en Santé du Québec» (FRSQ) of Québec, Canada.

## 2.3.7 References

- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., and Makhija, U. (2006). Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *LWT-Food Science and Technology*. **39**, 80-85
- Benassi, L., Bertazzoni, G., Magnoni, C., Rinaldi, M., Fontanesi C., and Seidenari, S. (2003). Decrease in toxic potential of mixed tensides maintained below the critical micelle concentration: an in vitro study. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. **16**, 156–164
- Bito, T., Roy, S., Sen, C.K. and Packer, L. (2000). Pine bark extract Pycnogenol® down regulates IFN-alpha- induced adhesion of T cells to human keratinocytes by inhibiting inducible ICAM-1 expression. *Free Radical Biology Medicine*. **28**, 219-227
- Brighente, I.M.C., Dias, M., Verdi, L.G., and Pizzolatti, M.G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*. **45**, 156-161
- Burlando, B., Parodi, A., Volante, A., and Bassi, A.M. (2008). Comparison of the irritation potentials of *Boswellia serrata* gum resin and of acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid by in vitro cytotoxicity tests on human skin-derived cell lines. *Toxicology letters*. **177**, 144-149
- Chandler, R.F., Freeman, L., and Hooper, S.N. (1979). Herbal remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. **1**, 49-68
- Chen, J.Ch., Fang, D., Zhou, B., Yang, L., and Liu, Z.L. (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure–activity relationship. *Food Chemistry*. **104**, 132-139
- Cos, P., Rajan, P., Verdenikova, I., Colonne M., Pieters, L., Vlietinc, A.J., Augustins, K., Haemers, A., and Berghe, D.V. (2002). In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives. *Free Radical Research*. **36**, 711-716
- D'Angelo, S., Morana, A., Salvatore, A., Zappia, V., and Galleti, P. (2009). Protective effect of polyphenols from *glycyrrhiza glabra* against oxidative stress in caco-2 cells. *Journal of medicinal Food*. **12**, 1326-1333
- Deters, A., Dauer, A., Schnetz, E., Fartasch, M., and Hensel, A. (2001). High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark : influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*. **58**, 949-958

- Diouf, P.N., Stevanovic, T., and Cloutier, A. (2009a). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidins fractions. *Food Chemistry*. **113**, 897-902
- Diouf, P.N., Stevanovic, T., and Boutin, Y. (2009b). The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops and products*. **30**, 297-303
- Dix, T.A., Aikens, J. (1993). Mechanism and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chemical Research in Toxicology*. **6**, 2–18.
- European Pharmacopoeia. 2002. 4th edition. Fraxini folium. DEQS, Strasbourg.
- Forrest, C. (1996). Proliferation assays with human, rabbit, rat and mouse lymphocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*. **37**, 520–523.
- Foster, S., Duke, J.A. 1990. A field guide to medicinal plants. Eastern and central north america. Houghton Mifflin Company. Boston. New York.
- Galati, G., Savzebari, O., Wilson, J., and O'Brien, P.J. (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. **177**, 91-104
- Grimm, T., Chovanova, Z., Muchova, J., Sumegova, K., Liptakova, A., Durackova, Z., Högger, P. (2006). Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol®). *Journal of Inflammation*. **3**, 1-6.
- Gu, H.F., Li, Ch.M., Xu, Y.J., Hu, W.F., Chen, M.H., and Wan, Q. (2008). Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International*. **41**, 208-217
- Jean, J., Lapointe, M., Soucy, J., and Pouliot, R. (2009). Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *Journal of Dermatological Science*. **53**, 19-25
- Kizaki, H., Matsuo, I., and Sakurada, T. (1977). Xanthine oxidase and guanase activities in normal and psoriatic epidermis. *Clinica chimica acta*. **75**,1-4
- Korkina, G.L., Pastore, S., De Luca, C., and Kostyuc, V.A. (2008). Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Current Drug Metabolism*. **9**, 710-729
- Korting, H.C., Herzinger, T., Hartinger, A., Kerscher, M., Angerpointner T., and Maibach, H.I. (1994). Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *Journal of Dermatological Science*. **7**, 119–129

- Krasutsky P. (2006). Birch bark research and development. *Natural Products Report*. **23**, 919-942
- Kumar, R.S., Sivakumar, T., Sunderam, R.S., Gupta, M., Mazumdar, U.K., Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Saravanan, S., Kumar, M.S., Muruges, K., and Kumar, K.A. (2005). Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. *Brazilian Journal of Medical and Biological research*. **38**, 1015-1024
- Lee, E.J., Lee, S.A., and Kim, J. (2005). The effect of human serum albumin on the extended storage of human oral keratinocyte viability under mild hypothermia. *Cryobiology*. **50**, 103-111
- Lizarraga, D., Lozano, C., Briede, J.J., Van Delf, J.H., Turino, S., Centellez, J.J., Torres, J.L., and Cascante, M. (2007). The importance of polymerization and galloylation for the antiproliferative properties of procyanidin-rich natural extracts. *FEBS journal*. **274**, 4802-4811
- López-Alarcón, C., Lissi, E. (2005). Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities. *Free Radical Research*. **39**, 729-736
- Lowes, M.A., Bowcock, A.M., and Kruger, J.G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. **445**, 866-73
- Mason, J., Mason, A.R., and Cork, M.J. (2002). Topical preparations for the treatment of psoriasis: a systematic review. *British Journal of Dermatology*. **146**, 351-64.
- Masquelier, J. 1987. Plant extract with a proanthocyanidin content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. United States Patent 4,698,360
- Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A., and Donnelly, D.M. (1997). Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. *Phytochemistry*. **45**, 405-410
- Moerman, D., 1998. Native American Ethnobotany. Timber Press. Portland. Oregon.
- Moridani, M.Y., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P., and O'Brien, P. (2001). Caffeic acid, chlorogenic acid and dihydrocaffeic acid metabolism : glutathione conjugate formation. *Drug Metabolism and disposition*. **29**, 1432-1439
- Ohsugi, M., Fan, W., Hase, K., Xiong, Q., Tezuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., Saitoh, T., Tazawa, K., and Kadota, S. (1999). Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing- tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *Journal of Ethnopharmacology*. **67**, 111-119
- Ormerod, A.D., Weller, R., Copeland, P., Benjamin, N., Ralston, S.H., Grabowski, P., and Herriot, R. (1998). Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*. **290**, 3-8

- Pelle, E., Mammone, T., Maes, D., and Frenkel, K. (2005). Keratinocytes act as a source of reactive oxygen species by transferring hydrogen peroxide to melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. **124**,793-797
- Pol, A., Bergers, M., and Schalkwijk, J. (2003). Comparison of anti-proliferative effects of experimental and established anti-psoriatic drugs on human keratinocytes, using a simple 96-well plate assay. *In vitro Cellular Developmental Biology Animal*. **39**, 36-42
- Poon, V.K, Burd, A. (2004). In vitro cytotoxicity of silver : implication for clinical wound care. *Burns*. **30**, 140-147
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., and Chan, B.G. (1986). The conversion of proanthocyanidins and delphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry*. **25**, 223-230
- Priestley, G.C., Adams, L.W., Oakley, C.A., and Prescott, R.J. (1983). Proliferative responses of fibroblasts from psoriatic and normal skin to clobetasol propionate. *Acta dermato-venereologica*. **63**, 393-396
- Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueiredo, A., Quintanilha, A., and Teixeira, F. (2004). The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *The British journal of dermatology*. **150**, 917-928
- Rihn, B., Saliou, C., Bottin, MC., Keith, G. and Packer, L. (2001). From ancient remedies to modern therapeutics: Pine bark uses in skin disorders revisited. *Phytotherapy Research*. **15**, 76-78
- Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klauning, J.E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxydant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen*. **10**, 1003-1008
- Schon, M.P., Boehncke, W.H. (2005). Psoriasis. *New England Journal of Medicine*. **352**, 1899–912.
- Sikkema, J., Bont, J.M., Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*. **59**, 201-222
- Sreejayan, N., Rao, M.N.A. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **49**, 105–107
- Teepe, R.G., Koegrugge, E.J., Clemens, W., Lowik, G.M., Pieter, L., Petit, L.C., Bosboom, R.W., Twiss, I.M., Boxman, H., Vermer, B.J., and Ponc, M. (1993). Cytotoxic effects of topical antimicrobial and antiseptic agents on human keratinocytes in vitro. *The journal of trauma*. **35**, 8-19
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Tourino, S., Torres, J.L., and Vinardell, P. (2007). Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine. *Chemical research in Toxicology*. **20**, 1543-1548



- Vyas, P.M., Roychowdhury, S., Koukouritaki, S.B., Hines, S.K., Kruger, S.K., Williams, D.E., Nauseef, W.N., and Svensson, C.K. (2006). Enzyme-Mediated Protein Haptenation of Dapsone and Sulfamethoxazole in Human Keratinocytes: II. Expression and Role of Flavin-Containing Monooxygenases and Peroxidases. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **319**, 497-505
- Weigand, D.A. (1999). Traditional Native American medicine in dermatology. *Clinics in dermatology*. **17**, 49-51
- Wilhelm, K.P., Bottjer B., and Siegers, C.P. (2001). Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation tests. *British Journal of Dermatology*. **145**, 709–715.
- Yildirim, M., Inaloz, H.S., Baysal, V., and Delibas, N. (2003). The role of oxidants and antioxidants in psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. **17**, 34-36
- Young, Ch.N., Koepke, J.I., Terlecky, L.J., Borkin, M.S., Savoy, L.B., and Terlecky, S.R. (2008). Reactive oxygen species in tumor necrosis factor alpha activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*. **128**, 2606-2614
- Yu, J., Ahmedna, M., and Goktepe I. (2005). Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*. **90**, 199-206
- Zhou, Q., Mrowietz, U., Rostami-Yazdi, M. (2009). Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. *Free Radical Biology & Medicine*. **47**, 891-905

**Chapitre 3. Les écorces de l'épinette noire (*Picea mariana*): une nouvelle source en *trans*-resvératrol et autres polyphénols bioactifs**

### 3.1 Avant-propos

Ce chapitre fait l'objet d'un article intitulé *Picea mariana* bark: a new source of trans-resveratrol and other bioactive polyphenols qui a été publié dans le journal *Food Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.050>, 2012

J'ai effectué l'extraction et la purification de l'extrait brut de l'épinette noire (*Picea mariana*), aussi bien que la détermination de différentes classes de phénols dans l'extrait purifié. L'obtention des différentes fractions de l'extrait purifié par flash chromatographie et la séparation par chromatographie en phase liquide à haute performance ont été réalisées en collaboration avec Mariana Royer. Les analyses par RMN des molécules isolées ont été réalisées par Gaëtan Herbette. Finalement, j'ai rédigé l'article sous la supervision du Dr Yves Desjardins, Dre Roxane Pouliot et Dre Tatjana Stevanovic.

### 3.2 Résumé

La fraction soluble dans l'acétate d'éthyle obtenue à partir de l'extrait aqueux d'écorces de l'épinette noire (*Picea mariana*) (BS-EAc<sub>f</sub>) a démontré des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. De ce fait, dans la présente étude les composés majoritaires présents dans cette fraction ont été isolés par chromatographie en phase liquide à haute performance et leurs structures chimiques ont été déterminées par spectrométrie de masse et par spectroscopie de RMN. Au total 28 composés ont été identifiés, dont cinq néolignanes, sept lignanes, trois acides phénoliques, quatre flavonoïdes et un stilbène, le *trans*-resvératrol. Au mieux de notre connaissance, les composés : *trans*-(2S,3S) 2,3-dihydro-3-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-7-(3'-hydroxypropyl)-1,4-benzodioxine, thréo et érythro 3-methoxy-8,4'-oxynéoligna-3',4,7,9,9'-pentol, pallasine, (±) épitaxifoline, homovanillyl alcool, orcinol et 2-[4'-(3''-hydroxypropyl)-2-méthoxyphénoxy]-1,3-propanediol ont été identifiés pour la première fois dans le genre *Picea*. Nos résultats ont démontré que l'écorce sèche de *Picea mariana* contient au moins 104,19  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de *trans*-resvératrol, pouvant donc être considéré comme une source nouvelle et accessible de cette molécule. Cette étude fournit des informations inédites sur la nature des composés présents dans BS-EAc<sub>f</sub>, ce qui est essentiel à la compréhension du potentiel anti-inflammatoire et antioxydant de cet extrait.

### 3.3 Article

## ***Picea mariana* bark: a new source of *trans*-resveratrol and other bioactive polyphenols**

Martha-Estrella García-Pérez <sup>1,2</sup>, Mariana Royer <sup>1</sup>, Gaëtan Herbette <sup>3</sup>, Yves Desjardins <sup>4</sup>, Roxane Pouliot <sup>2</sup>, Tatjana Stevanovic <sup>1</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Centre de Recherche sur le Bois, Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6. <sup>2</sup> Centre LOEX de l'Université Laval, Génie tissulaire et régénération: LOEX - Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec, Aile-R, 1401 18<sup>e</sup> rue, Québec, Qc, Canada, G1J 1Z4 and Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6. <sup>3</sup> Spectropole, FR 1739-Aix-Marseille Université, Campus de Saint-Jérôme, service 511, 13397, Marseille, CEDEX 20, France. <sup>4</sup> Institut des Nutraceutiques et des aliments fonctionnels. Centre de recherche en horticulture, Pavillon de l'Environnement, 2480, Boul. Hochelaga, Université Laval, Québec, Qc, Canada G1V 0A6

### **Address for reprint requests:**

Tatjana Stevanovic, Ph.D.

Centre de recherche sur le bois, Université Laval, Département des sciences du bois et de la forêt, Pavillon Gene H. Kruger, 2425 rue de la Terrasse, Québec, Qc, Canada G1V 0A6. Tel.: (1) 418 656 2131ext 7337. Fax: (1) 418 656 209

E-mail address: [Tatjana.Stevanovic@sbf.ulaval.ca](mailto:Tatjana.Stevanovic@sbf.ulaval.ca)

### 3.3.1 Abstract

The ethyl acetate soluble fraction obtained from the hot water extract of *Picea mariana* bark (BS-EAc<sub>f</sub>) has been demonstrated to have anti-inflammatory and antioxidant properties. Thus, in the current study, we isolated and characterized major compounds present in this fraction by HPLC, NMR and MS analyses. On the whole, 28 compounds were identified, among which five neolignans, seven lignans, the *trans*-resveratrol, three phenolic acids and four flavonoids. To the best of our knowledge, 1,4-benzodioxin-6-propanol,2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-(2S,3S), *threo* and *erythro* 3-methoxy-8,4'-oxyneolignan-3',4,7,9,9'-pentol, pallasin, (±) *epi*-taxifolin, homovanillyl alcohol, orcinol and 1,3-propanediol,2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy] are reported for the first time in the *Picea* genus. *Picea mariana* dry bark contains at least 104.19 µg.g<sup>-1</sup> d.w of *trans*-resveratrol and it could be therefore considered as a new accessible source of this molecule. This study provides novel information about the identity of major compounds present in BS-EAc<sub>f</sub>, which is essential for the understanding of the anti-inflammatory and antioxidant potential of this extract.

### 3.3.2 Introduction

Polyphenols are ubiquitous plant constituents that exhibit a wide range of physiological effects acting as antioxidant, antiallergenic, anti-inflammatory, anticarcinogenic and cardioprotective agents (Chandrasekara and Shahidi, 2011; Kang *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2009). Bioactive polyphenols, partially responsible for the health benefits of the diets rich in fruits and vegetables, are also available from forest trees and in particular from the residues of industrial wood transformation such as barks (Stevanovic *et al.*, 2009). In Canada, large amounts of bark are produced as residues of wood transformation, being mainly burnt in large furnaces to satisfy at least a part of the forest industry's energy needs (Diouf *et al.*, 2009). Bark is generally considered a richer source of bioactive polyphenols than other tree organs due in part to its protective role (Gao *et al.*, 2007). This residue is thus most likely a rich source of nutraceutical supplements, dietary additives and/or pharmaceutical products.

Black spruce (*Picea mariana* (Miller) B.S.P) is one of the most important industrial species from Canadian forests and its barks are available in huge quantities as a result of wood transformation. Recently our research group has demonstrated that the hot water extract from black spruce bark (BS<sub>HWE</sub>) presented a potential as natural product for applications in which antioxidant and anti-inflammatory properties are important (Diouf *et al.*, 2009). In a further investigation, it was also demonstrated that this extract possessed a high content of total phenols and flavonoids as well as a low toxicity on normal human keratinocytes and an adequate chemical reactivity towards different free radicals involved in psoriasis, a skin disorder affecting up to 2% of the world's population (Garcia-Perez *et al.*, 2010). For these reasons, it was considered a valuable source of bioactive molecules. Considering that BS<sub>HWE</sub> was a crude extract composed of the combination of many compounds, we have decided to fractionate it further in order to enhance its biological activity and to identify and characterize more in depth its major molecules (Garcia-Perez *et al.*, 2010).

Previous investigations also performed by our research group have shown that the ethyl acetate fraction isolated from this extract (BS-EAc<sub>f</sub>) has a higher antiradical efficiency and a better anti-inflammatory activity than that of BS<sub>HWE</sub> (Diouf *et al.*, 2009). Moreover, this

fraction at  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (a non-toxic concentration) suppressed the interleukin (IL) IL-8 production by normal and psoriatic keratinocytes stimulated with tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) cytokine (García-Pérez *et al.*, 2011). On the whole, these results suggest that molecules present in the BS-EAc<sub>f</sub> have potential anti-inflammatory and antioxidant properties and could be used as a part of nutraceutical or pharmaceutical products.

The thiolysis coupled with HPLC-DAD used in our previous study allowed the characterisation of proanthocyanidins in this fraction (Diouf *et al.*, 2009). However, major low molecular weight polyphenols present in BS-EAc<sub>f</sub> remains to be identified. Indeed, no comprehensive studies are presently available concerning the characterization of low molecular weight polyphenols in *Picea mariana* bark. An early study reported the presence of 2.5% of leucoanthocyanidins in the black spruce internal bark (Pigman *et al.*, 1953). In 1971, Manners and Shawn described the occurrence of taxifolin, catechin, epicatechin and some stilbenes such as astringin, isorhapontin, isorhapontigenin and astringenin in the acetone extract of black spruce bark (Manners and Swan, 1971). Recently, the flavonoid taxifolin was also identified by our group both in BS<sub>HWE</sub> ( $13.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  extract) and in BS-EAc<sub>f</sub> ( $66.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  extract) (Diouf *et al.*, 2009).

Taking into account the potential of molecules present in BS-EAc<sub>f</sub> as anti-inflammatory, antiproliferative and antioxidant agents, and the fact that very few reports exist to date on the characterization of polyphenolic compounds in *Picea mariana* bark, this study aimed to isolate, to characterize and to quantify the individual compounds present in the ethyl acetate fraction of crude aqueous extract. Considering the high number of isomers and the diversity of molecules present in black spruce bark, the extraction and purification techniques here reported could be used for the production of sufficient quantities of pure compounds to study their potential as antioxidant, antiproliferative and anti-inflammatory agents.



### 3.3.3 Materials and Methods

#### Reagents

Folin-Ciocalteu phenol reagent, gallic acid, quercetin and chlorogenic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The ammonium sulphate from Laboratoire MAT (Québec, QC, Canada) and cyanidin chloride from Indofine Chemical Co (Hillsborough, NJ, USA) were also used. Hexane, acetonitrile, dichloromethane and ethyl acetate were obtained from Fisher Scientific Chemicals (Tustin, Canada).

#### General experimental procedures

Contents of the various classes of polyphenols present in BS-EAC<sub>f</sub> were determined using a UV-visible spectrometer (Varian model Cary 50). Isolation of pure compounds was performed on a semi-preparative column (Zorbax SB-C18, 5  $\mu$ m, 9.4  $\times$  250 mm i.d., Agilent) by high-performance liquid chromatography (HPLC), along with a Agilent 1100 series system equipped with a G1311A quaternary pump, G1315B photodiode array absorbance detector and a G1364C automatic fraction collector. The samples were injected automatically through an automatic injector (900  $\mu$ L maximum injection volume) and the flow rate was 4 mL.min<sup>-1</sup> for separation. Analyses of purity were performed on the same system on an analytical column (Zorbax SB-C18, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm i.d., Agilent) with a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>. Silica gel (10–40  $\mu$ m, blinder CaSO<sub>4</sub> Type G) was purchased from Sigma Aldrich and analytical TLC plates (Si gel 60 F<sub>254</sub> 20 x 20 mm) was purchased from EMD Chemicals Inc. After fractionation by silica gel column chromatography all fractions were dried by evaporation under vacuum in order to determine their respective mass. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX500 spectrometer (<sup>1</sup>H-500.13 MHz) equipped with a 5-mm triple resonance inverse Cryoprobe TXI (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N) with a z gradient. Spectra were recorded with 1.7 mm NMR capillary tube in 40  $\mu$ L of 99.99% CD<sub>3</sub>OD solvent ( $\delta_{1H}$  3.31 ppm–  $\delta_{13C}$  49.00 ppm) at 300 K. The <sup>1</sup>H (500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) data are reported in ppm downfield from tetramethylsilane. Hydrogen connectivity (C, CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) information was obtained from edited HSQC and/or DEPTQ-135 experiments. Proton and carbon peak assignments were based on 2D NMR analyses (COSY, NOESY, HSQC and HMBC). HREI-MS was performed using a QStar

Elite mass spectrometer (Applied Biosystems SCIEX, Concord, ON, Canada) equipped with an ESI source operating in the positive ion mode. The capillary voltage was set to 5500 V, the cone voltage to 20 V and air was used as the nebulizing gas (20 psi). In this hybrid instrument, ions were measured using an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass analyzer. Analyst software version 2.1 was used for instrument control, data acquisition and data processing. Accurate mass measurements were performed in triplicate with two internal calibrations. Direct sample introduction was performed at a  $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  flow rate using a syringe pump. The UV spectra were recorded on a Perkin–Elmer Lambda 5 spectrophotometer. Optical rotations were measured with a Perkin–Elmer 241 polarimeter equipped with a sodium lamp (589 nm) and a 1 dm cell.

### **Plant material**

Barks of black spruce (*Picea mariana* (Miller) B.S.P) were from St-Lambert de Lauzon, Chaudière-Appalaches region, Québec, Canada and were identified by Alain Cloutier Ph.D., professor of wood anatomy at Université Laval. A voucher specimen was deposited in the herbarium Louis-Marie of Université Laval, Québec, QC, Canada with reference number: QFA 0579234.

### **Extraction and separation of the ethyl acetate fraction**

Hot water crude extract from black spruce bark (BS<sub>HWE</sub>) was obtained as described in our previous work (Garcia-Perez *et al.*, 2010). Briefly, fifty grams of oven dry ground (40-60 mesh) black spruce bark were first extracted with 500 mL water under reflux for 1 hour and solids were separated by filtration with a Whatman No.4 filter paper and washed with 500 mL of hot water. The aqueous filtrate (1 L) was freeze-dried to yield BS<sub>HWE</sub> 4.98g. The ethyl acetate fraction was separated from BS<sub>HWE</sub> as previously described (Diouf *et al.*, 2009). Briefly, 3.25 grams of BS<sub>HWE</sub> were resuspended in 100 mL water, decanted through a 100 mL Gooch crucible (Pyrex<sup>®</sup>, 40–60  $\mu\text{m}$ , coarse porosity) and the filtrate was collected in a 125 mL Erlenmeyer flask. The aqueous solution was first defatted with hexane ( $5 \times 100 \text{ mL}$ ) and then extracted with ethyl acetate ( $5 \times 100 \text{ mL}$ ). The organic fraction was solvent-evaporated under vacuum to remove ethyl acetate, resuspended in

water, filtered through a 50 mL Gooch crucible (Pyrex<sup>®</sup>, 40–60  $\mu\text{m}$ , coarse porosity) and then lyophilised to yield the 676.0 mg ethyl acetate fraction (BS-EAc<sub>f</sub>).

### **Polyphenols classes present in the ethyl acetate fraction of black spruce bark aqueous extract**

Different polyphenols classes (flavonoids, hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins) and total phenols in the ethyl acetate fraction (BS-EAc<sub>f</sub>) were quantified by spectrophotometric methods. The total phenol content was determined using the Folin-Ciocalteu method as previously described (Diouf *et al.*, 2009) and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry extract (mg GAE.g<sup>-1</sup> dry BS-EAc<sub>f</sub>). The total flavonoid content of the BS-EAc<sub>f</sub> was determined following the method described by Brighente and coworkers (Brighente *et al.*, 2007) and results were expressed as milligrams of quercetin equivalents (QE) per gram of dry extract (mg QE.g<sup>-1</sup> of dry BS-EAc<sub>f</sub>). The total hydroxycinnamic acid content was determined as described in European Pharmacopoeia for *Fraxini folium* (European Pharmacopoeia. *Fraxini folium*, 2002) and results were expressed as milligrams of chlorogenic acid equivalents (ChAE) per gram of dry extract (mg ChAE.g<sup>-1</sup> of dry BS-EAc<sub>f</sub>). Anthocyanidin monomer formation in a hydrochloric medium with ferric ammonium sulphate as a catalyst was performed as described by Porter *et al* (Porter *et al.*, 1986). The proanthocyanidin content was expressed as milligrams of cyanidin chloride equivalents (CChE) per gram of dry extract (mg CChE.g<sup>-1</sup> of dry BS-EAc<sub>f</sub>).

Taking into account that in this study the provenance of bark used for obtaining BS-EAc<sub>f</sub>, the extraction approach and the methods used for determining different classes of phenols were the same as those described in our previous work for BS<sub>HWE</sub> (Garcia-Perez *et al.*, 2010), the results obtained for the extracts (BS<sub>HWE</sub> and BS-EAc<sub>f</sub>) from the two studies were compared using the Student's t test ( $p=0.05$ ). Results were processed by SAS program 8.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC., USA).

### Isolation of individual compounds present in the ethyl acetate fraction

The dried powdered BS-EAc<sub>f</sub> (676.0 mg) was suspended in 67.6 mL water (V<sub>1</sub>) (10 mg.mL<sup>-1</sup>) and sequentially partitioned with dichloromethane (phase A, 2 × V<sub>1</sub>) and ethyl acetate (phase B, 3×V<sub>1</sub> mL).

Figure 35 shows the typical RP-HPLC chromatogram of phase A (152.8 mg) which is composed by a complex mix of different molecules. Phase A was primarily fractionated by silica gel column chromatography (40-63 μm; 2 × 50 cm) with a hexane-ethyl acetate gradient as follows: 70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70 (v:v). Consequently, fifteen fractions were obtained and numbered A00-A14. Fractions A00-A08; A10 and A14 were purified on HPLC. Taking into account that fractions A09, A11, A12 and A13 presented a low mass (<1mg) and contained several compounds as observed by TLC, they were not further sub-fractionated. Fractions A00 and A01 were purified by HPLC using a water-acetonitrile linear gradient as follows: 70:30 to 100% acetonitrile over 15 min and then 100% acetonitrile for 5 min, whereas fractions A02 and A03, were purified under two isocratic methods using 15:85 water/acetonitrile and 70:30 water/acetonitrile for 5 and 15 min respectively. Fractions A04, A05 and A07 were purified with a linear gradient of water/acetonitrile following the method: 70:30 to 30:70 over 15 min then 30:70 to 100% acetonitrile over 5 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Fraction A06 was purified under an isocratic method using 50:50 water/acetonitrile during 20 min. Fraction A10 was purified with a linear gradient of water/acetonitrile following the method: 60:40 to 52:48 over 2 min, 52:48 to 36:64 over 13 min, 36:64 to 100% acetonitrile over 5 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Finally, fractions A08 and A14 were purified with a linear gradient of water/acetonitrile following the method: 80:20 to 20:80 over 15 min then 20:80 to 100% acetonitrile over 5 min and then 100% acetonitrile for 5 min. After HPLC purification, a total of 14 compounds were isolated from phase A (dichloromethane). Compound **22** (*R*<sub>t</sub>= 8.37 min; 0.80 mg) was obtained from fraction A02 (39.10 mg), whereas compounds **6** (*R*<sub>t</sub>= 11.15 min; 0.50 mg) and **12** (*R*<sub>t</sub>= 11.35 min; 1.00 mg) were obtained from purification of A04 (18.70 mg). Compounds **21** (*R*<sub>t</sub>= 7.70 min; 0.40 mg) and **26** (*R*<sub>t</sub>= 7.95 min; 1.00 mg) were obtained from purification of fraction A05 (61.50 mg), whereas compound **11** (*R*<sub>t</sub>= 10.8 min; 2.30 mg) was obtained from A06 (34.70 mg). In the

case of compound **3** ( $R_t= 9.8$  min; 0.40 mg), it was isolated after purification of A07 (2.30 mg). Purification of A08 (20.50 mg) yielded a fraction containing a mixture of compounds **9** ( $R_t= 9.05$  min; 0.69 mg) and **10** ( $R_t= 9.05$  min; 0.75 mg). Five different compounds were isolated from fraction A10 (21.90 mg): compound **1** ( $R_t= 7.60$  min; 0.50 mg), a mixture of compounds **7** ( $R_t= 8.04$  min; 1.30 mg), **8** ( $R_t= 8.8$  min; 0.90 mg) and **2** ( $R_t= 9.3$  min; 1.20 mg) and the pure compound **27** ( $R_t= 12.4$  min; 3.20 mg). Analyses of phase A before fractionation (Figure 35) and the determination of purity of all fractions obtained were performed by HPLC using a linear gradient of water/acetonitrile according to the following method: 10:90 to 0:100 over 20 min then 100% acetonitrile for 5 min. Peaks were observed at four wavelengths (214-254-280 and 320 nm).

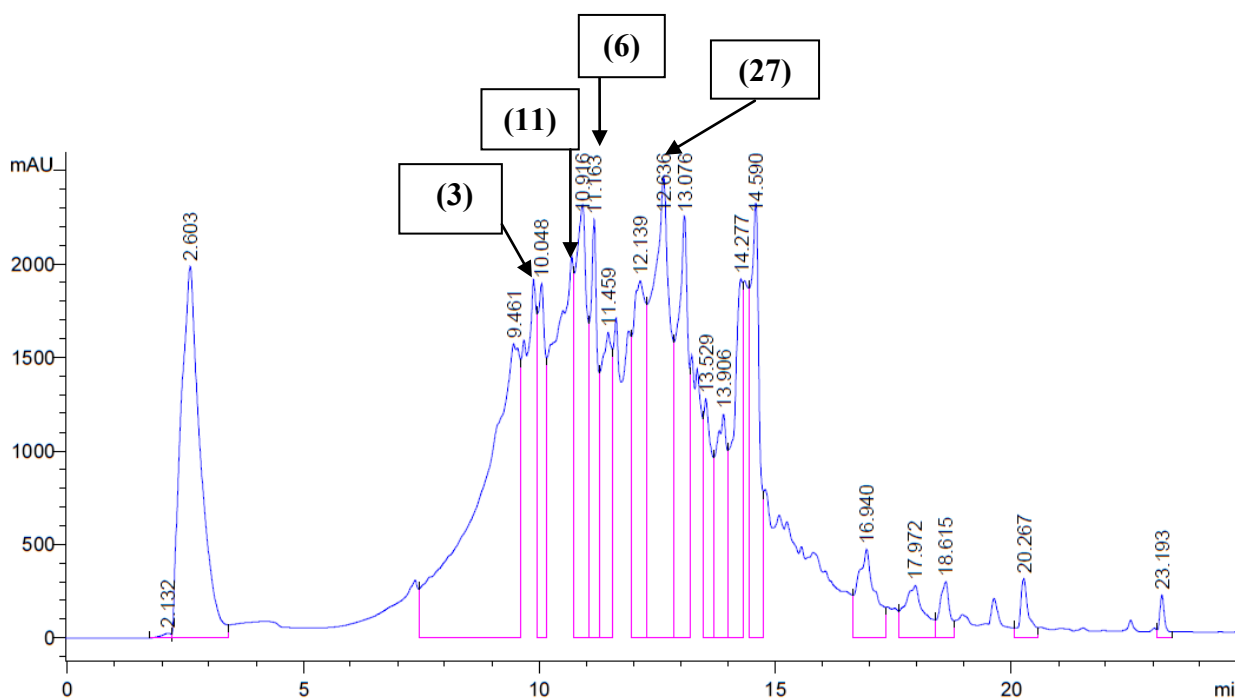


Figure 35 Typical RP-HPLC chromatogram ( $\lambda=214\text{nm}$ ) of phase A. Peak numbers correspond to compounds presented in figure 37.

The typical RP-HPLC chromatogram of phase B (522.95 mg) is presented in Figure 36. Indeed, this phase was also composed by a complex mix of different molecules. Phase B was primarily fractionated by silica gel column chromatography (40-63  $\mu\text{m}$ ;  $2 \times 50$  cm) with a polarity gradient of hexane-ethyl acetate 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80; 10:90

then 100% ethyl acetate and finally 100% methanol. 15 fractions were obtained and numbered B01-B15.

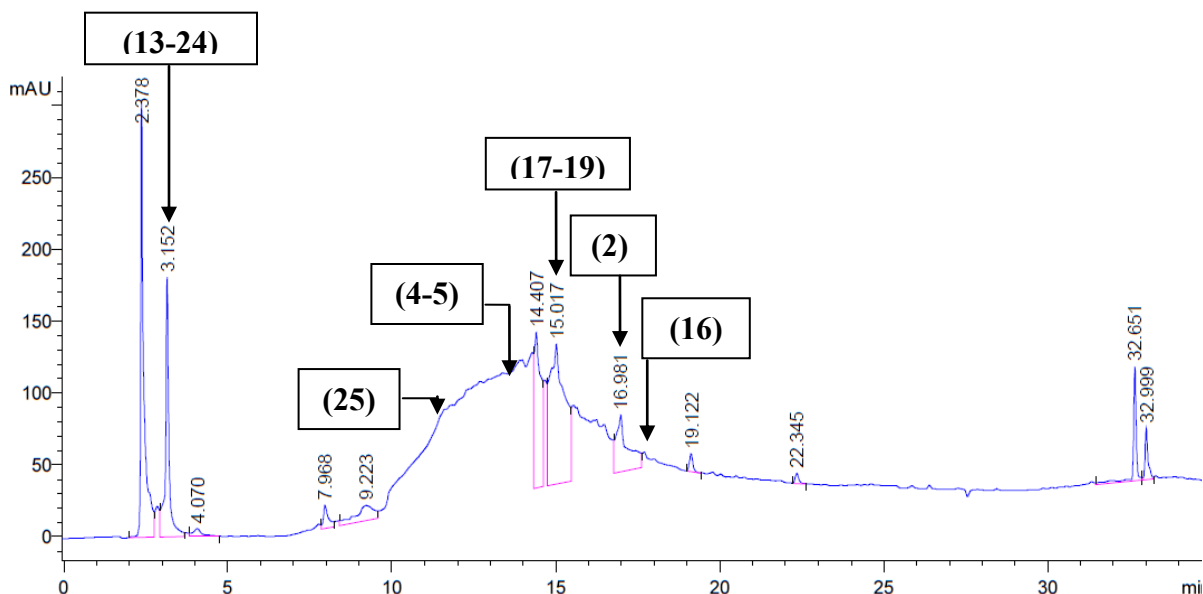


Figure 36 Typical RP-HPLC chromatogram ( $\lambda=214\text{nm}$ ) of phase B. Peak numbers correspond to compounds presented in figure 37.

TLC analyses performed after column showed that, in the case of this polar phase, more complex mixtures of compounds were present in each obtained fraction. Fractions B01; B03; B06-14 were purified on HPLC using the semi-preparative column while fractions B02, B04, B05 and B15 were not considered for sub-fractionation considering their insufficient mass (<1mg) and the presence of complex mixtures of compounds as revealed by the TLC analyses. Fraction B01 was purified using a linear gradient following the method: 90:10 to 100% acetonitrile over 20 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Fraction B03 was purified using a linear gradient of water/acetonitrile following the method: 90:10 to 62:38 over 6 min then 62:38 to 56:44 over 9 min, then 56:44 to 100% acetonitrile over 5 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Fraction B06 was purified with a linear gradient of water/acetonitrile following the method: 80:20 to 40:60 over 20 min then 40:60 to 100% acetonitrile over 5 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Fraction B07 was purified with a linear gradient of water/acetonitrile following the method:

90:10 to 71.5:28.5 over 12.50 min, hold in isocratic mode over 5 min, then 71.5:28.5 to 67.5:32.5 over 3 min, then 67.5:32.5 to 100% acetonitrile over 5 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Fraction B08 was purified following the method: 90:10 to 50:50 over 20 min then 50:50 to 100% acetonitrile over 5 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Fraction B09 was purified with a linear gradient of water/acetonitrile following the method: 90:10 to 74.2:25.8 over 12.0 min, hold over 10 min, then 74.2:25.8 to 100% acetonitrile over 10 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Fraction B10 was purified with a linear gradient of water/acetonitrile following the method: 90:10 to 65:35 over 30 min then 65:35 to 100% acetonitrile over 5 min and then 100% acetonitrile for 5 min. Fractions B11-B14 were represented by complex mixtures of different molecules and contained very polar compounds, thus they were purified using a linear gradient of water/acetonitrile following the method: 99:1 to 70:30 over 35 min then 100% acetonitrile for 5 min. A total of 20 compounds were isolated from phase B after HPLC fractionation. Some of them (compounds **1**, **2**, **3**, **7**, **8**, **11** and **27**) had already been identified in phase A. Compounds **16** ( $R_t= 17.54$  min; 3.40 mg) and **20** ( $R_t= 18.41$  min; 3.30 mg) were obtained from fraction B06 (7.80 mg). Compounds **14** ( $R_t= 5.36$  min; 0.76 mg), **15** ( $R_t= 10.17$  min; 1.99 mg), a mixture of compounds **17** ( $R_t= 15.13$  min; 2.24 mg); **18** ( $R_t= 15.13$  min; 0.83 mg) and **19** ( $R_t= 15.13$  min; 0.32 mg) as well as compound **11** ( $R_t= 19.08$  min; 1.50 mg) were obtained from purification of fraction B07 (36.60 mg). Compound **23** ( $R_t= 12.3$  min; 0.50 mg), **3** ( $R_t= 17.51$  min; 0.70 mg) as well as compound **27** ( $R_t= 21.21$  min; 0.7 mg) were isolated from fraction B08 (15.00 mg). Compound **28** ( $R_t= 3.05$  min; 1.38 mg) was obtained from purification of B10 (45.40 mg). Compound **25** ( $R_t= 11.9$  min; 0.60 mg), a mixture of compounds **4** ( $R_t= 13.65$  min; 1.50 mg) and **5** ( $R_t= 13.65$  min; 1.00 mg) as well as compounds **1** ( $R_t= 13.98$  min; 5.50 mg), **8** ( $R_t= 16.32$  min; 1.80 mg) and **2** ( $R_t= 16.93$  min; 1.60 mg) were isolated from B11 (35.60 mg). Purification of B14 (97.80 mg) yielded a mixture of compounds **13** ( $R_t= 3.1$  min; 0.48 mg) and **24** ( $R_t= 3.1$  min; 0.24 mg). Analyses of phase B before fractionation (Figure 36) and the determination of purity of all fractions obtained were performed by HPLC using a linear gradient of water/acetonitrile as follows: 99:1 to 30:70 over 25 min, then 100% acetonitrile for 5 min. Peaks were observed at four wavelengths (214-254-280 and 320 nm).

### Identification of isolated compounds

A total of twenty eight known compounds were identified from BS-EAc<sub>f</sub> (Figure 37). Considering that compounds were isolated from BS-EAc<sub>f</sub> which represents a fraction (20.8% w.w<sup>-1</sup>) of the hydrophilic molecules present in BS<sub>HWE</sub>, the yields of isolated compounds were expressed as a percentage of BS-EAc<sub>f</sub> (w.w<sup>-1</sup>). The structures of these compounds were confirmed by comparing their physical and spectroscopic data (UV, [α], <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR and MS) with those of corresponding authentic samples or with the values found in the literature. Isolated compounds included five neolignans: cedrusin (**1**) (Kim *et al.*, 2005), dihydrodehydrodiconiferyl alcohol (**2**) (Fukuyama *et al.*, 1996), 1,4-benzodioxin-6-propanol,2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-(2S,3S) (**3**) (Fang *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 2000) and a mixture of *threo* (**4**) (Matsuda and Kikuchi, 1996; Ouyang *et al.*, 2011) and *erythro* 3-methoxy-8,4'-oxyneolignan-3',4,7,9,9'-pentol (**5**) (Fang *et al.*, 1992; Ouyang *et al.*, 2011); seven lignans: α-conidendrin (**6**) (Davies and Jin, 2003), isolariciresinol (**7**) (Eklund *et al.*, 2002), secoisolariciresinol (**8**) (Moon *et al.*, 2008), a mixture of 7(R) (**9**) and 7(S)-hydroxymatairesinol (**10**) (Fisher *et al.*, 2004), pinoresinol (**11**) (Guz and Stermitz, 2000; Moon *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2003), *epi*-pinoresinol (**12**) (Rahman *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 2004); three phenolic acids: protocatechuic acid (**13**), vanillic acid (**14**) and *trans-p*-coumaric acid (**15**); one stilbene: *trans*-resveratrol (**16**) (Ferre-Filmon *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2001); four flavonoids: a mixture of dihydroquercetin (taxifolin) (**17**) (Kiehlmann and Li, 1995; Lee *et al.*, 2003; Lundgren and Theander, 1988), pallasin (**18**) (Marques-de Oliveira *et al.*, 2006; Sakushima *et al.*, 1983), and (±) *epi*-taxifolin (**19**) (Kiehlmann and Li, 1995; Lee *et al.*, 2003; Lundgren and Theander, 1988), mearnsetin (**20**) (Marques-de Oliveira *et al.*, 2006; Rabesa and Voirin, 1979); four other phenolic compounds: dihydroconiferyl alcohol (**21**), *p*-vanillin (**22**), homovanillyl alcohol (**23**) (Christophoridou and Dais, 2009), orcinol (**24**); four non-phenolic compounds: 1,3-propanediol,2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy] (**25**) (Kouno *et al.*, 1992), 10-hydroxyverbenone (**26**) (Yildirim, 2011), 7-oxo-15-hydroxydehydroabietic acid (**27**) (Yang *et al.*, 2010), levulinic acid (**28**).



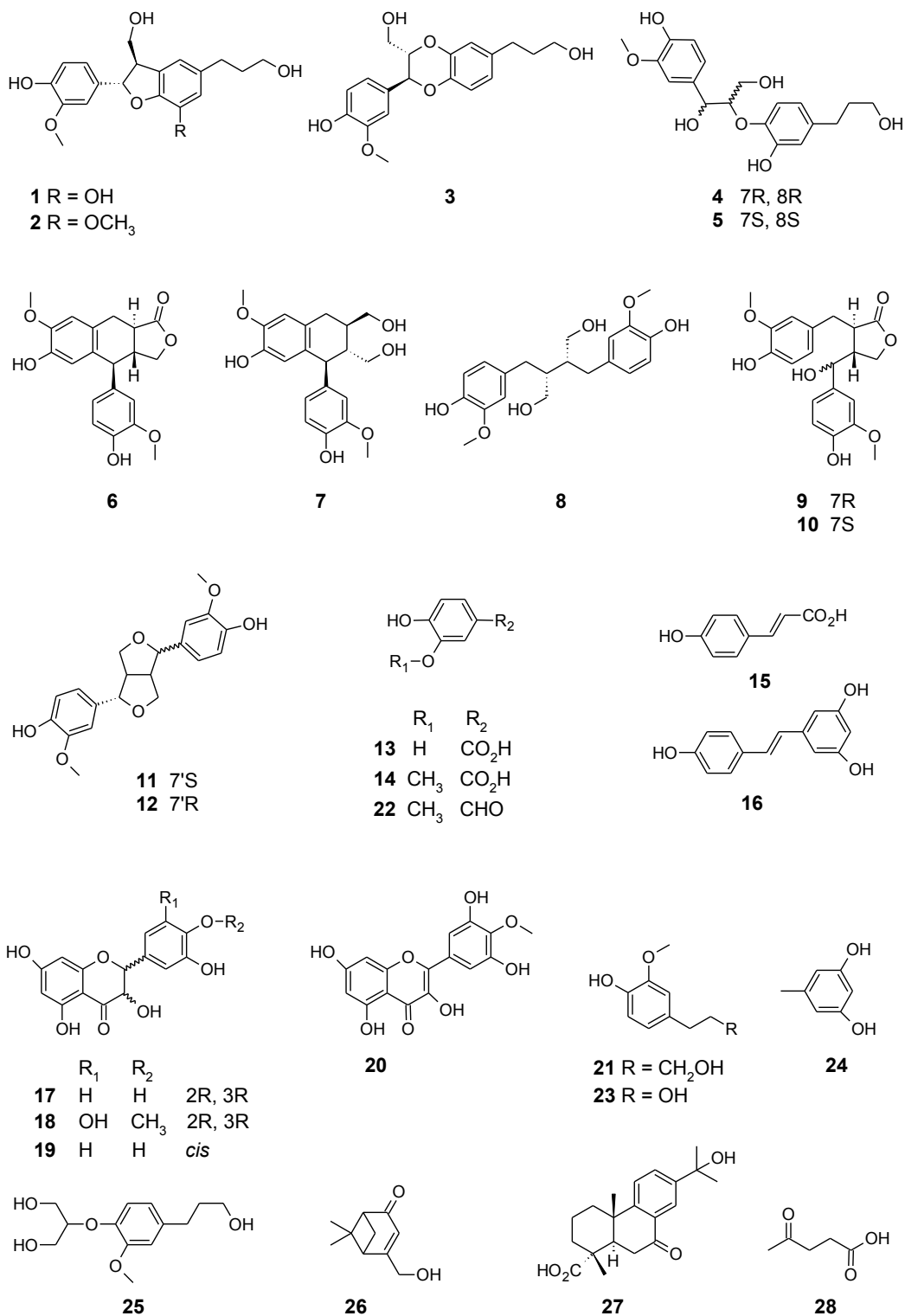


Figure 37 Chemical structures of the compounds isolated from the ethyl acetate soluble fraction (BS-EAcf) obtained from the hot water extract of black spruce bark (BS<sub>HWE</sub>)

### 3.3.4 Results and Discussion

#### **Polyphenols classes present in the ethyl acetate fraction**

As it can be observed from Table 17, the ethyl acetate fraction, BS-EAc<sub>f</sub>, contained higher total phenol, proanthocyanidins and hydroxycinnamic acid content than the crude aqueous extract of black spruce bark, BS<sub>HWE</sub>. Other studies have also shown that the ethyl acetate fraction obtained after fractionation of polar crude extracts presents higher phenol contents as determined by the Folin-Ciocalteu method (Joubert *et al.*, 2005).

Table 17 Total phenol, flavonoid, hydroxycinnamic acid and proanthocyanidin contents of hot water extract from *Picea mariana* bark and its ethyl acetate fraction

Extracts	Total Phen (mg GAE/g)	Total Flav (mg QE/g)	Total CinnAc (mg ChAE/g)	PAs content (mg CChE/g)	Reference
BS <sub>HWE</sub>	404.29±4.04	53.40±1.05*	90.28±0.92	11.79±0.11	(Garcia-Perez et al., 2010)
BS-EAc <sub>f</sub>	503.65 ± 26.20*	41.73 ± 1.02	112.5 ± 1.41*	19.01± 0.55*	-

BS<sub>HWE</sub> = black spruce extract obtained by hot water extraction; BS-EAc<sub>f</sub> = ethyl acetate fraction isolated from BS<sub>HWE</sub>. Total Phen = total phenols content; Total Flav = total flavonoids content; Total CinnAc = total hydroxycinnamic acids content, PAs content = proanthocyanidins content. \*p<0.05 Student's t test  
mg GAE/g=milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry extract; mg QE/g=milligrams of quercetin equivalents (QE) per gram of dry extract; mg ChAE/g=milligrams of chlorogenic acid equivalents (ChAE) per gram of dry extract; mg CChE/g=milligrams of cyanidin chloride equivalents (CChE) per gram of dry extract.

BS<sub>HWE</sub> is a crude extract composed of a complex mixture of phenolic and non-phenolic hydrophilic molecules. Therefore, the higher phenol and hydroxycinnamic acid contents in BS-EAc<sub>f</sub> could be explained by the purification and concentration of phenolic compounds throughout the fractionation procedure starting from the crude aqueous extract. As for the proanthocyanidins (PAs) content, results of the present study differ from those obtained in our previous work in which the content of PAs in BS<sub>HWE</sub> was higher than that of BS-EAc<sub>f</sub>

(290 vs. 148 mg PAs.g<sup>-1</sup> extract respectively) (Diouf *et al.*, 2009). Differences between these results can be explained by the use of different PAs standards for calibration. It is well known that whilst the acid-butanol assay confirms the presence of a polymeric interflavan structure unambiguously, the choice of the different standards can influence the yield of anthocyanidins (Schofield *et al.*, 2001). Results presented here were obtained using the monomer cyanidin chloride as standard, whereas in our previous study, the purified PAs were isolated directly from the crude black spruce bark aqueous extract. It has been reported that in some cases tannin polymers are incompletely converted by the HCl- ferric ammonium sulphate treatment, into dimers or trimers rather than into monomers, thus leading to underestimation of the content of PAs (Schofield *et al.*, 2001). Concerning the amount of flavonoids, a higher content was determined in BS<sub>HWE</sub> than in BS-EAc<sub>f</sub>. That could be explained by the presence of some glycoside-bound flavonoids in the crude extract which were not soluble in ethyl acetate (Ahmadu *et al.*, 2007). Indeed, compounds such as quercetin glycoside, kaempferol glycoside, dihydroquercetin-3'-O-β-D-glucopyranoside and isorhamnetin-3-O-(6''-O-acetyl)-β-D-glucopyranoside have been found in barks, needles and cones of the *Picea* spp. (Harris *et al.*, 2008; Pan and Lundgren, 1995).

### **Isolation of individual compounds present in the ethyl acetate fraction**

Very few studies exist to date on the characterization of polyphenolic compounds in *Picea mariana* (Miller) B.S.P bark. In fact, most of the data are only qualitative, and unequivocal identification, for example, by mass spectrometry or NMR, is lacking. Fractionation of BS-EAc<sub>f</sub> led to the isolation, quantification and characterization of 28 known compounds (Figure 37). On the whole, the five major compounds isolated were the cedrusin (**1**) (0.89% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>) followed by 7-oxo-15-hydroxydehydroabietic acid (**27**) (0.58% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>), pinoresinol (**11**) (0.56% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>), *trans*-resveratrol (**16**) (0.50% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>) and mearnsetin (**20**) (0.49% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>). When regrouped in different phenol classes, predominant compounds identified in this fraction were neolignans and lignans (3.57% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>) followed by flavonoids (0.99% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>).

## Neolignans

Neolignans represent 1.94% (w.w<sup>-1</sup>) of BS-EAc<sub>f</sub>. The predominant neolignan found in this fraction was the cedrusin (**1**) (0.89% w.w<sup>-1</sup>) followed by the mixture of *threo* (**4**) and *erythro* 3-methoxy-8,4'-oxyneoligna-3',4,7,9,9'-pentol (**5**) (0.48% w.w<sup>-1</sup>), dihydrodehydrodiconiferyl alcohol (**2**) (0.41% w.w<sup>-1</sup>) and compound **3** (0.16% w.w<sup>-1</sup>). Cedrusin derivatives such as the cedrusin-4-*O*-glucoside, cedrusin-4-*O*-rhamnetin and cedrusin-methyl-4-*O*-glucoside have been identified in the needles of Norway spruce (Rummukainen *et al.*, 2007). As to the compound **2**, it has been identified in the bark of *Picea jezoensis* (Wada *et al.*, 2009; Wada *et al.*, 2007) and in a suspension culture from the seedling leaves of *Picea glehnii* (Nabeta *et al.*, 1994). However, to the best of our knowledge, no reports exist concerning the occurrence of compounds **3**, **4** and **5** in the *Picea* genus.

## Lignans

Lignans are of great interest in the search for novel agents with antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory properties (Coy *et al.*, 2009; Di Micco *et al.*, 2011). These compounds represent 1.63% (w.w<sup>-1</sup>) of BS-EAc<sub>f</sub>. The predominant lignan found in this fraction was the pinoresinol (**11**) (0.56% w.w<sup>-1</sup>) followed by secoisolariciresinol (**8**) (0.40% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>), isolariciresinol (**7**) (0.24% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>) and *epi*-pinoresinol (**12**) (0.15% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>). Additionally, 7(*R*)-hydroxymatairesinol (**9**) (0.10% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>), 7(*S*)-hydroxymatairesinol (**10**) (0.11% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>) and  $\alpha$ -conidendrin (**6**) (0.07% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>), were identified in this fraction. Lignans have been extensively analyzed in some spruce species, mainly in Norway spruce since a long time (Ekman, 1976; Mattinen *et al.*, 1998). Indeed, the knots of this species contain extremely large amounts of these compounds, 6–24% (w.w<sup>-1</sup>), with hydroxymatairesinol comprising 65–85% of all lignans (Willfor *et al.*, 2003). Lignans such as secoisolariciresinol, 7-hydroxymatairesinol, matairesinol,  $\alpha$ -conidendrin, pinoresinol and isolariciresinol have been described in *Picea abies*, *Picea glauca* and *Picea omorika* knots and heartwood (Willfor *et al.*, 2003; Willfor *et al.*, 2004). The *epi*-pinoresinol has been determined by Weinges (1960) from the callus resin of *Picea abies* as a product of biosynthesis (Weinges, 1960), although it is known that this compound can be formed from

pinoresinol in acidic solutions (Lindberg, 1950). To the best of our knowledge, no exhaustive studies exist about the lignan composition in *Picea mariana* bark, but it has been demonstrated that the knots of this wood species contain more lignans than the corresponding stemwood (1-5% vs. 0.2% w.w<sup>-1</sup> respectively) (Willfor *et al.*, 2004). With the exception of isolariciresinol and *epi*-pinoresinol, lignans such as pinoresinol, secoisolariciresinol, 7-hydroxymatairesinol and  $\alpha$ -conidendrin have also been described in black spruce heartwood and knots (Pietarinen *et al.*, 2006; Willfor *et al.*, 2004). In addition, the presence of other lignans not identified in our study, such as liovil, lariciresinol, matairesinol and cyclolariciresinol have been reported in *Picea mariana* knots and heartwood (Willfor *et al.*, 2004).

Although BS-EAc<sub>f</sub> represents a fraction of the hydrophilic molecules present in BS<sub>HWE</sub>, our results suggest that pinoresinol could be the dominant lignan in the bark, whereas the two epimers of the 7-hydroxymatairesinol were determined to be the predominant lignans found in knots and heartwood (Willfor *et al.*, 2004).

### Phenolic acids

Phenolic acids have a potential protective role against oxidative stress and can act as anti-inflammatory agents (Fernandez *et al.*, 1998). These compounds represent 0.47% (w.w<sup>-1</sup>) of BS-EAc<sub>f</sub>. The predominant phenolic acid isolated from this fraction was by far *trans-p*-coumaric acid (**15**) (0.29% w.w<sup>-1</sup>) followed by vanillic acid (**14**) (0.11% w.w<sup>-1</sup>) and protocatechuic acid (**13**) (0.07% w.w<sup>-1</sup>). The protocatechuic and vanillic acids have been previously identified in the needles of *Picea abies* (Rummukainen *et al.*, 2007; Soukupova *et al.*, 2000). Furthermore, compound **13** has also been described in the bark of *Picea jezoensis* (Wada *et al.*, 2009; Wada *et al.*, 2007), whereas compound **15** has been identified in the root bark from Norway spruce (Pan and Lundgren, 1995) and in twigs and leaves of *Picea neveitchii* (Song *et al.*, 2011).

### Stilbenes

In this study, the only stilbene found in BS-EAc<sub>f</sub> was the *trans*-resveratrol (**16**). This compound constitutes one of the major isolated molecules, representing 0.50% (w.w<sup>-1</sup>) of

this fraction. In a previous work, it was demonstrated that resveratrol was formed by the partially purified stilbene synthase enzyme from cell culture extracts from *Picea excelsa* (Rolfs and Kindl, 1984). Moreover, a recent study suggests that the formation of resveratrol could be the first step for the biosynthesis of other major tetrahydroxystilbenes, astringin and isorhapontin, widely present in spruce bark (Hammerbacher *et al.*, 2011). However, in our study, these compounds and other characteristic stilbene glycosides such as isorhapontigenin and astringenin described in the bark of *Picea mariana*, *Picea engelmannii*, *Picea glauca*, *Picea rubens*, *Picea abies*, *Picea sitchensis* and *Picea glehnii* (Manners and Swan, 1971; Pan and Lundgren, 1995; Pearce, 1996; Shibutani *et al.*, 2004) were not found. That is particularly surprising, considering that some of these compounds have also been identified in the ethyl acetate soluble fraction (Shibutani *et al.*, 2004).

*Trans*-resveratrol displays antioxidant and anti-inflammatory properties (Kalantari and Das, 2010). Previously, in a multicenter double blind clinical study, psoriatic patients treated twice a day during a month with 1% resveratrol ointment showed a marked improvement of their psoriasis compared to the control group (Pelliccia, 2001). Therefore, the *trans*-resveratrol could be one of the molecules responsible of the *in vitro* anti-inflammatory properties of BS-EAc<sub>f</sub> on psoriatic keratinocytes, but further investigation should be accomplished to demonstrate its antipsoriatic properties alone or in combination with other compounds here identified.

*Trans*-resveratrol has been widely studied in grapes and red wines. Even though many factors such as the plant variety, environmental conditions, extraction procedure and solvent used during extraction can influence the quantification of this compound in plant tissues (Roldan *et al.*, 2003; Zhao and Hall, 2008), it reaches about 40.61  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  in the aqueous extract from Thompson seedless dried grapes (Zhao and Hall, 2008). Other edible and non-edible sources of resveratrol include dark chocolate (0.4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Counet *et al.*, 2006), peanuts (0.03-0.14  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Sanders *et al.*, 2000) and the roots of the *Polygonum cuspidatum* used in ancient Chinese and Japanese herbal medicines (2960-3770  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Vastano *et al.*, 2000). Taking into account the yield obtained through extraction (32.63 g dry bark spruce bark/3.25 g BS<sub>HWE</sub>/676.00 mg BS-EAc<sub>f</sub>), the initial *Picea mariana* dry bark contained at least 104.19  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of *trans*-resveratrol and could be considered as a new and

profitable source of this molecule. In the same way, BS-EAc<sub>f</sub> contains 502.95 mg *trans*-resveratrol/100 g of dry extract. When compared with the content of this molecule in other commercial polyphenolic extracts as determined by Counet *et al.* (Counet *et al.*, 2006), one can see that the content of this compound in BS-EAc<sub>f</sub>, even if present in lower quantities than in *Polygonum cuspidatum* extract (19719 mg/100 g dry extract), is still higher than those found in commercial red wine (337 mg/100 g dry extract), red grape skin (60-75 mg/100 g dry extract), white grape skin (63 mg/100 g dry extract), red grape seed (27 mg/100 g dry extract) and white grape seed extracts (25 mg/100 g dry extract). Therefore, the BS-EAc<sub>f</sub> can be regarded as a rich source of resveratrol. That is particularly interesting considering that this compound has a wide range of nutraceutical and phytopharmaceutical properties.

### Flavonoids

Flavonoids have been investigated in some *Picea* species with respect to their chemistry, their occurrence in different parts of the trees, and their biological importance. Within *Picea*, flavonols such as kaempferol and quercetin have been frequently reported in different tissues (Ivanova *et al.*, 1975; Slimestad *et al.*, 1995; Slimestad *et al.*, 1999; Slimestad and Hostettmann, 1996; Song *et al.*, 2011). Some flavonols, glycosylated at the 3-position such as kaempferol-3-glucoside (glc), quercetin-3-glc and isorhamnetin-3-glc, have been detected in buds and juvenile needles of *Picea mariana* (Slimestad, 2003). However, very few studies have reported the occurrence of these compounds in the bark. Flavonoids represent 0.99% (w.w<sup>-1</sup>) of BS-EAc<sub>f</sub>. The major flavonoids identified in this fraction were mearnsetin (**20**) (0.49% w.w<sup>-1</sup>) followed by dihydroflavonols such as dihydroquercetin (taxifolin) (**17**) (0.33% w.w<sup>-1</sup>), pallasin (**18**) (0.12% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>) and (±) epitaxifolin (**19**) (0.05% w.w<sup>-1</sup>). Recently, mearnsetin was identified for the first time in *Picea* genus, specifically in the ethyl-acetate soluble fraction (EAc<sub>f</sub>) of the ethanolic extract obtained from the twigs and leaves of *Picea neoveitchii* (Song *et al.*, 2011). However, its yield in EAc<sub>f</sub> was lower ( $8.69 \times 10^{-5}$  % w.w<sup>-1</sup>) (Song *et al.*, 2011) than that obtained in BS-EAc<sub>f</sub>. The presence of dihydroquercetin-3'-O-β-D-glucopyranoside has been reported in *Picea abies* root bark (Pan and Lundgren, 1995). Taxifolin has also been

identified in the barks of *Picea mariana*, *Picea engelmannii*, *Picea glauca*, *Picea rubens* (Manners and Swan, 1971) and *Picea jezoensis* (Wada *et al.*, 2009; Wada *et al.*, 2007).

In our previous work, the use of HPLC-DAD techniques allowed the identification of this compound from BS-EAc<sub>f</sub> (66.7 mg.g<sup>-1</sup>) (Diouf *et al.*, 2009). The high yield previously reported could be explained by difficulties in its separation and by the inherent limitations of the analytical techniques used. In fact, in the present study, compounds **17**, **18** and **19** eluted as a mixture at 15.13 min and only the use of spectroscopic data (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and MS) allowed their accurate characterization. To our knowledge, this is the first report on the presence of compounds **18** and **19** in *Picea mariana* bark and in *Picea* genus. It is important to note that even though compound **19** has been identified in other plants such as *Anastatica hierochuntica* (Nakashima *et al.*, 2010), it can also result from C-2 epimerization of taxifolin in hot aqueous solutions (Kiehlmann and Li, 1995) and therefore it could represent an artifact.

### Other phenolic compounds

Other phenolic compounds were also identified in BS-EAc<sub>f</sub> such as *p*-vanillin (**22**) (0.12% w.w<sup>-1</sup>), homovanillyl alcohol (**23**) (0.07% w.w<sup>-1</sup>), dihydroconiferyl alcohol (**21**) (0.06% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>) and orcinol (**24**) (0.04% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>). Compound **22** has been found in the wood of *Picea koraiensis*, *Picea ovobata* and *Picea ajartensis* (Leont'eva *et al.*, 1974). Compound **21** is involved in biosynthetic pathway of lignins (Savidge and Forster, 2001) and was identified as a product of lignin degradation in wood of *Picea glauca* and *Picea abies* (Arias *et al.*, 2010; Pepper and Lee, 1969). To our knowledge, no reports exist concerning the occurrence of compounds **23** and **24** in *Picea* species, therefore this is the first report on their occurrence in this genus.

### Miscellaneous

Although most of chemical constituents identified from BS-EAc<sub>f</sub> were phenolic compounds (84.91% w.w<sup>-1</sup> of the total mass of isolated molecules), other non-phenolic molecules were also found in this fraction. Indeed, 7-oxo-15-hydroxydehydroabietic acid (**27**), a



diterpenoid acid, was one of the predominant isolated compounds (0.58% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>). Abietane-type diterpenes, mainly oxidized derivatives, are considered as bioactive molecules (Kinouchi *et al.*, 2000) and their occurrence has been documented in *Picea mariana* heartwood (Conner *et al.*, 1980) and in the stem bark of *Picea glehnii* (Kinouchi *et al.*, 2000). Other non-phenolic compounds also isolated from BS-EAc<sub>f</sub>, were levulinic acid (**28**) (0.20% w.w<sup>-1</sup>), 10-hydroxyverbenone (**26**) (0.15% w.w<sup>-1</sup>) and 1,3-propanediol,2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy] (**25**) (0.09% w.w<sup>-1</sup> of BS-EAc<sub>f</sub>). Compound **26** is reported to be formed as a result of verbenone biotransformation by some microorganisms (Yildirim, 2011), whereas verbenone has been identified as a product of *trans*-verbenol oxidation after treatment of *Picea abies* cells with (*R*), (*S*) and *rac*- $\alpha$ -pinene (Vanek *et al.*, 2005). No reports were found about the occurrence of compound **25** in *Picea* spp. Levulinic acid, a common product of acid transformation of hexose sugars, has been identified as a result of acid-hydrolysis of Norway spruce wood (Larsson *et al.*, 1999).

### 3.3.5 Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first exhaustive report cataloguing the polyphenols in *Picea mariana* bark. Indeed, these results represent an important addition to the information on the phytochemical composition of hydrophilic extractives present in black spruce bark. This study also constitutes the first report describing the presence of the following compounds: 1,4-benzodioxin-6-propanol,2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-(2S,3S) (**3**), *threo* and *erythro* 3-methoxy-8,4'-oxyneolignan-3',4,7,9,9'-pentol (**4**, **5**), pallasiin (**18**), ( $\pm$ ) *epi*-taxifolin (**19**), homovanillyl alcohol (**23**), orcinol (**24**) and 1,3-propanediol,2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy] (**25**) in the *Picea* genus.

The isolation and characterization of these compounds was a difficult task, considering the high number of isomers and the diversity of molecules present in the bark. Neolignans and lignans were the major compounds isolated from the ethyl acetate soluble fraction. Interestingly, the major polyphenols here identified stemmed from the phenylpropanoid biosynthetic pathways, shared with that of lignins. The forest trees are vascular plants characterized by a high lignification of tissues and therefore they represent precious sources of phenylpropanoid molecules displaying numerous bioactivities also found in vegetables and fruits (Stevanovic *et al.*, 2009). Indeed, some of the dominant molecules among those isolated from the ethyl acetate fraction of black spruce bark aqueous extract (pinoresinol (**11**), *trans*-resveratrol (**16**), mearnsetin (**20**) and 7-oxo-15-hydroxydehydroabietic acid (**27**) possess important antioxidant and anti-inflammatory properties (Jung *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2009; Sadasivam and Kumaresan, 2011). Furthermore, other minor compounds also identified in this study (isolariciresinol (**7**), secoisolariciresinol (**8**), 7(R) and 7(S) hydroxymatairesinol (**9**, **10**), *trans*-p-coumaric acid (**15**) and taxifolin (**17**), are recognized as bioactive polyphenols (Fernandez *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2009; Yesilada, 2008) and could contribute to the anti-inflammatory and antioxidant activity of BS-EAc<sub>f</sub>, which was determined in our previous studies.

From the chemical composition described above, the *Picea mariana* bark could be considered as a new source of bioactive molecules, particularly as an alternative rich source of *trans*-resveratrol. However, a more accurate quantification of this compound in the bark should be performed taking into account different solvents, extraction procedures and all fractions that compose BS<sub>HWE</sub>. The extraction and purification techniques reported in this study could be used for the production of sufficient quantities of pure compounds to study their potential as anti-inflammatory agents to be used in the formulation of new natural products and/or pharmaceutical products for psoriasis treatment.

### 3.3.6 Acknowledgments

The authors are very grateful to the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and to the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) for the financial support of this project (research grant to YD, RP and TS). The Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (research grant to TS, and scholarship to MEGP) and the “Fonds d’enseignement et de recherche” (FER) of the Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, QC, Canada (scholarship to MEGP) are also acknowledged. RP was recipient of a research fellowship from the «Fonds de la Recherche en Santé du Québec» (FRSQ) of Québec, Canada. The technical support of M. Yves Bedard of the “Centre de recherche sur le bois, Université Laval” is also gratefully acknowledged by the authors.

## 3.3.7 References

- Ahmadu, A. A., Hassan, H. S., Abubakar, M. U., and Akpulu, I. N. (2007). Flavonoid glycosides from *Byrsocarpus coccineus* leaves. *Schum and thonn (connaraceae)*. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, **4**(3), 257-260.
- Arias, M. E., Rodriguez, J., Perez, M. I., Hernandez, M., Polvillo, O., Gonzalez-Perez, J. A., and Gonzalez-Vila, F. (2010). Analysis of chemical changes in *Picea abies* wood decayed by different *Streptomyces* strains showing evidence for biopulping procedures. *Wood Sci. Technol.*, **44**(2), 179-188.
- Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., and Pizzolatti, M. G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, **45**(2), 156-161.
- Conner, A. H., Diehl, M. A., and Rowe, J. W. (1980). Tall Oil Precursors and Turpentine in Black and White Spruce. *Wood Science*, **13**(2), 111-116.
- Counet, C., Callemien, D., and Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, **98**(4), 649-657.
- Coy, E. D., Cuca, L. E., and Sefkow, M. (2009). COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **19**(24), 6922-6925.
- Chandrasekara, A., and Shahidi, F. (2011). Antiproliferative potential and DNA scission inhibitory activity of phenolics from whole millet grains. *Journal of Functional Foods*, **3**(3), 159-170.
- Christophoridou, S., and Dais, P. (2009). Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, **633**(2), 283-292.
- Davies, H. M. L., and Jin, Q. H. (2003). Intermolecular C-H activation at benzylic positions: synthesis of (+)-imperanene and (-)-alpha-conidendrin. *Tetrahedron-Asymmetry*, **14**(7), 941-949.
- Di Micco, S., Mazue, F., Daquino, C., Spatafora, C., Delmas, D., Latruffe, N., Tringali, C., Riccio, R., and Bifulco, G. (2011). Structural basis for the potential antitumour activity of DNA-interacting benzo[*kl*]xanthene lignans. *Org. Biomol. Chem.*, **9**(3), 701-710.
- Diouf, P. N., Stevanovic, T., and Cloutier, A. (2009). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, **113**(4), 897-902.

- Eklund, P., Sillanpaa, R., and Sjöholm, R. (2002). Synthetic transformation of hydroxymatairesinol from Norway spruce (*Picea abies*) to 7-hydroxysecoisolariciresinol, (+)-lariciresinol and (+)-cyclolariciresinol. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*(16), 1906-1910.
- Ekman, R. (1976). Analysis of Lignans in Norway Spruce by Combined Gas-Chromatography - Mass-Spectrometry. *Holzforschung*, **30**(3), 79-85.
- European Pharmacopoeia. Fraxini folium.* (2002). Strasbourg: DEQS.
- Fang, J. M., Lee, C. K., and Cheng, Y. S. (1992). Lignans from Leaves of *Juniperus-Chinensis*. *Phytochemistry*, **31**(10), 3659-3661.
- Fernandez, M. A., Saenz, M. T., and Garcia, M. D. (1998). Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **50**(10), 1183-1186.
- Ferre-Filmon, K., Delaude, L., Demonceau, A., and Noels, A. F. (2005). Stereoselective synthesis of (E)-hydroxystilbenoids by ruthenium-catalyzed cross-metathesis. *European Journal of Organic Chemistry* (15), 3319-3325.
- Fischer, J., Reynolds, A. J., Sharp, L. A., and Sherburn, M. S. (2004). Radical carboxyarylation approach to lignans. Total synthesis of (-)-arctigenin, (-)-matairesinol, and related natural products. *Organic Letters*, **6**(9), 1345-1348.
- Fukuyama, Y., Nakahara, M., Minami, H., and Kodama, M. (1996). Two new benzofuran-type lignans from the wood of *Viburnum awabuki*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **44**(7), 1418-1420.
- Gao, H., Shupe, T. F., Eberhardt, T. L., and Hse, C. Y. (2007). Antioxidant activity of extracts from the wood and bark of Port Orford cedar. *Journal of Wood Science*, **53**(2), 147-152.
- Garcia-Perez, M. E., Royer, M., Duque-Fernandez, A., Diouf, P. N., Stevanovic, T., and Pouliot, R. (2010). Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *J Ethnopharmacol*, **132**(1), 251-258.
- García-Pérez, M. E., Royer, M., Rusu, D., Poubelle, P. E., Stevanovic, T., and Pouliot, R. (2011). Black spruce polyphenols: chemical characterization and study of their effects on the IL-8 production in normal and psoriatic keratinocytes stimulated with TNF- $\alpha$ . Multidisciplinary approaches to modern therapeutics: joining forces for a healthier tomorrow May 24-27, 2011 Hilton Montreal Bonaventure Montreal, QC, Canada Abstracts. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **14**(3), 17S-190S.

- Gu, W. X., Jing, X. B., Pan, X. F., Chan, A. S. C., and Yang, T. K. (2000). First asymmetric synthesis of chiral 1,4-benzodioxane lignans. *Tetrahedron Letters*, **41**(32), 6079-6082.
- Guz, N. R., and Stermitz, F. R. (2000). Spectral comparisons of coniferyl and cinnamyl alcohol epoxide derivatives with a purported cis-epoxyconiferyl alcohol isolate. *Phytochemistry*, **54**(8), 897-899.
- Hammerbacher, A., Ralph, S. G., Bohlmann, J., Fenning, T. M., Gershenzon, J., and Schmidt, A. (2011). Biosynthesis of the Major Tetrahydroxystilbenes in Spruce, Astringin and Isorhapontin, Proceeds via Resveratrol and Is Enhanced by Fungal Infection. *Plant Physiology*, **157**(2), 876-890.
- Harris, C. S., Lambert, J., Saleem, A., Coonishish, J., Martineau, L. C., Cuerrier, A., Haddad, P. S., Arnason, J. T., and Bennett, S. A. L. (2008). Antidiabetic activity of extracts from needle, bark, and cone of *Picea glauca*: Organ-specific protection from glucose toxicity and glucose deprivation. *Pharmaceutical Biology*, **46**(1-2), 126-134.
- Ivanova, S. Z., Medvedeva, S. A., Lutskii, V. I., Tyukavkina, N. A., and Zelenikina, N. D. (1975). Flavonoids of the needles of *Picea ajanensis* *Chemistry of natural products*, **11**(6), 817-818.
- Joubert, E., Winterton, P., Britz, T. J., and Gelderblom, W. C. A. (2005). Antioxidant and pro-oxidant activities of aqueous extracts and crude polyphenolic fractions of rooibos (*Aspalathus linearis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(26), 10260-10267.
- Jung, H. W., Mahesh, R., Lee, J. G., Lee, S. H., Kim, Y. S., and Park, Y. K. (2010). Pinoresinol from the fruits of *Forsythia koreana* inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia. *Neuroscience Letters*, **480**(3), 215-220.
- Kalantari, H., and Das, D. K. (2010). Physiological effects of resveratrol. *Biofactors*, **36**(5), 401-406.
- Kang, N. J., Shin, S. H., Lee, H. J., and Lee, K. W. (2011). Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther*, **130**(3), 310-324.
- Kiehlmann, E., and Li, E. P. M. (1995). Isomerization of Dihydroquercetin. *Journal of Natural Products-Lloydia*, **58**(3), 450-455.
- Kim, T. H., Ito, H., Hayashi, K., Hasegawa, T., Machiguchi, T., and Yoshida, T. (2005). Aromatic constituents from the heartwood of *Santalum album* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **53**(6), 641-644.

- Kinouchi, Y., Ohtsu, H., Tokuda, H., Nishino, H., Matsunaga, S., and Tanaka, R. (2000). Potential antitumor-promoting diterpenoids from the stem bark of *Picea glehni*. *Journal of Natural Products*, **63**(6), 817-820.
- Kouno, I., Yanagida, Y., Shimono, S., Shintomi, M., and Yang, C. S. (1992). Phenylpropanoids from the Barks of *Illicium-Difengpi*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **40**(9), 2461-2464.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., and Nilvebrant, N. O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**(3-4), 151-159.
- Lee, D., Bhat, K. P. L., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Pezzuto, J. M., and Kinghorn, A. D. (2001). Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Journal of Natural Products*, **64**(10), 1286-1293.
- Lee, E. H., Kim, H. J., Song, Y. S., Jin, C. B., Lee, K. T., Cho, J. S., and Lee, Y. S. (2003). Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Archives of Pharmacal Research*, **26**(12), 1018-1023.
- Leont'eva, V. G., Modonova, L. D., and Tyukavkina, N. A. (1974). Lignans from the wood of *Picea koraiensis*. *Chemistry of natural products*, **10**(3), 399-400.
- Lindberg, B. (1950). Epi-pinoresinol. *Acta Chem. Scand.*, **4**, 391-392.
- Lundgren, L. N., and Theander, O. (1988). The Constituents of Conifer Needles .14. Cis-Dihydroquercetin and Trans-Dihydroquercetin Glucosides from Needles of *Pinus-Sylvestris*. *Phytochemistry*, **27**(3), 829-832.
- Manners, G. D., and Swan, E. P. (1971). Stilbenes in Barks of 5 Canadian *Picea* Species. *Phytochemistry*, **10**(3), 607-&.
- Marques-de Oliveira, A., dos Santos-Humberto, M. M. S., da Silva, J. M., Almeida-Rocha, R. F., and Goulart-Sant'Ana, A. E. (2006). Phytochemical studies of the extracts of stem bark and leaves of *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae) and evaluation of their molluscicidal and larvicidal activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **16** (Supl.), 618-624.
- Matsuda, N., and Kikuchi, M. (1996). Studies on the constituents of *Lonicera* species .10. Neolignan glycosides from the leaves of *Lonicera gracilipes* var *glandulosa* Maxim. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **44**(9), 1676-1679.
- Mattinen, J., Sjöholm, R., and Ekman, R. (1998). NMR-spectroscopic study of hydroxymatairesinol, the major lignan in Norway spruce (*Picea abies*) heartwood. *Ach-Models in Chemistry*, **135**(4), 583-590.



- Moon, S. S., Rahman, A. A., Kim, J. Y., and Kee, S. H. (2008). Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**(15), 7264-7269.
- Nabeta, K., Hirata, M., Ohki, Y., Samaraweera, S. W. A., and Okuyama, H. (1994). Lignans in Cell-Cultures of *Picea-Glehnii*. *Phytochemistry*, **37**(2), 409-413.
- Nakashima, S., Matsuda, H., Oda, Y., Nakamura, S., Xu, F. M., and Yoshikawa, M. (2010). Melanogenesis inhibitors from the desert plant *Anastatica hierochuntica* in B16 melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**(6), 2337-2345.
- Oh, Y. C., Kang, O. H., Choi, J. G., Chae, H. S., Lee, Y. S., Brice, O. O., Jung, H. J., Hong, S. H., Lee, Y. M., and Kwon, D. Y. (2009). Anti-inflammatory effect of resveratrol by inhibition of IL-8 production in LPS-induced THP-1 cells. *Am J Chin Med*, **37**(6), 1203-1214.
- Ouyang, F., Liu, Y., Li, R., Ling, L., Wang, N. L., and Yao, X. S. (2011). Five Lignans and an Iridoid from *Sambucus williamsii*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **9**(1), 0026-0029.
- Pan, H. F., and Lundgren, L. N. (1995). Phenolic Extractives from Root Bark of *Picea-Abies*. *Phytochemistry*, **39**(6), 1423-1428.
- Pearce, R. B. (1996). Effects of exposure to high ozone concentrations on stilbenes in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong) Carr) bark and on its lignification response to infection with *Heterobasidion annosum* (Fr) Bref. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **48**(2), 117-129.
- Pelliccia, M. T., Gianella, A., Gianella, J. (2001). Resveratrol for the treatment of exfoliative eczema, acne or psoriasis. EP1138323.
- Pepper, J. M., and Lee, Y. W. (1969). Lignin and Related Compounds .I. a Comparative Study of Catalysts for Lignin Hydrogenolysis. *Canadian Journal of Chemistry*, **47**(5), 723-&.
- Pietarinen, S. P., Willfor, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., and Holmbom, B. R. (2006). Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *Journal of Wood Science*, **52**(5), 436-444.
- Pigman, W., Anderson, E., Fischer, R., Buchanan, M. A., and Browning, B. L. (1953). Color Precursors in Spruce Woods and Western Hemlockwoods and Inner Barks. *Tappi*, **36**(1), 4-12.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., and Chan, B. G. (1986). The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry*, **25**(1), 223-230.
- Rabesa, Z. A., and Voirin, B. (1979). New O-Methylated Flavone Aglycones Derived from Mearnsetine in *Alluaudia-Ascendens*. *Phytochemistry*, **18**(2), 360-362.

- Rahman, M. M. A., Dewick, P. M., Jackson, D. E., and Lucas, J. A. (1990). Lignans of Forsythia-Intermedia. *Phytochemistry*, **29**(6), 1971-1980.
- Roldan, A., Palacios, V., Caro, I., and Perez, L. (2003). Resveratrol content of Palomino fino grapes: Influence of vintage and fungal infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(5), 1464-1468.
- Rolfs, C. H., and Kindl, H. (1984). Stilbene Synthase and Chalcone Synthase - 2 Different Constitutive Enzymes in Cultured-Cells of Picea-Excelsa. *Plant Physiology*, **75**(2), 489-492.
- Rummukainen, A., Julkunen-Tiitto, R., Raisanen, M., and Lehto, T. (2007). Phenolic compounds in Norway spruce as affected by boron nutrition at the end of the growing season. *Plant and Soil*, **292**(1-2), 13-23.
- Sadasivam, K., and Kumaresan, R. (2011). Antioxidant behavior of mearnsetin and myricetin flavonoid compounds - A DFT study. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **79**(1), 282-293.
- Sakushima, A., Coskun, M., Hisada, S., and Nishibe, S. (1983). Flavonoids from Rhamnus-Pallasii. *Phytochemistry*, **22**(7), 1677-1678.
- Sanders, T. H., McMichael, R. W., and Hendrix, K. W. (2000). Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(4), 1243-1246.
- Savidge, R. A., and Forster, H. (2001). Coniferyl alcohol metabolism in conifers - II. Coniferyl alcohol and dihydroconiferyl alcohol biosynthesis. *Phytochemistry*, **57**(7), 1095-1103.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., and Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, **91**(1-2), 21-40.
- Shibutani, S., Samejima, M., and Doi, S. (2004). Effects of stilbenes from bark of Picea glehnii (Sieb. et Zucc) and their related compounds against feeding behaviour of Reticulitermes speratus (Kolbe). *Journal of Wood Science*, **50**(5), 439-444.
- Slimestad, R. (2003). Flavonoids in buds and young needles of Picea, Pinus and Abies. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**(11), 1247-1255.
- Slimestad, R., Andersen, O. M., Francis, G. W., Marston, A., and Hostettmann, K. (1995). Syringetin 3-O-(6"-Acetyl)-Beta-Glucopyranoside and Other Flavonols from Needles of Norway Spruce, Picea-Abies. *Phytochemistry*, **40**(5), 1537-1542.
- Slimestad, R., Francis, G. W., and Andersen, O. M. (1999). Directed search for plant constituents: a case study concerning flavonoids in Norway spruce. *Euphytica*, **105**(2), 119-123.

- Slimestad, R., and Hostettmann, K. (1996). Characterisation of phenolic constituents from juvenile and mature needles of Norway spruce by means of high performance liquid chromatography mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, **7**(1), 42-48.
- Song, Z. J., Chen, W. Q., Du, X. Y., Zhang, H., Lin, L. J., and Xu, H. H. (2011). Chemical constituents of *Picea neoveitchii*. *Phytochemistry*, **72**(6), 490-494.
- Soukupova, J., Cvikrova, M., Albrechtova, J., Rock, B. N., and Eder, J. (2000). Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *New Phytologist*, **146**(3), 403-414.
- Stevanovic, T., Diouf, P. N., and García-Pérez, M. E. (2009). Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. *Current Nutrition & Food Science*, **5**, 264-295.
- Swain, N. A., Brown, R. C. D., and Bruton, G. (2004). A versatile stereoselective synthesis of endo,exo-furofuranones: Application to the enantioselective synthesis of furofuran lignans. *Journal of Organic Chemistry*, **69**(1), 122-129.
- Vanek, T., Halik, J., Vankova, R., and Valterova, I. (2005). Formation of trans-verbenol and verbenone from alpha-pinene catalysed by immobilised *Picea abies* cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **69**(2), 321-325.
- Vastano, B. C., Chen, Y., Zhu, N. Q., Ho, C. T., Zhou, Z. Y., and Rosen, R. T. (2000). Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(2), 253-256.
- Wada, S., Yasui, Y., Tokuda, H., and Tanaka, R. (2009). Anti-tumor-initiating effects of phenolic compounds isolated from the bark of *Picea jezoensis* var. *jezoensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**(17), 6414-6421.
- Wada, S. I., Yasui, Y., Hitomi, T., and Tanaka, R. (2007). Structures and radical-scavenging activities of phenolic constituents from the bark of *Picea jezoensis* var. *jezoensis*. *Journal of Natural Products*, **70**(10), 1605-1610.
- Weinges, K. (1960). Die Lignane des Überwallungsharzes der Fichte. *Tetrahedron Letters*, **20**, 1-2.
- Willfor, S., Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C., and Holmbom, B. (2003). Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung*, **57**(1), 27-36.
- Willfor, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M., and Holmbom, B. (2004). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. *Holzforschung*, **58**(4), 335-344.

- Wu, C. L., Feng, D. R., Ma, H. L., Xie, H., Wang, H. B., and Wang, J. F. (2009). Effect of *Pinus massoniana* bark extract on IFN-gamma-induced ICAM-1 expression in HaCaT human keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**(1), 48-53.
- Xie, L. H., Akao, T., Hamasaki, K., Deyama, T., and Hattori, M. (2003). Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **51**(5), 508-515.
- Yang, X. W., Feng, L., Li, S. M., Liu, X. H., Li, Y. L., Wu, L., Shen, Y. H., Tian, J. M., Zhang, X., Liu, X. R., Wang, N., Liu, Y. H., and Zhang, W. D. (2010). Isolation, structure, and bioactivities of abiesadines A-Y, 25 new diterpenes from *Abies georgei* Orr. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**(2), 744-754.
- Yesilada, E. (2008). Novel drug leads from Turkish medicinal plants with diverse pharmacological effects. *Drugs of the Future*, **33**(8), 673-680.
- Yildirim, K. (2011). Biotransformation of (-)-verbenone by some fungi. *Journal of Chemical Research*(3), 133-134.
- Zhao, B., and Hall, C. A. (2008). Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chemistry*, **108**(2), 511-518.

**Chapitre 4. L'extrait polyphénolique d'épinette noire (*Picea mariana*) inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B au sein des kératinocytes psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$  : implications pour le traitement du psoriasis**

#### **4.1 Avant-propos**

*Manuscrit en préparation*

J'ai effectué la culture cellulaire des kératinocytes normaux et psoriasiques et la détermination de la toxicité par la méthode de la LDH. Également, j'ai déterminé la teneur de monoxyde d'azote aussi bien que celles de l'IL-6, l'IL-8, la CX3CL1/fractalkine, le VEGF et l'élafine dans le surnageant des cellules. Les analyses par immunobuvardage ont été effectuées en collaboration avec Isabelle Allayes, tandis que celles effectuées par cytométrie en flux ont été réalisées en collaboration avec Daniel Rusu. Isabelle Allayes a effectué les analyses par RT-PCR. Finalement, j'ai rédigé l'article sous la supervision des Drs Tatjana Stevanovic, Patrice Poubelle et Roxane Pouliot.

## 4.2 Résumé

Les composés polyphénoliques sont reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires démontrées lors des études *in vitro* dans différents types cellulaires. Toutefois, leurs effets sur les kératinocytes psoriasiques sont peu connus. Le *psoriasis vulgaris* est une maladie de la peau caractérisée par l'activation du système immunitaire où le TNF- $\alpha$  joue un rôle très important. Dans cette étude, les kératinocytes normaux et psoriasiques ont été utilisés pour étudier l'effet de la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle obtenue de l'extrait brut aqueux d'écorces de l'épinette noire (*Picea mariana*) sur l'expression d'ICAM-1 aussi bien que sur la production de l'IL-6, l'IL-8, de la CX3CL1/fractalkine, du VEGF, de l'élafine et du monoxyde d'azote au sein des kératinocytes normaux et psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$ . Les résultats obtenus ont démontré que les kératinocytes psoriasiques ont répondu au TNF- $\alpha$  en augmentant significativement l'expression d'ICAM-1 et la production d'IL-6, d'IL-8, de CX3CL1/fractalkine et de monoxyde d'azote comparativement aux kératinocytes normaux. L'extrait étudié, quant à lui, a diminué significativement cette augmentation à des concentrations qui n'ont pas affecté la viabilité cellulaire. De plus, cet extrait a diminué d'une façon importante la sécrétion de l'élafine et du VEGF au sein des kératinocytes normaux et psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$ . En sachant que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$  est impliquée dans la production de la plupart de ces médiateurs, nous nous sommes proposés de vérifier si BS-EAc<sub>f</sub> pouvait inhiber l'activation de ce facteur de transcription dans les kératinocytes psoriasiques. Nos résultats ont démontré que cet extrait inhibe significativement la phosphorylation et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  aussi bien que la phosphorylation de la sous-unité p65. Cette étude démontre pour la première fois le potentiel immunopharmacologique d'un extrait polyphénolique en tant qu'agent anti-TNF- $\alpha$  en utilisant des kératinocytes psoriasiques. En outre, elle ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de l'activité des composés présents dans cet extrait pour le traitement des maladies auto-immunes où le TNF- $\alpha$  joue un rôle essentiel, tel le psoriasis.

### 4.3 Article

***Picea mariana* polyphenolic extract inhibits TNF- $\alpha$  induced activation of NF- $\kappa$ B in psoriatic keratinocytes: implications for psoriasis treatment.**

Martha-Estrella García-Pérez, *et al.*

Centre LOEX de l'Université Laval, Génie tissulaire et régénération: LOEX - Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec et Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6. Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie. Département de médecine. Faculté de Médecine. Université Laval, Québec, Qc, Canada G1V 4G2. Centre de Recherche sur le Bois, Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6.



#### 4.3.1 Abstract

Polyphenolic compounds have been shown to exhibit *in vitro* anti-inflammatory activities in various cell lines, but their effects on psoriatic keratinocytes are largely unknown. *Psoriasis vulgaris* is a skin disorder involving the activation of the immune system in which TNF- $\alpha$  has been shown to play a significant role. In this study, normal (NHK) and psoriatic keratinocytes (PK) were used to study the immunomodulatory effects of a polyphenolic extract from *Picea mariana* bark (BS-EAc<sub>f</sub>) on TNF $\alpha$ -induced production/expression of ICAM-1, IL-6, IL-8, fractalkine/CX3CL1, VEGF, trappin-2/elafin and nitric oxide (NO). Our results demonstrated that psoriatic keratinocytes exhibited a higher response to TNF- $\alpha$  than normal keratinocytes regarding the ICAM-1 expression and the production of IL-6, IL-8, fractalkine/CX3CL1 and NO, whereas BS-EAc<sub>f</sub> significantly inhibited this augmentation at concentrations that did not affect the viability of NHK. Additionally, this extract significantly inhibited the TNF-induced release of trappin-2/elafin and VEGF by normal and psoriatic keratinocytes. Since NF- $\kappa$ B activation is required for the TNF-induction of most of these factors, we also investigated whether or not BS-EAc<sub>f</sub> targeted NF- $\kappa$ B in psoriatic keratinocytes. Our results revealed that BS-EAc<sub>f</sub> inhibits the TNF-induced NF- $\kappa$ B activation by psoriatic keratinocytes in terms of phosphorylation and degradation of total I $\kappa$ B $\alpha$  and phosphorylation of p65. This study provides new insight into the immunopharmacological role of a polyphenolic extract in impacting the TNF-induced responses by psoriatic keratinocytes. Additionally, it opens new perspectives for the understanding of the immunopharmacological activity of individual compounds present in BS-EAc<sub>f</sub> on TNF-mediated diseases, such as psoriasis.

### 4.3.2 Introduction

Psoriasis is an incurable skin disorder affecting up to 2% of the world's population characterized by the presence of erythematous skin lesions covered with white silvery scales. Current concepts of its pathogenesis consider this disease as a result of an orchestrated interplay between multiple cell types such as activated T cells, antigen-presenting cells and keratinocytes which leads to the release of numerous cytokines and chemokines that signal keratinocytes to hyperproliferate and undergo abnormal differentiation (Lowe *et al.*, 2004). More than bystander cells, keratinocytes also play important roles in the immune response of the skin. Indeed, they exert a major control in the acute and chronic phases of the skin inflammation through the chemokine/cytokine production and the expression of several adhesion and signaling molecules.

A network of different cytokines mainly of Th1 and Th17 type has been implied in the inflammatory processes observed in psoriatic skin. Th1 pattern include several signalling molecules such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), interleukin (IL) IL-1, IL-6, IL-8, epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ), which are responsible of initiation and persistence of this disease (Lowe *et al.*, 2004). TNF- $\alpha$  cytokine is overexpressed in psoriatic skin (Kristensen *et al.*, 1993) and its amounts in the circulation directly correlate with psoriatic disease activity and severity (Mussi *et al.*, 1997). The best evidence of its importance in psoriasis pathogenesis came from clinical studies which demonstrate that selective TNF- $\alpha$  blockers are highly effective in the therapy of this disease, even compared with other conventional treatments (Ogilvie *et al.*, 2001; Saurat *et al.*, 2008).

In psoriasis context, TNF- $\alpha$  is produced by numerous cell types such as T cells, dendritic cells, neutrophils, mast cells, macrophages and also by other cells such as fibroblasts and keratinocytes (Schottelius *et al.*, 2004). The expression of TNF- $\alpha$  is regulated by the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B whereas TNF- $\alpha$  itself triggers signalling pathways that converge on NF- $\kappa$ B activation (Banno *et al.*, 2004). In fact, in psoriatic epidermis a 5-fold increase of active nuclear phosphorylated NF- $\kappa$ B (phospho NF- $\kappa$ B/p65 at Ser536) has been observed as compared with uninvolved skin from the same patient (Lizzul *et al.*, 2005). Thus, it has been postulated that TNF- $\alpha$  produced locally within

psoriatic lesions creates a TNF positive feedback loop that amplifies and sustains the inflammatory process within plaques (Banno *et al.*, 2004).

NF- $\kappa$ B plays an important role in immune and inflammatory responses as well as in the protection against apoptotic cell death through the regulation of the expression of an exceptionally large number of genes. I $\kappa$ B $\alpha$  deficient mice, which phenotype is consistent with NF- $\kappa$ B hyperactivity, present skin lesions morphologically related to those of psoriasis characterized by marked acanthosis, hyperkeratosis, absence of keratohyalin granules in the *stratum granulosum*, and the presence of numerous subcorneal and intracorneal neutrophilic microabscesses (Klement *et al.*, 1996). The active form of NF- $\kappa$ B is a dimer formed by members of the NF- $\kappa$ B/Rel family of proteins, with the p50/p65 dimer being the most ubiquitous and biologically active. Phosphorylation of the inhibitory I $\kappa$ B proteins by the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex is a central step in NF- $\kappa$ B activation. Thus, I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation at Ser32 and Ser36 results in the ubiquitin-mediated proteasome-dependent degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . This cellular process leads to the release and nuclear translocation of p50/65 and other NF- $\kappa$ B subunits. The transcriptional activity of the p50/65 dimer is further enhanced by the IKK-dependent phosphorylation of p65 on Ser536 (Hayden and Ghosh, 2008). After translocation into the nucleus, the p50/65 dimer binds to defined DNA sequences in the promoters regions of various target genes such as those encoding IL-6, IL-8, CX3CL1/fractalkine, trappin-2/elafin, vascular endothelial growth factor C (VEGFC), inter-cellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) or immunoreceptors (Abeyama *et al.*, 2000; Bhavsar *et al.*, 2008; Bingle *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009a; Ulanova *et al.*, 2006).

Studies using normal human (NHK) and HaCaT keratinocytes stimulated with TNF- $\alpha$  have demonstrated that this cytokine causes the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, and the consequent transcriptional induction of the NF- $\kappa$ B-responsive genes such as IL-6, IL-8, ICAM-1 and VEGFC, which have the potential to attract neutrophils and memory T cells into the skin, thereby contributing to inflammation and keratinocyte hyperproliferation (Banno *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2008). Additionally, TNF- $\alpha$  can increase the production of other multifunctional molecules such as nitric oxide (NO) by NHK and murine keratinocytes (Sirsoj *et al.*, 1996; Yamaoka *et al.*, 2000). Stimulation of

NHK with TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  induces an enhanced expression of CX3CL1/fractalkine (Sugaya *et al.*, 2003), a chemokine overexpressed in psoriatic skin (Raychaudhuri *et al.*, 2001; Sugaya *et al.*, 2003) which acts as chemoattractant and adhesion molecule. Treatment of NHK with TNF- $\alpha$  also results in an increase of Trappin-2/elafin expression at both the mRNA and the protein levels (Pfundt *et al.*, 2000).

Although current anti-TNF- $\alpha$  treatments have demonstrated to be highly effective for psoriasis (Saurat *et al.*, 2008), the over-inhibition of TNF- $\alpha$  during long term-therapies, has a potential risk of causing secondary infections and cancer due to suppression of normal immune processes important for proper tissue repair (Saraceno and Chimenti, 2008). Therefore, the identification of other TNF- $\alpha$  inhibitors that combine therapeutic efficacy with a low profile of adverse effects is currently needed for developing new antipsoriatic treatments.

Previous research suggest that the lack of effective and safe treatments is a very important factor contributing to the decreased quality of life of psoriatic patients (Krueger *et al.*, 2001). Thus, worldwide surveys demonstrate that psoriatic individuals frequently use alternative medicines, including herbal treatments (Ben-Arye *et al.*, 2003; Krueger *et al.*, 2001). The most important reasons underlying the use of complementary medicine are: less toxic indications, disappointment with conventional therapies linked to uneficacy or side effects and stress reduction (Ben-Arye *et al.*, 2003).

Polyphenols are multifunctional compounds that can act as anti-inflammatory agents through the modulation of multiple signaling pathways. Treatment of normal keratinocytes with oat polyphenols has demonstrated to inhibit the TNF- $\alpha$  induced activation of NF- $\kappa$ B, thereby reducing the IL-8 release by these cells (Sur *et al.*, 2008). Moreover, green tea polyphenols reduce the TNF- $\alpha$ -induced regulation of VEGF and IL-8 by NHK (Trompezinski *et al.*, 2003). Even though these studies show a potential of polyphenols as TNF- $\alpha$  inhibitors for the treatment of inflammatory skin diseases, to the best of our knowledge the mechanism of action of these molecules on TNF- $\alpha$  induced activation of psoriatic keratinocytes (PK) has not been analysed. Psoriatic keratinocytes have an activated phenotype responsible of an aberrant production of cytokines and chemokines compared to NHK (Nickoloff *et al.*, 1994), therefore in the current study we investigated

whether or not a polyphenolic extract from black spruce (*Picea mariana*) bark (BS-EAc<sub>f</sub>), which major constituents are chemically characterized, was able to inhibit the TNF- $\alpha$ -induced effects on NHK and PK.

Taking into account that psoriasis improvement after anti-TNF treatments has been associated with a decrease in the epidermal expression of ICAM-1, IL-6 and IL-8 (Bose *et al.*; Gottlieb *et al.*, 2005), we determined the effects of BS-EAc<sub>f</sub> on the TNF- $\alpha$ -induced production of IL-6, IL-8 and on the ICAM-1 expression by NHK and PK. Furthermore, the effect of BS-EAc<sub>f</sub> on the VEGF, Trappin-2/elafin and CX3CL1/fractalkine secretion of NHK and PK under TNF-stimulation was also analysed. Additionally, the TNF-induced production of nitric oxide by NHK and PK after BS-EAc<sub>f</sub> treatment was determined. Considering that a significant clinical improvement of psoriasis after TNF- $\alpha$  blockade *in vivo* has also been correlated with the decrease of phosphorylated NF- $\kappa$ B in psoriatic epidermis (Lizzul *et al.*, 2005), we finally tested the action of BS-EAc<sub>f</sub> on the TNF- $\alpha$  induced NF- $\kappa$ B activation of PK. Taken together our data provide the first evidence of the capacity of a polyphenolic natural extract to inhibit the TNF- $\alpha$ -induced activation of psoriatic keratinocytes, which could have further implications for the treatment of psoriasis.

### 4.3.3 Materials and Methods

#### **Reagents**

Insulin and penicillin were purchased from Sigma–Aldrich, Oakville, ON, Canada, whereas fetal Clone II serum was from Hyclone, Scarborough, ON, Canada. Hydrocortisone was obtained from Cedarlane, Hornby, ON, Canada while cholera toxin was from ICN Biochemical, Montréal, QC, Canada. Epidermal growth factor (EGF) was purchased from Austral Biological, San Ramon, CA and gentamicin from Schering, Pointe-Claire, QC, Canada. Trypsin was obtained from Intergen, Toronto, ON, Canada, whereas ethylenediamine tetraacetic acid was purchased from J.T. Baker, Phillipsburg, NY, USA. The accutasa solution was obtained from Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA and Trizol reagent was from Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA. Dexamethasone was purchased from Sigma, St-Louis, MO, USA and TNF- $\alpha$  from Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA. The mouse monoclonal anti-human CD54 (ICAM-1) PE and the mouse monoclonal IgG1 K Isotype control PE were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA).

#### **Black spruce bark extract (BS-EAc<sub>f</sub>)**

The black spruce bark extract used in this study corresponds to the ethyl acetate fraction from the hot water extract of the black spruce (*Picea mariana*) bark (BS-EAc<sub>f</sub>) and was obtained as previously described (Diouf *et al.*, 2009). Chemical characterisation of this extract by high performance liquid chromatography (HPLC), nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) allowed the characterization of 28 compounds. When regrouped in different phenol classes, predominant compounds identified in this fraction were neolignans and lignans (3.57% w.w<sup>-1</sup>) (Garcia-Perez *et al.*, 2012). Additionally, BS-EAc<sub>f</sub> was determined to contain the proanthocyanidins with an average degree of polymerisation of 3.3 (Diouf *et al.*, 2009).

### **Keratinocyte cell cultures**

Psoriatic keratinocytes were obtained from biopsies directly taken from lesional psoriatic skin of Caucasian donors (women between 35 to 69 year-olds) whereas normal human keratinocytes were from adult skin specimens removed during reductive breast surgeries as previously described (women between 18 to 38 year-olds) (Jean *et al.*, 2009). All procedures involving patients were in agreement with the Helsinki's declaration and performed under the guidelines of the research ethical committee from the "Centre hospitalier affilié universitaire de Québec". All patients were given adequate information to provide written consent.

Both, normal and psoriatic keratinocytes were cultured at passage 1 ( $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) in the presence of a feeder layer of irradiated 3T3 mouse fibroblasts ( $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) in a combination of Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DMEM) with Ham's F12 (3:1) supplemented with 5% Fetal Clone II serum,  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  insulin,  $0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  hydrocortisone,  $10^{-10}\text{M}$  cholera toxin,  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  human epidermal growth factor (EGF),  $100 \text{ UI.mL}^{-1}$  penicillin and  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  gentamicin. All cultures were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in 5% CO<sub>2</sub> air atmosphere and changed three times a week with the media previously described. At 80% confluence, keratinocytes were subsequently subcultured after differential dissociation of the feeder layers with 0.05% trypsin–0.01% ethylenediamine tetraacetic acid for 5min. Cells at passage 3 were used in this study.

### **Cell viability**

Normal human keratinocytes (n=3) viability after BS-EAc<sub>f</sub> exposition was evaluated by two methods: the lactate dehydrogenase (LDH) release assay and the propidium iodide staining. For both tests, NHK ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) (n=3) were plated in a 24 well plate in the presence of a feeder layer of irradiated 3T3 mouse fibroblasts ( $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and grown to 80-90% confluence. Then, they were exposed to BS-EAc<sub>f</sub> at 500, 250 and  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  diluted in a medium containing 0.2% of ethanol during 24 and 48 h. After this time, cells were detached with accutase solution.

For measurement of extracellular LDH activity, supernatants and pelleted keratinocytes were collected separately and cells were lysed in 1% Triton X-100. Prior to colorimetric analysis at 340 nm, 1.25 mL of substrate ( $0.14 \text{ mg.mL}^{-1}$  NADH in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) and 50  $\mu\text{L}$  of pyruvate solution were added to 50  $\mu\text{L}$  of cell lysate or supernatant. Results were expressed in percentages, as the ratio between the absorbance values measured in supernatants and the total absorbance values (cells plus supernatants).

Propidium iodide (PI) is a red fluorescent molecule that is only incorporated into dead cells. Preliminary experiments with BS-EAc<sub>f</sub> by flowcytometry demonstrated that this extract was fluorescent (data not shown) which is a common feature for the phenolic aromatic rings conjugated to double bonds in the side chains (a characteristic of the identified constituents of this extract). Taking into account this characteristic, keratinocytes exposed to BS-EAc<sub>f</sub> at different concentrations (500, 250, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) were collected after centrifugation and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of PBS/Fetal bovine serum (FBS) 1%. Then, they were labelled or not with PI (2.5  $\mu\text{L}$ ) and subsequently incubated for 5 min at room temperature in the dark. Five thousand cells were counted by flowcytometry EPICS-XL (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Cell viability was determined by comparing the percentage of cells stained by PI after BS-EAc<sub>f</sub> exposition at different concentrations regarding to cells not labelled.

### **Determination of the ICAM-1 expression**

The expression of ICAM-1 at the membrane of keratinocytes was evaluated by flowcytometry. NHK (n=3) and PK (n=3) ( $1.7 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) were plated in a 12-well plate in the presence of a feeder layer of irradiated 3T3 mouse fibroblasts ( $2.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and grown to confluence. Four hours before the cell exposition to BS-EAc<sub>f</sub> and dexamethasone (Dex), the medium was changed to a keratinocyte basal medium (DMEM with Ham's F12 (3:1) supplemented with 0.5% Fetal Clone II serum, without other additives). Then, cells were pre-treated or not with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex, in this medium containing 0.2% ethanol during one hour and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 20h (BS-EAc<sub>f</sub> concentrations=500, 250, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Dex=5  $\mu\text{M}$ ). After this time, cells were detached with accutase solution.



To evaluate ICAM-1 expression, NHK and PK were incubated (4°C) during 30 min with 10% human serum (blocking step). Then, they were for another 30 min with anti-human PE-conjugated CD54 (ICAM-1) mAb or with mouse IgG K isotype control PE. After washing with PBS/FBS 1%, ten thousand cells were analyzed with a flow cytometer EPICS-XL (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Considering that BS-EAc<sub>f</sub> is a fluorescent extract, the relative expression of ICAM-1 in cells stimulated with TNF- $\alpha$  and treated with BS-EAc<sub>f</sub> or Dex regarding to the control (cells stimulated with TNF- $\alpha$ ), was expressed as follows (Equation 1).

$$\text{Equation 1. ICAM-1 (\% to control)} = \frac{[F(\text{treated} + \text{TNF}\alpha) - F(\text{treated})]}{[F(\text{TNF}\alpha) - F(V)]}$$

In this equation, F(treated+TNF $\alpha$ ) is the mean fluorescence intensity of cells stimulated with TNF- $\alpha$  and treated with BS and Dex; F(treated) is the mean fluorescence intensity of cells treated with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex without TNF- $\alpha$ ; F(TNF $\alpha$ ) is the mean fluorescence intensity of cells stimulated with TNF- $\alpha$  whereas F(V) is the mean fluorescence intensity of cells with vehicle (basal keratinocyte medium + 0.2% ethanol). In all cases, the intensity of fluorescence was compared with that of the isotype control.

### **Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)**

NHK and PK were cultured until confluence, exposed during 4h to a keratinocyte basal medium, pre-incubated with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex (1h) and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) for 20h as previously described. At this time, IL-8, Trappin-2/elafin and CX3CL1/fractalkine levels in the supernatants were measured using ELISA kits from R&D System according to the manufacturer's protocol (catalogue nos. DY208, DY1747 and DY365 respectively). In order to reach the optimal levels of IL-6 and VEGF in NHK and PK supernatants after TNF- $\alpha$  stimulation, cells were plated in a 12 well plate until

confluence as described above. At this time, they were pre-treated with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex during one hour in a medium containing 5% Fetal Clone II serum and 0.2% ethanol, without other additives, and were further stimulated with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 24 h (BS-EAc<sub>f</sub> concentrations=500, 250, 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; Dex=5  $\mu$ M). Levels of IL-6 and VEGF in culture supernatants were measured using ELISA kits from R&D System according to the manufacturer protocols (catalogue nos. DY206 and DY293B respectively). Detection limits were: 30 pg.mL<sup>-1</sup> IL-8, 50 pg.mL<sup>-1</sup> Trappin-2/elafin, 600 pg.mL<sup>-1</sup> CX3CL1/fractalkine, 10 pg.mL<sup>-1</sup> IL-6, 20 pg.mL<sup>-1</sup> VEGF. Each evaluation by ELISA was made in duplicate.

### **Determination of the nitric oxide production**

NHK (n=3) and PK (n=3) were cultured until confluence as previously described, exposed during 4h to a keratinocyte basal medium, pre-incubated during 1 hour with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 48h (BS-EAc<sub>f</sub> concentrations=500, 250, 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; Dex=5  $\mu$ M). The amount of stable nitrite, the end oxidation product of NO generated by keratinocytes, was determined in cell supernatants using the Griess reagent system (Promega, Madison, US). Briefly, 50  $\mu$ L of cell supernatants were mixed with 50  $\mu$ L of Sulfanilamide solution during 10 min at room temperature in a 96-well plate containing the dilution series for the nitrite standard reference curve (100-1.56  $\mu$ M). Afterwards, 50  $\mu$ L of the NED solution (0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) was added and the mix was incubated at room temperature during 5 min. Absorbance at 540 nm was then determined. Each evaluation was made in duplicate.

### **Analysis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction**

PK were cultured to confluence as previously described. At this time, the medium was changed to a keratinocyte basal medium during 4 hours. Then, cells were pre-treated or not with BS-EAc<sub>f</sub> (500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), in this medium containing 0.2% ethanol during one hour and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 4h. Total RNA was then isolated from cells by means of the Trizol reagent, and RT reaction was performed with Superscript™ II RT according to the manufacturer's instructions. The cDNAs for iNOS

and CX3CL1/fractalkine were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using gene-specific primer pairs designed with Primer 3 software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA).

### **Western blot analysis**

PK (n=3) were cultured until confluence in 12-well plates as previously described, then the medium was changed to a keratinocyte basal medium during 4 hours. After this time, cells were pre-incubated or not with BS-EAc<sub>f</sub> (500 µg.mL<sup>-1</sup>) during one hour and further stimulated or not with TNF-α (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 20, 30, 60 and 90 min. At these times, cells were boiled in Laemmli sample buffer (300 µL) for 10 min and cell lysates were separated on 8% (NF-κB p65 and phospho NF-κB p65) and 10% (IκBα and phospho-IκBα) SDS-PAGE before being transferred on polyvinylidene difluoride membranes. After blocking (1X TBS, 0.1% Tween-20 with 5% w/v notfat dry milk), membranes were probed with IκB p65 rabbit mAb (1/1000), phospho-NF-κB p65 (Ser536) rabbit mAb (1/1000), IκBα mouse mAb (1/1000), phospho-IκB-α (Ser32) rabbit mAb (1/1000) using a Cell signaling Technology NF-κB sampler kit (Danver, MA, USA). Afterwards, secondary peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies were used prior to the detection by the enhanced chemiluminescence system (GE Healthcare) and visualization on Kodak Biomax MR film. After stripping, membranes blocked in 1X TBS, 0.1% Tween-20 with 5% w/v notfat dry milk were reprobed with a monoclonal antibody against actin (loading control) with secondary peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody.

### **Statistical analysis**

Comparisons between two experimental groups were analyzed by the Student's paired t-test. Statistical differences between more than two experimental groups were examined by one way ANOVA, and statistical significance was determined at p<0.05. Means were separated by a Tukey's post hoc test. The experiments were conducted at least three times or as indicated; all data are expressed as mean ± SE.

#### 4.3.4 Results

##### **BS-EAc<sub>f</sub> (100-500 µg.mL<sup>-1</sup>) has no effect on NHK cell viability**

The effects of BS-EAc<sub>f</sub> on NHK cell viability was evaluated by using the LDH release assay and the propidium iodide (PI) staining. The results from the two assays (Figure 38) showed no significant loss in NHK cell viability ( $p > 0.05$ ) after 24 and 48 h exposition in the presence of increasing concentrations of BS-EAc<sub>f</sub> (100-500 µg.mL<sup>-1</sup>).

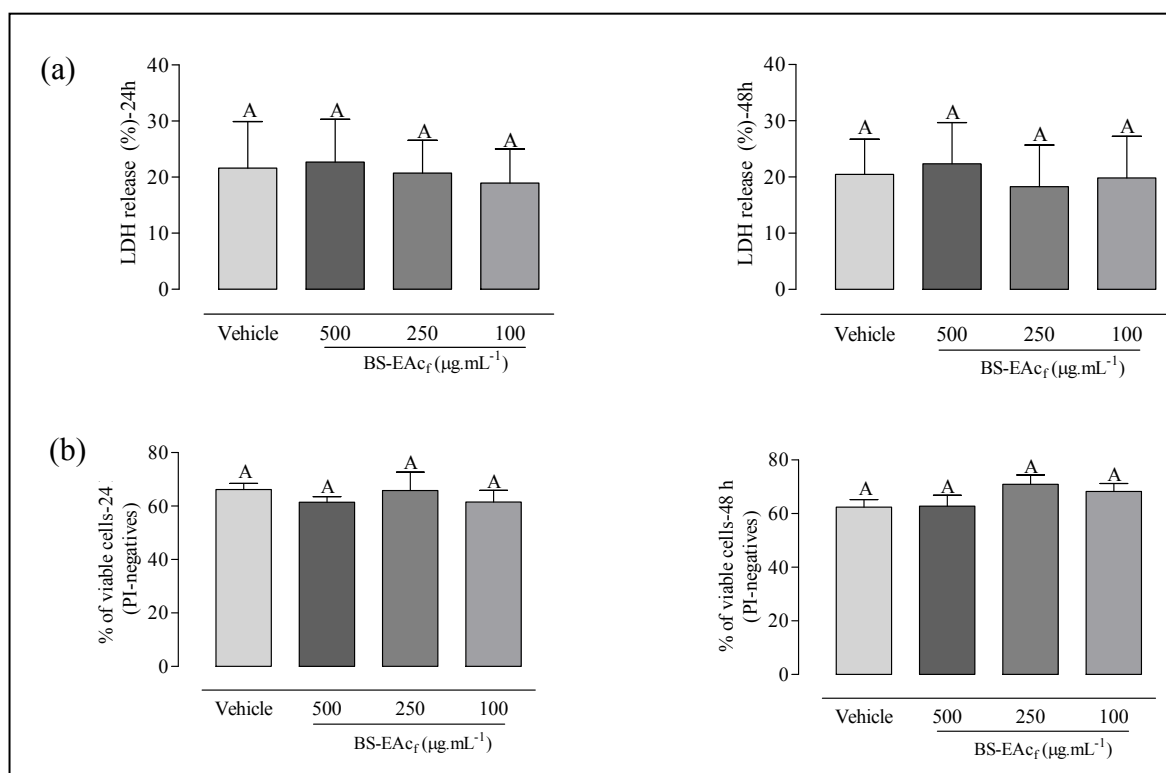


Figure 38 Effects of BS-EAc<sub>f</sub> on normal human keratinocyte (NHK) viability

NHK from three donors (women, 18, 26 and 38 years-old) were grown to 80-90% confluence. Then, they were exposed to BS-EAc<sub>f</sub> at 500, 250 and 100 µg.mL<sup>-1</sup> diluted in a medium containing 0.2% ethanol (vehicle) during 24 and 48 h and cell viability was evaluated by two methods: **(a)** the lactate dehydrogenase (LDH) assay; **(b)** the propidium iodide staining. Histograms represent mean ± standard error of: **(a)** the percentage of LDH release after 24 h (left) or 48 h (right) of BS-EAc<sub>f</sub> exposure and **(b)** the percentage of the viable keratinocytes (PI-negatives cells) after 24 h (left) or 48 h (right) of BS-EAc<sub>f</sub> exposure. Bars with the same letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ) (ANOVA, Tukey's post hoc test).

**BS-EAc<sub>f</sub> inhibits TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 expression on NHK and PK**

The pathogenesis of psoriasis has been linked, at least in part, to processes which regulate the traffic of leukocytes into the skin. One important aspect of these processes is the movement of T cells expressing lymphocyte-function-associated-antigen-1(LFA-1) into the epidermis and their subsequent binding to keratinocytes via the surface expression of the adhesion molecules such as ICAM-1(Lowes *et al.*, 2004). Because TNF- $\alpha$  has been found to induce keratinocyte ICAM-1 expression (Griffiths *et al.*, 1989), the differential effect of this cytokine on ICAM-1 expression on NHK and PK was firstly investigated (Figure 39a). At basal levels, PK showed a higher expression of ICAM-1 than NHK respectively ( $12.38 \pm 1.63$  vs.  $2.45 \pm 0.56\%$  of ICAM<sup>+</sup> cells). After 20 h of keratinocyte incubation with TNF- $\alpha$  ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), an induction of keratinocyte ICAM-1 expression, both in NHK and PK occurred, but the expression was around twofold more important on PK ( $29.80 \pm 16.19$  vs.  $63.79 \pm 4.10$ ) respectively (Figure 39a).

Taking into account that established anti-TNF treatments such as etanercept and infliximab decrease keratinocyte ICAM-1 expression *in vivo*, which has been correlated with psoriasis clinical improvement (Gottlieb *et al.*, 2005; Gottlieb *et al.*, 2003), the ability of BS-EAc<sub>f</sub> to reduce TNF-induced expression of ICAM-1 on NHK and PK was studied. On NHK, BS-EAc<sub>f</sub> inhibits in a dose-dependent manner the ICAM-1 expression by 34.78 to 87.12% at doses of  $100\text{-}500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  regarding to the control (cells receiving TNF- $\alpha$ ), whereas no significantly inhibitory effects were observed after Dex treatment (Figure 39b). On PK, BS-EAc<sub>f</sub> significantly inhibited the expression of ICAM-1 induced by TNF- $\alpha$  with a maximal inhibition at  $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  (77.56% of inhibition); while no inhibitory effects were observed after Dex treatment (Figure 39c). Taken together, our results indicate that BS-EAc<sub>f</sub> inhibits both, TNF-induced ICAM-1 expression on NHK and on PK (Figure 39b,c).

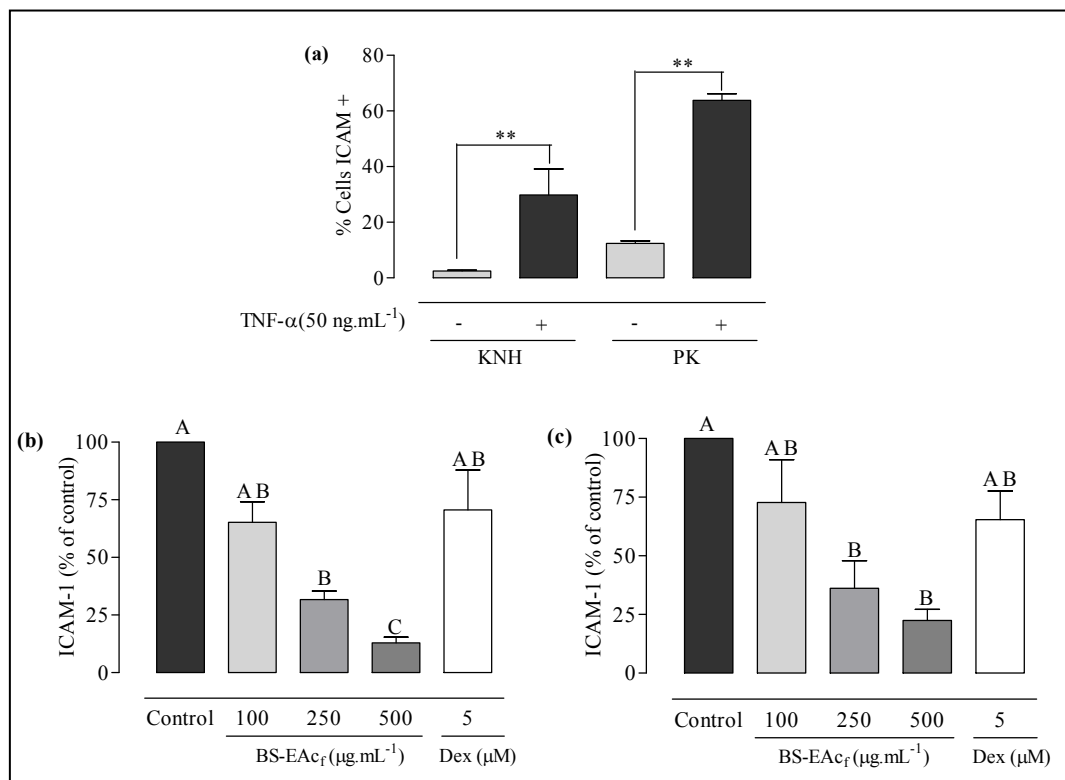


Figure 39 Effects of BS-EAc<sub>f</sub> on TNF- $\alpha$  induced expression of ICAM-1 on normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes.

NHK from three donors (18, 26 and 38 years-old women) and PK, also from three donors (36, 46 and 51 years-old women) were grown to confluence, then the medium was changed to a keratinocyte basal medium (DMEM with Ham's F12 (3:1) supplemented with 0.5% Fetal Clone II serum) during 4 hours. After this time, cells were pre-treated or not with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex during one hour and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 20h (BS-EAc<sub>f</sub> concentrations=500, 250, 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; Dex=5  $\mu$ M). Then, the expression of ICAM-1 at the membrane of keratinocytes was evaluated by flowcytometry. Histograms represent the mean  $\pm$  standard error of : **(a)** TNF-induced ICAM-1 expression on NHK and PK; \*\*p<0.01 (Student's t test); **(b)** the percentage of inhibition of ICAM-1 expression on NHK after BS-EAc<sub>f</sub> and Dex treatment, regarding to the control determined by equation 1 as described in *Materials and Methods* and **(c)** the percentage of inhibition of ICAM-1 expression on PK after BS-EAc<sub>f</sub> and Dex treatment, regarding the control determined by equation 1 as described in *Materials and Methods*. Bars with the same letter are not significantly different (p>0.05) (ANOVA, Tukey's post hoc test)

### **BS-EAC<sub>f</sub> inhibits TNF $\alpha$ -induced IL-6 and VEGF production on NHK and PK**

Human keratinocytes synthesize a number of cytokines such as IL-6 which has been shown to stimulate keratinocyte proliferation (Grossman *et al.*, 1989). IL-6 has been reported to be induced in keratinocytes by TNF- $\alpha$  at mRNA (Young *et al.*, 2008) and protein levels (Li *et al.*, 1996) and to be overexpressed in psoriatic skin (Grossman *et al.*, 1989; Ohta *et al.*, 1991; Oxholm, 1992). To investigate whether or not BS-EAC<sub>f</sub> inhibits the TNF $\alpha$ -induced IL-6 production, NHK and PK were treated with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 24 h with or without BS-EAC<sub>f</sub> (100-500 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) as described in the *Materials and Methods*. No detectable levels of IL-6 (ELISA detection limit, 10 pg.mL<sup>-1</sup>) were found in NHK after TNF-stimulation (50 ng.mL<sup>-1</sup>). However, when PK were stimulated with TNF- $\alpha$ , a significant increase of IL-6 production (816.41  $\pm$  242.31 pg/10<sup>6</sup> cells/mL) occurred (Figure 40a). Moreover, treatment with BS-EAC<sub>f</sub> dose-dependently inhibited the TNF $\alpha$ -induced IL-6 release by PK. Indeed, at 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, this extract completely suppressed the IL-6 production and this effect was comparable to that shown for Dex (5  $\mu$ M) (Figure 40a).

Vascular characteristic changes also occur in psoriatic lesions, including dilation and tortuosity of capillaries, angiogenesis, and high endothelial venules formation (Lowes *et al.*, 2004). Angiogenesis and vascular hyperpermeability in psoriatic skin have been linked to an increased expression of keratinocyte-derived VEGF (Simonetti *et al.*, 2006), which can also promote leukocyte migration into the skin (Skobe and Detmar, 2000).

Knowing that TNF $\alpha$  acts as a keratinocyte VEGF-inducer (Frank *et al.*, 1995; Khanna *et al.*, 2001) and that available anti-TNF $\alpha$  treatments such as infliximab decrease the VEGF released by lesional psoriatic skin (Cordiali-Fei *et al.*, 2007), we therefore next asked whether BS-EAC<sub>f</sub> was able to inhibit the TNF-induced release of VEGF by NHK and PK. As shown in Figure 40b, TNF $\alpha$ -stimulation of NHK resulted in a significant increase of VEGF production compared to untreated cells (1663.66  $\pm$  304.78 vs. 1026.00  $\pm$  372.42 pg/10<sup>6</sup> cells/mL) respectively. The black spruce extract at three tested concentrations significantly inhibited the TNF-induced upregulation of VEGF and this effect was similar to that shown by Dex (5 $\mu$ M) when NHK were treated with the extract at 100 and 250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Furthermore, at 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, BS-EAC<sub>f</sub> showed a higher inhibitory effect on TNF-induced VEGF release than that shown by Dex (5  $\mu$ M) (p<0.05) (Figure 40b). PK also

responded to TNF-stimulation by increasing VEGF production as compared to untreated cells ( $1433.19 \pm 426.57$  vs.  $714.33 \pm 294.86$  pg/ $10^6$  cells/mL) respectively ( $p < 0.05$ ). However, PK were less sensitive than NHK to BS-EAc<sub>f</sub> and Dex ( $5 \mu\text{M}$ ) inhibitory effects, and only when the extract was used at the highest concentration ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a significant decrease (31.08%) of VEGF secretion was observed ( $p < 0.05$ ) (Figure 40c). Taken together, the above results indicate that BS-EAc<sub>f</sub> treatment, mainly at  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , impaired the capability of PK to produce IL-6 under TNF-stimulation. This extract also inhibited the TNF-induced VEGF release in NHK and PK, but this effect was more important in NHK.



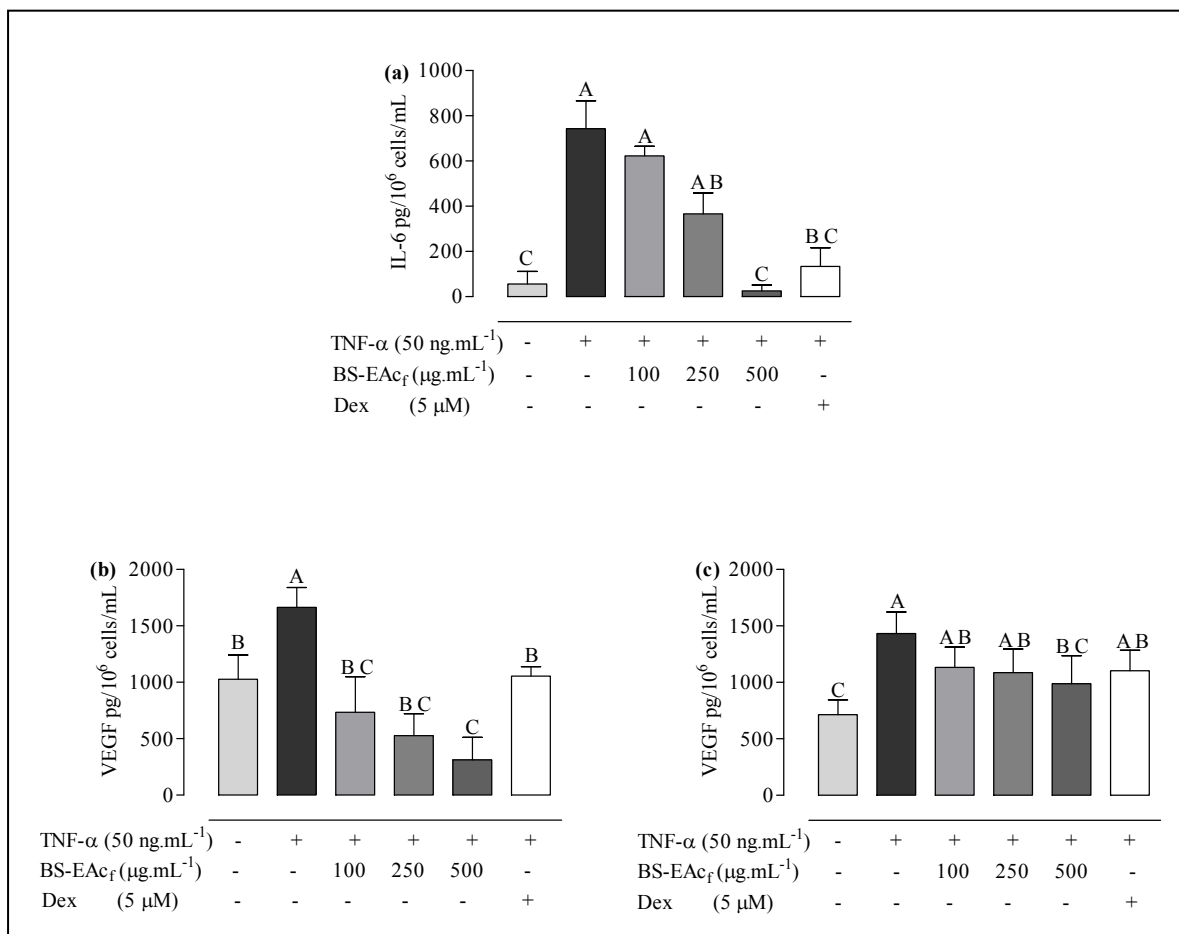


Figure 40 Effects of BS-EAc<sub>f</sub> on TNF- $\alpha$  induced production of IL-6 and VEGF on normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes

NHK and PK were grown to confluence, then they were pre-treated with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex during 1 hour in a medium containing 5% Fetal Clone II serum and 0.2% ethanol and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 24 h (BS-EAc<sub>f</sub> concentrations=500, 250, 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; Dex=5  $\mu$ M). Levels of IL-6 and VEGF in keratinocyte supernatants were measured using ELISA kits from R&D System according to the manufacturer's protocols. Histograms represent the mean  $\pm$  standard error of: **(a)** IL-6 production of PK from four donors (36, 46, 51 and 69 years-old women); **(b)** VEGF production of NHK from three donors (18, 26 and 38 years-old women); **(c)** VEGF production of PK from five donors (35, 36, 46, 51 and 69 years-old women). Bars with the same letter are not significant different ( $p > 0.05$ ) (ANOVA, Tukey's post hoc test)

### **BS-EAc<sub>f</sub> inhibits TNF $\alpha$ -induced IL-8 and Fractalkine/CX3CL1 production in NHK and PK**

Chemokines play a key role in cell trafficking at sites of inflammation. Considering their importance in psoriasis pathogenesis we tested the action of the BS-EAc<sub>f</sub> and Dex on TNF-induced production of IL-8 and fractalkine/CX3CL1 by NHK and PK.

IL-8 is a particularly relevant chemokine in psoriasis, contributing to the development of this disease through a potent chemotactic activity on inflammatory cells and through its angiogenic effect (Nickoloff *et al.*, 1990; Nickoloff *et al.*, 1994). Under TNF-stimulation, IL-8 production has been found to be augmented in NHK and PK, at both mRNA and protein levels (Barker *et al.*, 1991; Boorsma *et al.*, 1994; Giustizieri *et al.*, 2001). Available anti-TNF treatments act by downregulating IL-8 in psoriatic plaques (Benoit *et al.*, 2004; Gottlieb *et al.*, 2005; Johansen *et al.*, 2010; Zaba *et al.*, 2009), therefore we next asked about the ability of BS-EAc<sub>f</sub> to inhibit the IL-8 release in NHK and PK under TNF $\alpha$ -stimulation. Constitutively, PK released higher amounts of IL-8 than NHK ( $2170.36 \pm 525.51$  vs.  $522.45 \pm 165.41$  pg/10<sup>6</sup> cells/mL respectively). As expected, NHK and PK responded to TNF by significantly augmenting the IL-8 production (Figure 41a,b), but a fivefold increase of IL-8 release was observed in PK. BS-EAc<sub>f</sub> dose-dependently inhibited the TNF-induced IL-8 release by NHK and PK and this effect was comparable and higher than that of Dex (5  $\mu$ M) in NHK and PK respectively ( $p < 0.05$ ).

Fractalkine/CX3CL1 is a chemokine that presents a unique membrane-bound structure. This characteristic represents an exclusive mechanism of cell adhesion that differs from other chemokines. Consequently, the soluble form is chemotactic to CX3CR1-expressing leucocytes, whereas the cell surface bound form promotes adhesion of these cells (Raychaudhuri *et al.*, 2001). NHK have been reported to express fractalkine mRNA and protein (Sugaya *et al.*, 2003), and high levels of this chemokine has been found in lesional psoriatic skin (Echigo *et al.*, 2004; Sugaya *et al.*, 2003). In the present study we tested whether the TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) may regulate the fractalkine release by NHK and PK. Additionally, the effect of BS-EAc<sub>f</sub> and Dex on TNF-induced production of CX3CL1 was examined (Figure 41c). No detectable levels of fractalkine/CX3CL1 (ELISA detection limit, 600 pg.mL<sup>-1</sup>) were found in NHK supernatants after 20 h of TNF $\alpha$ -stimulation.

However, when PK were stimulated with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during the same time, a significant increase of fractalkine/CX3CL1 release was determined (14336.74  $\pm$  13289.17 pg/10<sup>6</sup> cells/mL), despite a high variability between different psoriatic donors (Figure 41c). Furthermore, treatment with BS-EAc<sub>f</sub> dose-dependently inhibited the TNF $\alpha$ -induced fractalkine/CX3CL1 secretion by PK. In fact, when the extract was used at 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, no detectable levels of this chemokine were found in PK supernatants, whereas no significant inhibitory effects were observed after Dex (5  $\mu$ M) treatment. This result led us to further evaluate the possibility that TNF-upregulated the *de novo* gene transcription of fractalkine in PK and to determine the effect of BS-EAc<sub>f</sub> at the highest concentration on this process. As shown in Figure 41d, exposure of PK to TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 4 h caused a significant increase of fractalkine mRNA level, whereas treatment with BS-EAc<sub>f</sub> (500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) significantly decreased this augmentation (p<0.05). Overall, these results indicate that BS-EAc<sub>f</sub> has the capacity to decrease the TNF $\alpha$ -induced production of IL-8 and fractalkine/CX3CL1 by PK and the same effect was also observed on IL-8 production by NHK.

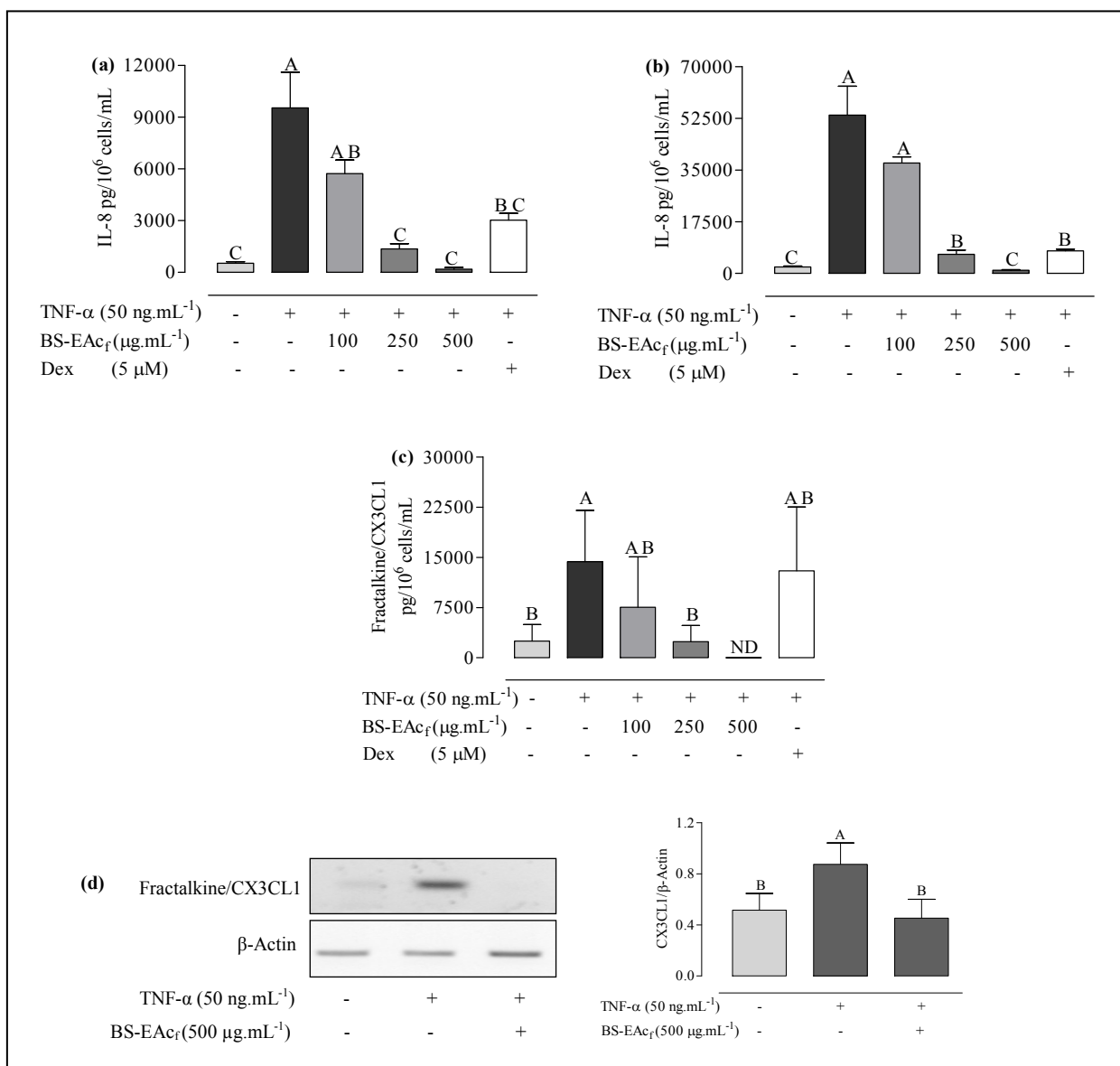


Figure 41 Effects of BS-EAc<sub>f</sub> on TNF- $\alpha$  induced production of IL-8 and fractalkine/CX3CL1 in normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes

NHK and PK were grown to confluence, then the medium was changed to a keratinocyte medium containing DMEM with Ham's F12 (3:1) supplemented with 0.5% Fetal Clone II serum during 4 hours. After this time, cells were pre-treated or not with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex during one hour and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 20h (BS-EAc<sub>f</sub> concentrations=500, 250, 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; Dex=5 $\mu$ M). Levels of Fractalkine/CX3CL1 and IL-8 in keratinocyte supernatants were measured using ELISA kits from R&D System according to the manufacturer's protocols. Histograms represent the mean  $\pm$  standard error of: **(a)** IL-

8 production of NHK from three donors (18, 26 and 29 years-old women); **(b)** IL-8 production of PK from three donors (36, 46, 51 years-old women) and **(c)** Fractalkine/CX3CL1 production of PK from three donors (46, 51, 69 years old women) ; ND=non-detectable levels (ELISA detection limit,  $600 \text{ pg.mL}^{-1}$ ). **(d)** Expression of mRNA for Fractalkine/CX3CL1 by PK pre-treated or not with BS-EAc<sub>f</sub> during one hour and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  ( $50 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) during 4h (BS-EAc<sub>f</sub> concentration= $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Total RNA was isolated from PK and analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Results shown are representative of five psoriatic donors (35, 36, 46, 51, 69 years-old women). In all cases, bars with the same letter are not significantly different ( $p>0.05$ ) (ANOVA, Tukey's post hoc test).

**BS-EAc<sub>f</sub> inhibits the TNF $\alpha$ -induced trappin-2/elafin production on NHK and PK**

Normal keratinocyte differentiation program leads to the formation of the horny layer. However, PK follow an abnormal differentiation pathway known as regenerative differentiation (Pfundt *et al.*, 2000) in which the expression of proteins normally absent in human epidermis are highly expressed, such as the trappin-2/elafin (Nonomura *et al.*, 1994), which has been considered a marker of abnormal keratinocyte differentiation (Amigo *et al.*, 2006). Although its role in psoriasis is not fully understood, a recent study demonstrated that trappin-2/elafin contributes to the production of inflammatory cytokines/chemokines (IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ) by activating NF- $\kappa$ B in keratinocytes (Aung *et al.*, 2011). Considering that recognized anti-psoriatic treatments such as *trans*-retinoic acid, calcipotriol and cyclosporine A display *in vitro* inhibitory effects on keratinocyte trappin-2/elafin expression (Pol *et al.*, 2002), we further investigate the capacity of BS-EAc<sub>f</sub> to inhibit the TNF-induced trappin-2/elafin release by NHK and PK.

As shown in figure 42a,b, NHK and PK produce trappin-2/elafin at basal levels, and this release significantly augmented after TNF-stimulation of NHK. In the case of PK, an increase of the trappin-2/elafin release was observed after TNF treatment, but it did not reach the significant level ( $p > 0.05$ ). Furthermore, treatment with BS-EAc<sub>f</sub> dose-dependently inhibited the TNF-induced trappin-2/elafin secretion by NHK and PK and this effect was similar to that of Dex (5  $\mu$ M) when the extract was used at 100 and 250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Levels of trappin-2/elafin after BS-EAc<sub>f</sub> treatment (500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) in NHK and PK supernatants were significantly diminished by 96.46 and 91.11% respectively.

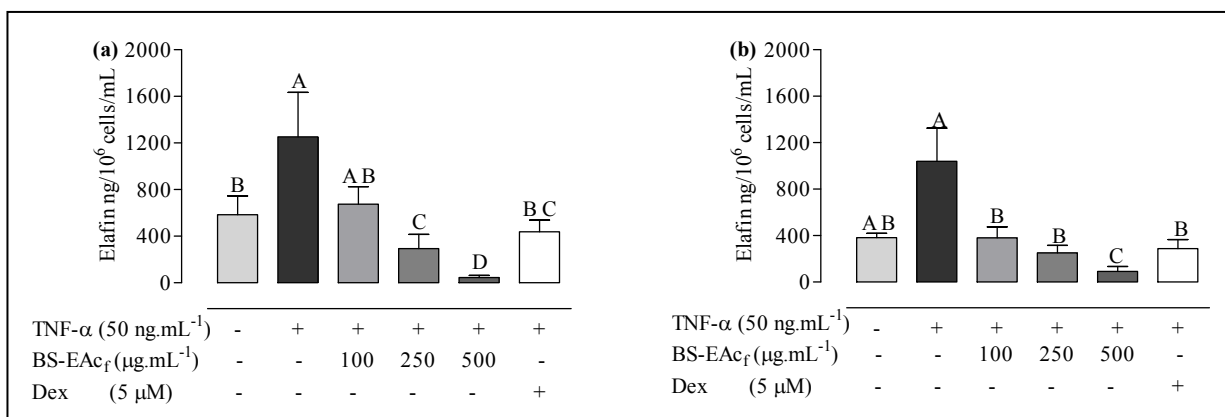


Figure 42 Effects of BS-EAc<sub>f</sub> on TNF- $\alpha$  induced production of trappin-2/elafin on normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes

NHK and PK were grown to confluence, then the medium was changed to a keratinocyte medium containing DMEM with Ham's F12 (3:1) supplemented with 0.5% Fetal Clone II serum during 4 hours. After this time, cells were pre-treated or not with BS-EAc<sub>f</sub> and Dex during one hour and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) during 20h (BS-EAc<sub>f</sub> concentrations=500, 250, 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; Dex=5 $\mu$ M). Levels of Trappin-2/elafin in keratinocyte supernatants were measured using ELISA kits from R&D System according to the manufacturer protocols. Histograms represent the mean  $\pm$  standard error of: **(a)** trappin-2/elafin production of NHK from three donors (18, 26, 38 years-old women); **(b)** trappin-2/elafin production of PK from three donors (46, 51 and 69 years-old women). Bars with the same letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ) (ANOVA, Tukey's post hoc test).

**BS-EAc<sub>f</sub> inhibits the TNF $\alpha$ -induced nitric oxide production in NHK and PK**

Previous evidence has demonstrated that the inducible nitric oxide synthase (iNOS), an enzyme that produces citrulline and NO from L-arginine, is significantly up-regulated in psoriatic skin (Sirsjo *et al.*, 1996). Moreover, the production of NO is ten-fold higher in nonlesional psoriatic skin and ten-fold higher again in the plaques themselves (Ormerod *et al.*, 1998; Weller and Ormerod, 1997). TNF- $\alpha$  has been shown to induce NO production in human keratinocytes (Lee *et al.*, 2011). Nitric oxide has been shown to be a trigger for keratinocyte hyperplasia and a factor accounting for skin erythema, through its vasoactive effects (Morhenn, 1997). Previous investigations have shown that psoriasis treatment with topical betamethasone, tar, dithranol and calcipotriol reduce NO production in psoriatic plaques (Gottlieb *et al.*, 2005; Ormerod *et al.*, 1997; Ormerod *et al.*, 1998). Additionally, the reduced expression of iNOS mRNA after psoriasis treatment with etanercept has been correlated with psoriasis therapeutic improvement (Gottlieb *et al.*, 2005). Considering these results, we next asked about the capacity of BS-EAc<sub>f</sub> to inhibit the nitric oxide production by NHK and PK under TNF-stimulation. As shown in figure 43a and b, unstimulated NHK and PK produce undetectable amounts of nitrite, whereas stimulation of cells with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) over 48 h induced a threefold increase of nitrite levels in PK supernatants compared to levels determined in NHK supernatants. Treatment of both, NHK and PK with BS-EAc<sub>f</sub> (250 and 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) and Dex (5 $\mu$ M) significantly decreased the ability of cells to produce nitrite in response to TNF- $\alpha$ , while the extract at 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> modestly inhibited the NO<sub>2</sub><sup>-</sup> production by NHK (p<0.05), but not by PK. To further investigate the mechanism of the inhibitory effects of BS-EAc<sub>f</sub> on TNF $\alpha$ -induced nitrite generation by PK, we analyzed the effect of BS-EAc<sub>f</sub> at the highest concentration on the iNOS transcription by these cells. As shown in figure 43c, TNF- $\alpha$  induced the expression of iNOS mRNA by PK after 4 h compared to untreated cells (mean iNOs/ $\beta$ -Actin= 1.03 vs. 0.41 respectively), although it did not reach the significant level (p>0.05). Moreover, BS-EAc<sub>f</sub> decreased the TNF-induced iNOS mRNA expression by these cells (mean iNOs/ $\beta$ -Actin=0.35 vs. 1.03 respectively), but it did not reach the significance (p>0.05). Together, these results suggest that BS-EAc<sub>f</sub> could inhibit the TNF $\alpha$ -induced nitric oxide production by PK via the inhibition of iNOS expression at the transcriptional level.



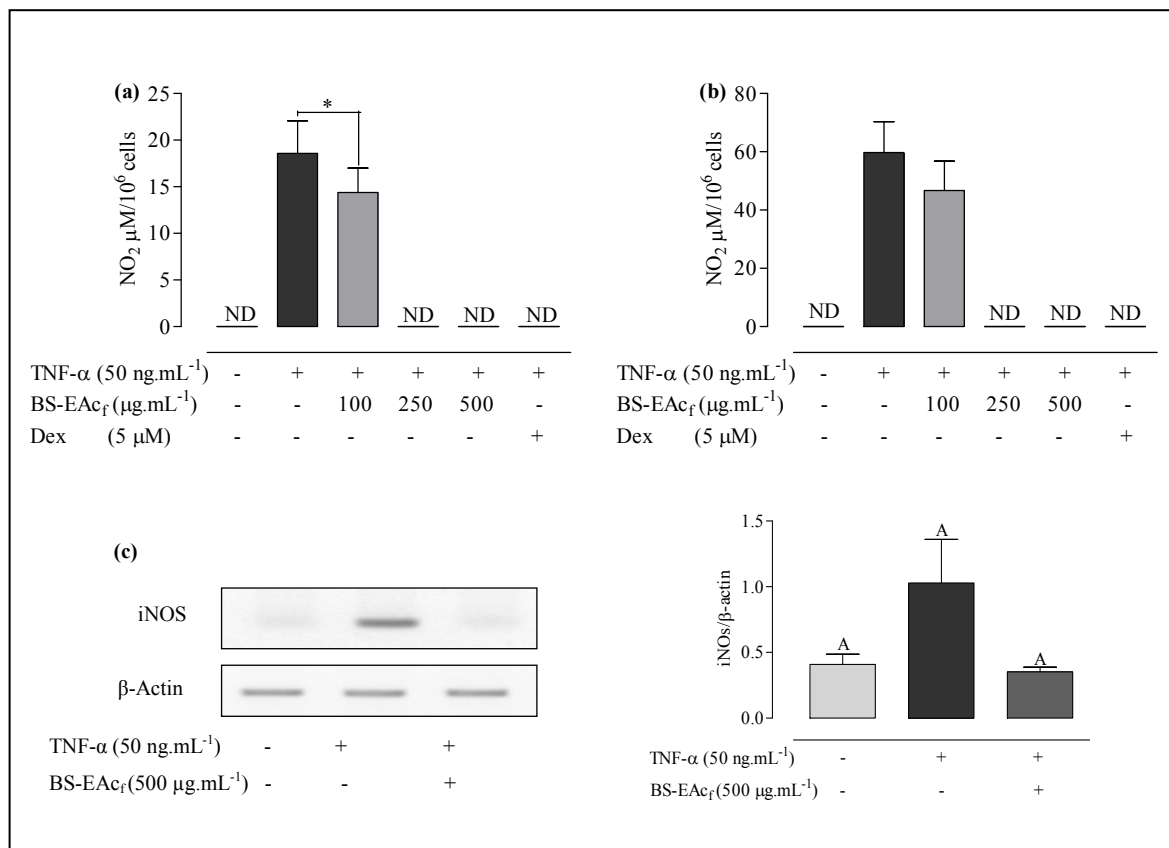


Figure 43 Effects of BS-EAc $_f$  on TNF- $\alpha$  induced nitric oxide production on normal (NHK) and psoriatic (PK) keratinocytes

NHK (n=3) and PK (n=3) were cultured until confluence, then the medium was changed to a keratinocyte medium containing DMEM with Ham's F12 (3:1) supplemented with 0.5% Fetal Clone II serum during 4 hours. After this time, cells were pre-treated or not with BS-EAc $_f$  and Dex during one hour and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL $^{-1}$ ) during 48h (BS-EAc $_f$  concentrations=500, 250, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Dex=5 $\mu\text{M}$ ). Accumulated nitrite levels in cell supernatants were determined using the Griess reagent system. Histograms represent the mean  $\pm$  standard error of: **(a)**  $\text{NO}_2$  production of NHK from three donors (18, 26 and 38 years-old women); **(b)**  $\text{NO}_2$  production of PK from three donors (46, 51 and 69 years-old women), ND=non-detectable levels (detection limit, 1.56  $\mu\text{M}$ ), \* $p < 0.05$  (Student's t test). **(c)** Expression of mRNA for iNOS by PK pre-treated or not with BS-EAc $_f$  during one hour and further stimulated or not with TNF- $\alpha$  (50 ng.mL $^{-1}$ ) during 4h (BS-EAc $_f$  concentration=500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Total RNA was isolated from PK and analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Results shown in **c** are representative of four psoriatic donors (35, 46, 51, 69 years-old women). Bars with the same letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ) (ANOVA, Tukey's post hoc test).

**BS-EAc<sub>f</sub> inhibits the TNF $\alpha$ -induced activation of NF- $\kappa$ B in psoriatic keratinocytes**

Accumulating data demonstrate that TNF $\alpha$ -activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B is important in the regulated expression of a large number of pro-inflammatory genes in epithelial cells including IL-8, IL-6, ICAM-1, VEGFC, fractalkine/CX3CL1, elafin and iNOS (Banno *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2008; Bhavsar *et al.*, 2008; Bingle *et al.*, 2001; Ulanova *et al.*, 2006). Moreover, TNF- $\alpha$  blockade *in vivo* has been correlated with the decrease of phosphorylated NF- $\kappa$ B in the epidermis and with clinical psoriasis improvement (Lizzul *et al.*, 2005). In order to gain insight into BS-EAc<sub>f</sub> mechanism of action, we determined whether inhibition of TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation might be involved in BS-EAc<sub>f</sub>-induced signaling pathways in psoriatic keratinocytes.

As shown in figure 44, phosphorylated form of I $\kappa$ B $\alpha$  on Ser32 was hardly detectable in unstimulated PK. However, upon TNF- $\alpha$  exposure (50 ng.mL<sup>-1</sup>) for 20 min, cellular I $\kappa$ B $\alpha$  was significantly phosphorylated, but its degradation had not started yet. BS-EAc<sub>f</sub> (500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) significantly inhibited the TNF $\alpha$ -induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation by PK at 20 min (Figure 44A,a). The phosphorylated form of I $\kappa$ B $\alpha$  is further subjected to ubiquitination followed by proteasome-mediated degradation. The degradation of cellular I $\kappa$ B $\alpha$  is a key step in NF- $\kappa$ B activation and nuclear translocation of p50/p65 and other NF- $\kappa$ B subunits. Upon TNF- $\alpha$  stimulation (50 ng.mL<sup>-1</sup>), a significant degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  was observed within 30 and 60 min, whereas BS-EAc<sub>f</sub> (500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) significantly prevented this degradation (Figure 44B,b). The transcriptional activity of the p50/65 dimer is further enhanced by the IKK-dependent phosphorylation of p65 on Ser536 (Hayden and Ghosh, 2008), so we further examined whether BS-EAc<sub>f</sub> could inhibit this phosphorylation. A significant decrease of TNF $\alpha$ -induced p65 phosphorylation on Ser536 in PK lysates (20, 30 and 60 min) was observed in cells treated with BS-EAc<sub>f</sub> (Figure 44C,c), whereas no effects were found on p65 expression after TNF $\alpha$ -stimulation or BS-EAc<sub>f</sub> treatment compared to untreated cells (Figure 44D,d). Taken together, these data demonstrate that BS-EAc<sub>f</sub> inhibits the TNF-induced NF- $\kappa$ B activation by PK in terms of phosphorylation and degradation of total I $\kappa$ B $\alpha$  as well as phosphorylation of p65, three key steps involved in the regulation of this transcription factor.

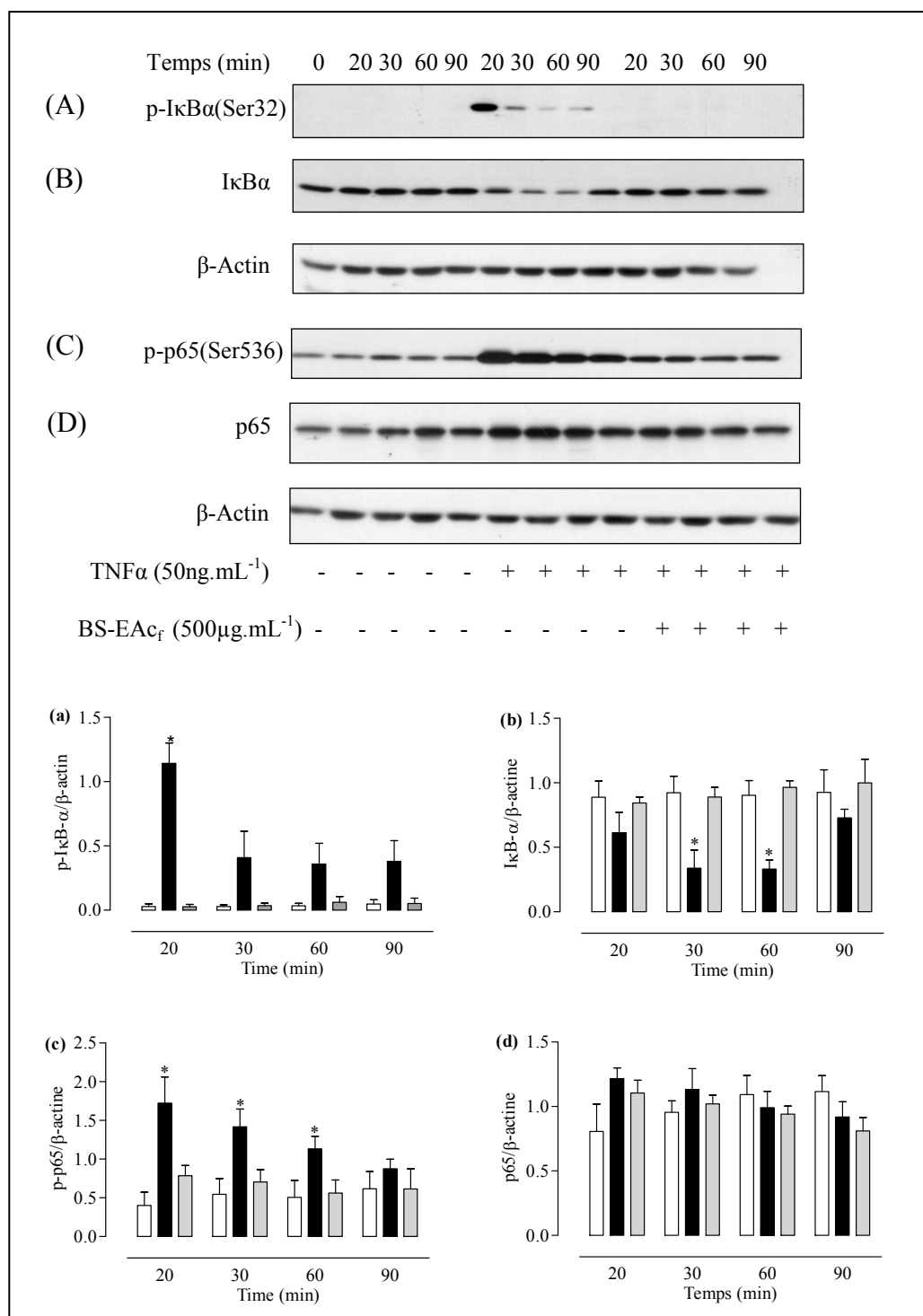


Figure 44 Inhibition of the TNF-induced activation of NF-κB by BS-EAc<sub>f</sub> in psoriatic keratinocytes

Psoriatic keratinocytes were cultured until confluence, then the medium was changed to a keratinocyte medium containing DMEM with Ham's F12 (3:1) supplemented with 0.5% Fetal Clone II serum during 4 hours. After this time, cells were pre-treated or not with BS-EAc<sub>f</sub> (500 μg.mL<sup>-1</sup>) during one hour and further stimulated or not with TNF-α (50 ng.mL<sup>-1</sup>)

during 20, 30, 60 and 90 min. (A) Lysates from psoriatic keratinocytes were subjected to western immunoblotting for phospho-I $\kappa$ B (p-I $\kappa$ B), I $\kappa$ B, phospho-p65 (p-65), p65 and  $\beta$ -actin loading control. One representative experiment out of three is shown. Histograms represent the mean  $\pm$  standard error of: **(a)** p-I $\kappa$ B $\alpha$ /actin from PK from three donors (36, 46, 51 years-old women); **(b)** I $\kappa$ B $\alpha$ /actin from PK from three donors (36, 46, 51 years-old women); **(c)** p-p65/actin from PK from three donors (36, 46, 51 years-old women); **(d)** p65/actin of PK from three donors (36, 46, 51 years-old women). Open bars represent cells exposed to vehicle (medium containing DMEM with Ham's F12 (3:1) supplemented with 0.5% Fetal Clone II serum + 0.2% ethanol), filled bars represent cells stimulated with TNF $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) and gray bars represent cells stimulated with TNF $\alpha$  (50 ng.mL<sup>-1</sup>) and treated with BS-EAc<sub>r</sub> (500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). \*p<0.05 (ANOVA, Tukey's post hoc test).

#### 4.3.5 Discussion

Although no cure exists for psoriasis, available treatments are mainly directed to: a) the inhibition of psoriatic keratinocyte hyperproliferation (cyclosporine A, retinoids); b) the normalization of keratinocyte differentiation (analogues of vitamin D, retinoids); c) the reduction of the recruitment and activation of immunocytes into the epidermis and dermis (cyclosporine A, biological treatments) and finally d) the neutralization of cytokines, adhesion and signaling molecules involved in the inflammatory cascade (biological treatments) (Mehrabi *et al.*, 2002). These therapeutic approaches are partly based on different views involving keratinocytes, T cells and the aberrant cytokine network in the pathogenesis of this disease.

In the context of cytokine network hypothesis, TNF- $\alpha$  overexpression has been proposed to be implicated in the pathogenesis of psoriasis (Kristensen *et al.*, 1993; Mussi *et al.*, 1997). Consequently, anti-TNF- $\alpha$  inhibitors (infliximab, adalimumab, and etanercept) have proved to be remarkably efficacious in controlling psoriasis symptoms (Ogilvie *et al.*, 2001; Saurat *et al.*, 2008). However, TNF- $\alpha$  blockade with systemic biological therapies has numerous limitations including cost, reactions against the foreign protein and side effects. In fact, these therapies have been associated with an increased risk of infection at the upper respiratory tract and tuberculosis (Harris and Keane, 2010) and also with a potential risk of developing lymphomas (Saraceno and Chimenti, 2008). Therefore, novel molecules capable to block TNF- $\alpha$  effects, being safe and yet efficacious are required for developing new antipsoriatic treatments.

There is a growing interest toward the use of plant polyphenols for the treatment of skin conditions due to their anti-inflammatory, wound healing, cancer preventing and antiage effects (Pastore *et al.*, 2011). However, the potential of these multifunctional molecules as anti-psoriatic agents has not been sufficiently explored and *in vitro* experiments evaluating their effects on keratinocytes are generally carried out on normal or immortalized cells which bear significant morphological and functional differences compared with psoriatic keratinocytes (Cho *et al.*, 2007; Nickoloff *et al.*, 1994; Pastore *et al.*, 2011; Sur *et al.*, 2008; Trompezinski *et al.*, 2003). Even though in the present study we used normal human

keratinocytes for comparative purposes, mechanistic studies regarding the BS-EAc<sub>f</sub> effects were undertaken on psoriatic keratinocytes. This choice is also justified by the primarily goal of this research which was the evaluation of the antipsoriatic properties of BS-EAc<sub>f</sub>. In fact, to the best of our knowledge, this is the first investigation analyzing the mechanism of action of a polyphenolic extract directly on psoriatic keratinocytes.

BS-EAc<sub>f</sub> has recently been characterized by HPLC, MS and NMR analyses and its major chemical constituents were determined to be polyphenols (84.91% w.w<sup>-1</sup> of the total mass of characterized molecules) (Garcia-Perez *et al.*, 2012). When regrouped by classes, major polyphenols present in the extract are neolignans (1834.32 mg/100 g of dry extract) and lignans (1642.01 mg/100 g of dry extract). Some of the individual constituents identified in BS-EAc<sub>f</sub> such as pinoresinol (562.13 mg/100 g of dry extract), 7-oxo-15-hydroxydehydroabietic acid (576.92 mg/100 g of dry extract), mearnsetin (488.16 mg/100 g of dry extract), secoisolariciresinol (399.41 mg/100 g of dry extract), taxifolin (325.44 mg/100 g of dry extract), *trans*-p-coumaric acid (295.85 mg/100 g of dry extract) and isolariciresinol (236.69 mg/100 g of dry extract) are recognized as bioactive molecules (Cho *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2006). This extract also possesses a higher content of *trans*-resveratrol (502.95 mg/100 g of dry extract) than other commercial polyphenolic extracts obtained from red wine, red grape skin, white grape skin, red grape seed and white grape seed, considered as sources of this molecule (Garcia-Perez *et al.*, 2012). Additionally, BS-EAc<sub>f</sub> is composed of proanthocyanidins with an average degree of polymerisation of 3.3 (Diouf *et al.*, 2009).

In the present study, the pharmacological action of BS-EAc<sub>f</sub> on TNF $\alpha$ -induced keratinocyte activation was systematically compared to that of dexamethasone (5  $\mu$ M). This compound was chosen taking into account that corticosteroids are routinely used for the treatment of psoriasis and considering its significant antipsoriatic efficacy in relevant psoriasis *in vivo* models (Boehncke *et al.*, 1999; Bos and Spuls, 2008). Additionally, dexamethasone at 5 $\mu$ M, has been shown to inhibit the *in vitro* TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B p65 increase, phospho-I $\kappa$ B levels and NF- $\kappa$ B-DNA binding in keratinocytes, thereby decreasing the TNF $\alpha$ -induced production of cytokines and chemokines by these cells (Lee *et al.*, 2009b).

During psoriasis, human keratinocytes strongly express ICAM-1, thus serving as an anchor for retention of LFA-1<sup>+</sup> leukocytes into the epidermis (Griffiths *et al.*, 1989; Uyemura *et al.*, 1993; Veale *et al.*, 1995). Our results demonstrate that PK presented a higher expression of ICAM-1 than NHK at basal levels, which is in accordance with previous reports (Griffiths *et al.*, 1989; Uyemura *et al.*, 1993; Veale *et al.*, 1995). Moreover, TNF- $\alpha$  is a potent inducer of ICAM-1 expression in both NHK and PK, which was also found in previous investigations (Gilhar *et al.*, 1996; Griffiths *et al.*, 1989). When exposed to BS-EAc<sub>f</sub> particularly at 250 and 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a significant inhibition of TNF-induced ICAM-1 expression occurred in NHK and PK, whereas Dex did not exhibit significant effects. Inhibitory action of BS-EAc<sub>f</sub> on ICAM-1 expression could be related to the presence of taxifolin and *trans*-resveratrol in this extract, which have been shown to inhibit TNF- $\alpha$  induced ICAM-1 expression in different human cells such as microvascular endothelial cells and coronary arterial endothelial cells (Csiszar *et al.*, 2006; Freischmidt *et al.*, 2011). Previous studies have also shown that Dex failed to inhibit the TNF-induced ICAM-1 expression in other cell types (Hettmannsperger *et al.*, 1993) suggesting that the anti-inflammatory effects of this compound does not seem to be mediated by the modulation of this adhesion molecule (Hettmannsperger *et al.*, 1993).

IL-6 has been reported to be overexpressed in psoriatic skin (Grossman *et al.*, 1989; Ohta *et al.*, 1991; Oxholm, 1992). Our results show a considerable heterogeneity in NHK and PK responsiveness to TNF $\alpha$  stimulation for the IL-6 production. Indeed, no detectable amounts of this cytokine were found in NHK supernatants after 24 h of TNF- $\alpha$  treatment. Undetectable levels of IL-6 have also been found in unstimulated NHK (Formanek *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1996) although an early study reported the TNF-induced production of IL-6 by these cells (Li *et al.*, 1996). We found that concentrations of IL-6 were also below the detectable ELISA level in three of four of unstimulated PK, which is in accordance with a result previously reported (Miyachi *et al.*, 1995). However, TNF- $\alpha$  significantly increased the IL-6 secretion by PK as previously described (Li *et al.*, 1996). In this study, the TNF $\alpha$ -stimulation occurs in a medium containing 5% Fetal Clone II serum, whereas the TNF- $\alpha$  in a serum-free medium, failed to induce IL-6 production by PK at ELISA detectable levels (data not shown). Thus, it appears that the TNF- $\alpha$  acts in synergy with serum for inducing PK IL-6 release. The importance of serum for IL-6 production has been already

documented in cultured epidermal cells (Kirnbauer *et al.*, 1989; Krueger *et al.*, 1991). BS-EAc<sub>f</sub> inhibited the TNF $\alpha$ -induced IL-6 release by PK, particularly at 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and this effect was comparable to that of Dex used at 5  $\mu\text{M}$ . The *trans*-resveratrol has been shown to inhibit the TNF $\alpha$ -induced IL-6 expression and production in various cell lines (Csiszar *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2010). Therefore, the presence of this compound in the extract could be partially related to its inhibitory effects on IL-6 production. The high inhibitory effects of Dex on IL-6 release after TNF- $\alpha$  stimulation are in accordance with previous investigations which demonstrate the inhibitory action of Dex on TNF-induced IL-6 expression in epithelial cells (Verhoog *et al.*, 2011).

VEGF is a potent and selective mitogen for endothelial cells. Induced overexpression of this growth factor by basal keratinocytes on a transgenic mouse results in an expanded superficial dermal microvasculature similar to that seen in psoriatic skin (Xia *et al.*, 2003). Considering that in a serum-free medium the TNF- $\alpha$  failed to induce detectable VEGF amounts by PK and NHK supernatants (data not shown), the TNF- $\alpha$  stimulation occurred in a medium containing 5% Fetal Clone II serum. As serum has been shown to induce VEGF mRNA and protein by cultured human keratinocytes (Frank *et al.*, 1995), we can assume that TNF- $\alpha$  acts in synergy with it for inducing keratinocyte VEGF release. Unstimulated PK and NHK secreted comparable quantities of VEGF and both cell types responded similarly to TNF- $\alpha$  with a significant increase of VEGF secretion. This result contrasted with a previous investigation in which psoriatic keratinocytes constitutively secreted higher quantities of VEGF than NHK (Bhushan *et al.*, 1999). Culture conditions and time used during experiments (24 vs. 48 h) could be related to these differences.

A result particularly surprising was the different susceptibility of NHK and PK to the BS-EAc<sub>f</sub> inhibitory effects on the TNF $\alpha$ -induced VEGF release. Preliminary experiments (data not shown) demonstrated that BS-EAc<sub>f</sub> did not significantly reduce the VEGF levels compared to vehicle (medium supplemented with 5% Fetal Clone II serum and 0.2% ethanol), suggesting that the observed inhibitory effects would be mostly attributed to its ability to block the TNF- $\alpha$ -induced effects. In fact, this extract at all tested concentrations significantly inhibited the TNF $\alpha$ -induced VEGF release by NHK, but it failed to show any significant inhibitory effect at 100 and 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  on PK. Moreover, its inhibitory effects



at  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  were considerably diminished from 81.21% to 31.08% in NHK and PK, respectively. Although the NF- $\kappa$ B blockade has been shown to inhibit VEGF expression (Abeyama *et al.*, 2000), the VEGF promoter contains consensus sequences that bind other transcription factors in keratinocytes, including AP-1 (Diaz *et al.*, 2000) and AP-2 (Gille *et al.*, 2000), so it is possible that under TNF $\alpha$ -stimulation these transcription factors are activated in PK without any inhibitory effect of BS-EAc<sub>f</sub>. Another explanation could be the presence of compounds such as resveratrol in the extract. Indeed, a previous study has shown that this compound failed to inhibit the VEGF release by keratinocytes (Redondo *et al.*, 2000). Moreover, the use of a grape seed proanthocyanidin extract containing a similar quantity of resveratrol ( $5000 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) as the extract here studied ( $5029.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) upregulated the keratinocyte TNF $\alpha$ -induced VEGF mRNA expression and protein release (Khanna *et al.*, 2001). Although the exact reason for this effect remains to be elucidated, our results underline differences in the capacity of this extract to effectively downregulate the VEGF release on the function of the normal or psoriatic state of cells.

NHK and PK are important IL-8 producing cells (Nickoloff *et al.*, 1994; Takematsu and Tagami, 1993). As previously reported, PK constitutively and under TNF $\alpha$ -stimulation, release higher amounts of IL-8 compared to NHK (Giustizieri *et al.*, 2001), which suggests the presence of genetically determined aberrations in the constitutive and induced IL-8 production by these cells (Nickoloff *et al.*, 1994). BS-EAc<sub>f</sub> dose-dependently inhibited the release of IL-8 by activated NHK and PK. Resveratrol has the capacity to attenuate the IL-8 production by human adipocytes under TNF $\alpha$ -stimulation (Chuang *et al.*, 2010), meaning that the presence of this compound in the extract could be related to the observed inhibitory effect on IL-8 secretion by NHK and PK.

In this study we report for the first time that TNF- $\alpha$  induces fractalkine/CX3CL1 in psoriatic keratinocytes, at the protein and mRNA levels, which provides additional clues about the active role of this cytokine in psoriasis pathogenesis. On the contrary, TNF- $\alpha$  did not induce the release of fractalkine/CX3CL1 by NHK, which is in accordance with previous reports (Shirakata *et al.*, 2004; Sugaya *et al.*, 2003). Thus, by regulating the synthesis of fractalkine/CX3CL1 by PK, the TNF- $\alpha$  favorise the recruitment and adhesion of CX3CR1-expressing leucocytes into the skin (Raychaudhuri *et al.*, 2001). Our data also

demonstrate that BS-EAc<sub>f</sub> dose-dependently inhibited the TNF $\alpha$ -induced fractalkine/CX3CL1 secretion by PK. This effect could be mediated by the inhibition of the TNF $\alpha$ -induced *de novo* synthesis of this chemokine as demonstrated from results obtained by RT-PCR. A previous study showed that 5-10  $\mu$ M of resveratrol is sufficient to suppress the TNF $\alpha$ -induced fractalkine/CX3CL1 mRNA and protein in human umbilical vein endothelial cells (Moon *et al.*, 2006). Although the concentrations used for the extract in this study (100-500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) assume that resveratrol is present at least at 2.20-11.01  $\mu$ M, further characterization of the mechanism of action of this compound is warranted to determine its capacity to inhibit TNF $\alpha$ -induced fractalkine/CX3CL1 by PK.

The expression of trappin-2/elafin *in vivo* has been associated with the keratinocyte phenotype of regenerative differentiation seen in psoriasis (Pfundt *et al.*, 2000). TNF- $\alpha$  has been shown to induce elafin expression in NHK at both mRNA and the protein levels (Pfundt *et al.*, 2000; Takematsu and Tagami, 1993). Unexpectedly, our results demonstrate that NHK and PK constitutively release high amounts of trappin-2/elafin. This discrepancy could be explained by the culture system used. According to a previous work, NHK cultured in the Rheinwald-Green system (which resemble to our culture system until confluence) secrete high amounts of soluble trappin-2/elafin, whereas the same cells in a serum-free KGM produce very low quantities (Alkemade *et al.*, 1994). Under TNF $\alpha$ -stimulation, NHK significantly augmented the elafin secretion, but not PK which showed a non significant increase. No apparent explanations were found for this result on PK; even though we can speculate that the culture system or the activated state of cells could be related to this finding. BS-EAc<sub>f</sub> dose-dependently inhibited the TNF $\alpha$ -induced trappin-2/elafin secretion by NHK and PK. However, no reports were found about the effects of the major compounds of this extract on TNF $\alpha$ -induced release of trappin-2/elafin by cell lines.

Previous investigations have shown that recognized antipsoriatic treatments act by reducing the NO production and iNOS expression in psoriatic skin (Gottlieb *et al.*, 2005; Ormerod *et al.*, 1997; Ormerod *et al.*, 1998). In fact, increased iNOS mRNA has been observed in keratinocytes from psoriatic plaques *in vivo* (Bruch-Gerharz *et al.*, 1996; Kolb-Bachofen *et al.*, 1994). Like previous reports (Lee *et al.*, 2009b; Lee *et al.*, 2011), our results show that TNF- $\alpha$  induces both NHK and PK nitric oxide production but PK produced higher amounts

than NHK. This is consistent with the increased NO production observed in psoriatic skin (Ormerod *et al.*, 1998; Weller and Ormerod, 1997). Moreover, we show for the first time that TNF- $\alpha$  induces an increase of mRNA iNOS expression by PK, which contrasts with other studies which demonstrate that only the combination of TNF- $\alpha$  with other cytokines such as IL-1 $\beta$  or INF- $\gamma$ , is able to induce the iNOS mRNA expression by NHK (Bruch-Gerharz *et al.*, 1996; Bruch-Gerharz *et al.*, 2003; Sirsjo *et al.*, 1996). Our results also show that the black spruce extract inhibited the TNF $\alpha$ -induced production of nitric oxide by PK. iNOS activation and NO production are mainly transcriptionally regulated (Aktan, 2004), so the inhibition of the iNOS mRNA expression could be related with a low nitrite production by PK after BS-EAc<sub>f</sub> treatment. Other studies show that some major compounds present in this extract such as pinoresinol and resveratrol are able to inhibit the NO production by different cell lines via the inhibition of iNOS mRNA expression (Jung *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2000). Other post-transcriptional regulatory mechanisms for NO synthesis have also been proposed. L-arginine depletion has been shown to inhibit iNOS mRNA translation (Lee *et al.*, 2003) and co-expression of arginase-1 results in substrate competition and diminution of NO production (Bruch-Gerharz *et al.*, 2003). Whether the BS-EAc<sub>f</sub> can also act on these mechanisms remains to be elucidated.

The immediate effects of TNF- $\alpha$  cause the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B in keratinocytes (Banno *et al.*, 2004) which is essential for the production of inflammatory chemokines and cytokines (IL-6, IL-8) and adhesion molecules (ICAM-1) (Banno *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2008). Moreover, the TNF $\alpha$ -induced upregulation of fractalkine/CX3CL1, elafin and iNOS in epithelial cells has been shown to be mediated by the NF- $\kappa$ B pathway (Bhavsar *et al.*, 2008; Bingle *et al.*, 2001; Ulanova *et al.*, 2006). Thus, the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling has been suggested to provide a suitable therapeutic target for the treatment of psoriasis (Lizzul *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). In fact, pharmacological studies have revealed that antipsoriatic drugs such as acitretin, infliximab, calcipotriol and etanercept exert their action through inhibition of NF- $\kappa$ B activation pathways (Johansen *et al.*, 2005; Kokolakis *et al.*; Lizzul *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Our results reveal that BS-EAc<sub>f</sub> inhibits the TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation by PK in terms of the phosphorylation and degradation of total I $\kappa$ B $\alpha$  and the phosphorylation of p65, three important steps involved in the regulation of this transcription factor. Thus, we

presume that the anti-inflammatory effects of BS-EAc<sub>f</sub> on PK might be associated with the inhibition of the TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. These data are consistent with studies performed with other cell lines that associate the anti-inflammatory activity of plant polyphenols with effective NF- $\kappa$ B inhibition (Csiszar *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2009a; Pastore *et al.*, 2011; Sur *et al.*, 2008).

#### 4.3.6 Conclusions

Taken together, results presented in this study generally show that PK exhibit an enhanced response to TNF- $\alpha$  compared to NHK, regarding the ICAM-1 expression, nitric oxide production and release of IL-6, IL-8 and fractalkine which is in accord with previous investigations performed in psoriatic skin *in vivo* (Veale *et al.*, 1995; Ormerod *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 1989; Giustizieri *et al.*, 2001; Sugaya *et al.*, 2003). These results support the accepted hypothesis about the contribution of keratinocytes to psoriasis physiopathology through their different, intrinsic enhanced capacity to respond to proinflammatory stimuli, thereby amplifying the inflammatory process (Griffiths *et al.*, 1989). Such peculiarities make of these cells relevant tools for studying the mechanism of action of new antipsoriatic drugs or new natural products intended to modulate keratinocyte aberrant responses in the context of psoriatic inflammation.

This study provides new insight into the immunopharmacological role of a polyphenolic extract in impacting the TNF $\alpha$ -induced responses by psoriatic keratinocytes. In fact, we have demonstrated for the first time that this readily available extract obtained from the residues of Canadian forest industry, provides a simple, inexpensive and highly effective means to reduce the inflammation induced by TNF- $\alpha$  in psoriatic keratinocytes. Since very few or no reports could be found about the effects of major molecules present in this extract on TNF $\alpha$ -induced responses by keratinocytes, we consider that this study also open new perspectives for the understanding of the immunopharmacological role of these compounds on TNF $\alpha$ -mediated diseases, such as psoriasis.

#### 4.3.7 Acknowledgments

The authors are very grateful to the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and to the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) for the financial support of this projet (research grant to TS, PEP and RP). The Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the “Fonds d’enseignement et de recherche” (FER) of the Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, QC, Canada (scholarship to MEGP) are also acknowledged. RP was recipient of a research fellowship from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec” (FRSQ) of Québec, Canada.

## 4.3.8 References

- Abeyama, K., Eng, W., Jester, J. V., Vink, A. A., Edelbaum, D., Cockerell, C. J., Bergstresser, P. R., and Takashima, A. (2000). A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. *J Clin Invest*, **105**(12), 1751-1759.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*, **75**(6), 639-653.
- Alkemade, J. A., Molhuizen, H. O., Ponec, M., Kempenaar, J. A., Zeeuwen, P. L., de Jongh, G. J., van Vlijmen-Willems, I. M., van Erp, P. E., van de Kerkhof, P. C., and Schalkwijk, J. (1994). SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci*, **107 ( Pt 8)**, 2335-2342.
- Amigo, M., Schalkwijk, J., Olthuis, D., De Rosa, S., Paya, M., Terencio, M. C., and Lamme, E. (2006). Identification of avarol derivatives as potential antipsoriatic drugs using an in vitro model for keratinocyte growth and differentiation. *Life Sci*, **79**(25), 2395-2404.
- Aung, G., Niyonsaba, F., Ushio, H., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2011). Elafin and secretory leukocyte protease inhibitor stimulate the production of cytokines and chemokines by human keratinocytes via MAPK/ERK and NF-kappaB activation. *J Dermatol Sci*, **63**(2), 128-131.
- Banno, T., Gazel, A., and Blumenberg, M. (2004). Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem*, **279**(31), 32633-32642.
- Barker, J. N., Jones, M. L., Mitra, R. S., Crockett-Torabe, E., Fantone, J. C., Kunkel, S. L., Warren, J. S., Dixit, V. M., and Nickoloff, B. J. (1991). Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *Am J Pathol*, **139**(4), 869-876.
- Ben-Arye, E., Ziv, M., Frenkel, M., Lavi, I., and Rosenman, D. (2003). Complementary medicine and psoriasis: linking the patient's outlook with evidence-based medicine. *Dermatology*, **207**(3), 302-307.
- Benoit, S., Toksoy, A., Brocker, E. B., Gillitzer, R., and Goebeler, M. (2004). Treatment of recalcitrant pustular psoriasis with infliximab: effective reduction of chemokine expression. *Br J Dermatol*, **150**(5), 1009-1012.
- Bhavsar, P. K., Sukkar, M. B., Khorasani, N., Lee, K. Y., and Chung, K. F. (2008). Glucocorticoid suppression of CX3CL1 (fractalkine) by reduced gene promoter recruitment of NF-kappaB. *Faseb J*, **22**(6), 1807-1816.

- Bhushan, M., McLaughlin, B., Weiss, J. B., and Griffiths, C. E. (1999). Levels of endothelial cell stimulating angiogenesis factor and vascular endothelial growth factor are elevated in psoriasis. *Br J Dermatol*, **141**(6), 1054-1060.
- Bingle, L., Tetley, T. D., and Bingle, C. D. (2001). Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **25**(1), 84-91.
- Boehncke, W. H., Kock, M., Hardt-Weinelt, K., Wolter, M., and Kaufmann, R. (1999). The SCID-hu xenogeneic transplantation model allows screening of anti-psoriatic drugs. *Arch Dermatol Res*, **291**(2-3), 104-106.
- Boorsma, D. M., de Haan, P., Willemze, R., and Stoof, T. J. (1994). Human growth factor (huGRO), interleukin-8 (IL-8) and interferon-gamma-inducible protein (gamma-IP-10) gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, **286**(8), 471-475.
- Bos, J. D., and Spuls, P. I. (2008). Topical treatments in psoriasis: today and tomorrow. *Clin Dermatol*, **26**(5), 432-437.
- Bose, F., Raeli, L., Garutti, C., Frigerio, E., Cozzi, A., Crimi, M., Caprioli, F., Scavelli, R., Altomare, G., Geginat, J., Abrignani, S., and Reali, E. Dual role of anti-TNF therapy: enhancement of TCR-mediated T cell activation in peripheral blood and inhibition of inflammation in target tissues. *Clin Immunol*, **139**(2), 164-176.
- Bruch-Gerharz, D., Fehsel, K., Suschek, C., Michel, G., Ruzicka, T., and Kolb-Bachofen, V. (1996). A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med*, **184**(5), 2007-2012.
- Bruch-Gerharz, D., Schnorr, O., Suschek, C., Beck, K. F., Pfeilschifter, J., Ruzicka, T., and Kolb-Bachofen, V. (2003). Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol*, **162**(1), 203-211.
- Cordiali-Fei, P., Trento, E., D'Agosto, G., Bordignon, V., Mussi, A., Ardigo, M., Mastroianni, A., Vento, A., Solivetti, F., Berardesca, E., and Ensoli, F. (2007). Effective therapy with anti-TNF-alpha in patients with psoriatic arthritis is associated with decreased levels of metalloproteinases and angiogenic cytokines in the sera and skin lesions. *Ann N Y Acad Sci*, **1110**, 578-589.
- Csiszar, A., Smith, K., Labinsky, N., Orosz, Z., Rivera, A., and Ungvari, Z. (2006). Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**(4), H1694-1699.
- Chan, M.M.Y., Mattiacci, J.A., Hwang, H.S., Shah, A and Fong, D. (2000). Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol in the inhibition



of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochemical Pharmacology*, **60**, 1539–1548

- Cho, J. W., Lee, K. S., and Kim, C. W. (2007). Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med*, **19**(3), 469-474.
- Cho, J. Y., Kim, A. R., and Park, M. H. (2001). Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles. *Planta Med*, **67**(4), 312-316.
- Chuang, C. C., Martinez, K., Xie, G., Kennedy, A., Bumrungpert, A., Overman, A., Jia, W., and McIntosh, M. K. (2010). Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr*, **92**(6), 1511-1521.
- Diaz, B. V., Lenoir, M. C., Ladoux, A., Frelin, C., Demarchez, M., and Michel, S. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem*, **275**(1), 642-650.
- Diouf, P. N., Stevanovic, T., and Cloutier, A. (2009). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, **113**(4), 897-902.
- Echigo, T., Hasegawa, M., Shimada, Y., Takehara, K., and Sato, S. (2004). Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in atopic dermatitis: possible contribution to skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, **113**(5), 940-948.
- Formanek, M., Knerer, B., Temmel, A., Thurnher, D., Millesi, W., and Kornfehl, J. (1998). Oral keratinocytes derived from the peritonsillar mucosa express the proinflammatory cytokine IL-6 without prior stimulation. *J Oral Pathol Med*, **27**(5), 202-206.
- Frank, S., Hubner, G., Breier, G., Longaker, M. T., Greenhalgh, D. G., and Werner, S. (1995). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, **270**(21), 12607-12613.
- Freischmidt, A., Jurgenliemk, G., Kraus, B., Okpanyi, S. N., Muller, J., Kelber, O., Weiser, D., and Heilmann, J. (2011). Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised Willow bark extract. *Phytomedicine*, **19**(3-4), 245-252.
- García-Pérez, M.E., Royer, M., Herbette, G., Desjardins, Y., Pouliot, R., Stevanovic, T. (2012) *Picea mariana* bark: a new source of trans-resveratrol and other bioactive polyphenols. *Food Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.050>

- Gilhar, A., David, M., Kalish, R. S., and Weisinger, G. (1996). In vivo effects of cytokines on psoriatic skin grafted on nude mice: involvement of the tumour necrosis factor (TNF) receptor. *Clin Exp Immunol*, **106**(1), 134-142.
- Gille, J., Reisinger, K., Asbe-Vollkopf, A., Hardt-Weinelt, K., and Kaufmann, R. (2000). Ultraviolet-A-induced transactivation of the vascular endothelial growth factor gene in HaCaT keratinocytes is conveyed by activator protein-2 transcription factor. *J Invest Dermatol*, **115**(1), 30-36.
- Giustizieri, M. L., Mascia, F., Frezzolini, A., De Pita, O., Chinni, L. M., Giannetti, A., Girolomoni, G., and Pastore, S. (2001). Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, **107**(5), 871-877.
- Gottlieb, A. B., Chamian, F., Masud, S., Cardinale, I., Abello, M. V., Lowes, M. A., Chen, F., Magliocco, M., and Krueger, J. G. (2005). TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol*, **175**(4), 2721-2729.
- Gottlieb, A. B., Masud, S., Ramamurthi, R., Abdulghani, A., Romano, P., Chaudhari, U., Dooley, L. T., Fasanmade, A. A., and Wagner, C. L. (2003). Pharmacodynamic and pharmacokinetic response to anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody (infliximab) treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, **48**(1), 68-75.
- Griffiths, C. E., Voorhees, J. J., and Nickoloff, B. J. (1989). Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol*, **20**(4), 617-629.
- Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., and Gottlieb, A. B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(16), 6367-6371.
- Harris, J., and Keane, J. (2010). How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol*, **161**(1), 1-9.
- Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, **132**(3), 344-362.
- Hettmannsperger, U., Tenorio, S., Orfanos, C. E., and Detmar, M. (1993). Corticosteroids induce proliferation but do not influence TNF- or IL-1 beta-induced ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *Arch Dermatol Res*, **285**(6), 347-351.
- Jean, J., Lapointe, M., Soucy, J., and Pouliot, R. (2009). Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci*, **53**(1), 19-25.

- Johansen, C., Flindt, E., Kragballe, K., Henningsen, J., Westergaard, M., Kristiansen, K., and Iversen, L. (2005). Inverse regulation of the nuclear factor-kappaB binding to the p53 and interleukin-8 kappaB response elements in lesional psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, **124**(6), 1284-1292.
- Johansen, C., Vinter, H., Soegaard-Madsen, L., Olsen, L. R., Steiniche, T., Iversen, L., and Kragballe, K. (2010). Preferential inhibition of the mRNA expression of p38 mitogen-activated protein kinase regulated cytokines in psoriatic skin by anti-TNFalpha therapy. *Br J Dermatol*, **163**(6), 1194-1204.
- Jung, H.W., Mahesh, R., Lee, J.G., Lee, S.H., Kim, Y.S., and Park, Y.(2010). Pinosesinol from the fruits of *Forsythia koreana* inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia. *Neuroscience letters*, **480**, 215-220
- Khanna, S., Roy, S., Bagchi, D., Bagchi, M., and Sen, C. K. (2001). Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radic Biol Med*, **31**(1), 38-42.
- Kirnbauer, R., Kock, A., Schwarz, T., Urbanski, A., Krutmann, J., Borth, W., Damm, D., Shipley, G., Ansel, J. C., and Luger, T. A. (1989). IFN-beta 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. *J Immunol*, **142**(6), 1922-1928.
- Klement, J. F., Rice, N. R., Car, B. D., Abbondanzo, S. J., Powers, G. D., Bhatt, P. H., Chen, C. H., Rosen, C. A., and Stewart, C. L. (1996). IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol*, **16**(5), 2341-2349.
- Kokolakis, G., Giannikaki, E., Stathopoulos, E., Avramidis, G., Tosca, A. D., and Kruger-Krasagakis, S. Infliximab restores the balance between pro- and anti-apoptotic proteins in regressing psoriatic lesions. *Br J Dermatol*.
- Kolb-Bachofen, V., Fehsel, K., Michel, G., and Ruzicka, T. (1994). Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris. *Lancet*, **344**(8915), 139.
- Kristensen, M., Chu, C. Q., Eedy, D. J., Feldmann, M., Brennan, F. M., and Breathnach, S. M. (1993). Localization of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and its receptors in normal and psoriatic skin: epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor. *Clin Exp Immunol*, **94**(2), 354-362.
- Krueger, G., Koo, J., Lebwohl, M., Menter, A., Stern, R. S., and Rolstad, T. (2001). The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. *Arch Dermatol*, **137**(3), 280-284.
- Krueger, J., Ray, A., Tamm, I., and Sehgal, P. B. (1991). Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells. *J Cell Biochem*, **45**(4), 327-334.

- Lee, A. S., Jung, Y. J., Kim, D. H., Lee, T. H., Kang, K. P., Lee, S., Lee, N. H., Sung, M. J., Kwon, D. Y., Park, S. K., and Kim, W. (2009a). Epigallocatechin-3-O-gallate decreases tumor necrosis factor-alpha-induced fractalkine expression in endothelial cells by suppressing NF-kappaB. *Cell Physiol Biochem*, **24**(5-6), 503-510.
- Lee, C. S., Ko, H. H., Seo, S. J., Choi, Y. W., Lee, M. W., Myung, S. C., and Bang, H. (2009b). Diarylheptanoid hirsutenone prevents tumor necrosis factor-alpha-stimulated production of inflammatory mediators in human keratinocytes through NF-kappaB inhibition. *Int Immunopharmacol*, **9**(9), 1097-1104.
- Lee, C. S., Lee, S. A., Kim, Y. J., Seo, S. J., and Lee, M. W. (2011). 3,4,5-Tricaffeoylquinic acid inhibits tumor necrosis factor-alpha-stimulated production of inflammatory mediators in keratinocytes via suppression of Akt- and NF-kappa B-pathways. *International Immunopharmacology*, **11**(11), 1715-1723.
- Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R. J., Morris, S. M., Jr., and Ratan, R. R. (2003). Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(8), 4843-4848.
- Li, J., Farthing, P. M., Ireland, G. W., and Thornhill, M. H. (1996). IL-1 alpha and IL-6 production by oral and skin keratinocytes: similarities and differences in response to cytokine treatment in vitro. *J Oral Pathol Med*, **25**(4), 157-162.
- Lizzul, P. F., Aphale, A., Malaviya, R., Sun, Y., Masud, S., Dombrowskiy, V., and Gottlieb, A. B. (2005). Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. *J Invest Dermatol*, **124**(6), 1275-1283.
- Lowes, M. A., Lew, W., and Krueger, J. G. (2004). Current concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin*, **22**(4), 349-369, vii.
- Mehrabi, D., DiCarlo, J. B., Soon, S. L., and McCall, C. O. (2002). Advances in the management of psoriasis: monoclonal antibody therapies. *Int J Dermatol*, **41**(12), 827-835.
- Miyauchi, Y., Mitsuhashi, Y., Kikuchi, T., and Hashimoto, I. (1995). Feasibility of in vitro culturing of lesional psoriatic keratinocytes in medium containing high calcium concentrations. *Arch Dermatol Res*, **287**(8), 731-734.
- Moon, S. O., Kim, W., Sung, M. J., Lee, S., Kang, K. P., Kim, D. H., Lee, S. Y., So, J. N., and Park, S. K. (2006). Resveratrol suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced fractalkine expression in endothelial cells. *Mol Pharmacol*, **70**(1), 112-119.
- Morhenn, V. B. (1997). Langerhans cells may trigger the psoriatic disease process via production of nitric oxide. *Immunol Today*, **18**(9), 433-436.
- Mussi, A., Bonifati, C., Carducci, M., D'Agosto, G., Pimpinelli, F., D'Urso, D., D'Auria, L., Fazio, M., and Ameglio, F. (1997). Serum TNF-alpha levels correlate with disease

- severity and are reduced by effective therapy in plaque-type psoriasis. *J Biol Regul Homeost Agents*, **11**(3), 115-118.
- Nickoloff, B. J., Griffiths, C. E., and Barker, J. N. (1990). The role of adhesion molecules, chemotactic factors, and cytokines in inflammatory and neoplastic skin disease--1990 update. *J Invest Dermatol*, **94**(6 Suppl), 151S-157S.
- Nickoloff, B. J., Mitra, R. S., Varani, J., Dixit, V. M., and Polverini, P. J. (1994). Aberrant production of interleukin-8 and thrombospondin-1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis. *Am J Pathol*, **144**(4), 820-828.
- Nonomura, K., Yamanishi, K., Yasuno, H., Nara, K., and Hirose, S. (1994). Up-regulation of elafin/SKALP gene expression in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, **103**(1), 88-91.
- Ogilvie, A. L., Antoni, C., Dechant, C., Manger, B., Kalden, J. R., Schuler, G., and Luftl, M. (2001). Treatment of psoriatic arthritis with antitumour necrosis factor-alpha antibody clears skin lesions of psoriasis resistant to treatment with methotrexate. *Br J Dermatol*, **144**(3), 587-589.
- Ohta, Y., Katayama, I., Funato, T., Yokozeki, H., Nishiyama, S., Hirano, T., Kishimoto, T., and Nishioka, K. (1991). In situ expression of messenger RNA of interleukin-1 and interleukin-6 in psoriasis: interleukin-6 involved in formation of psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res*, **283**(6), 351-356.
- Ormerod, A. D., Dwyer, C. M., Weller, R., Cox, D. H., and Price, R. (1997). A comparison of subjective and objective measures of reduction of psoriasis with the use of ultrasound, reflectance colorimetry, computerized video image analysis, and nitric oxide production. *J Am Acad Dermatol*, **37**(1), 51-57.
- Ormerod, A. D., Weller, R., Copeland, P., Benjamin, N., Ralston, S. H., Grabowksi, P., and Herriot, R. (1998). Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, **290**(1-2), 3-8.
- Oxholm, A. (1992). Epidermal expression of interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in normal and immunoinflammatory skin states in humans. *APMIS Suppl*, **24**, 1-32.
- Pastore, S., Lulli, D., Potapovich, A. I., Fidanza, P., Kostyuk, V. A., Dellambra, E., De Luca, C., Maurelli, R., and Korkina, L. G. (2011). Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells. *J Dermatol Sci*, **63**(2), 104-114.
- Pfundt, R., Wiggins, M., Bergers, M., Zweers, M., Frenken, M., and Schalkwijk, J. (2000). TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway. *Arch Dermatol Res*, **292**(4), 180-187.

- Pol, A., Bergers, M., van Ruissen, F., Pfundt, R., and Schalkwijk, J. (2002). A simple technique for high-throughput screening of drugs that modulate normal and psoriasis-like differentiation in cultured human keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, **15**(4), 252-261.
- Raychaudhuri, S. P., Jiang, W. Y., and Farber, E. M. (2001). Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol*, **144**(6), 1105-1113.
- Redondo, P., Jimenez, E., Perez, A., and Garcia-Foncillas, J. (2000). N-acetylcysteine downregulates vascular endothelial growth factor production by human keratinocytes in vitro. *Arch Dermatol Res*, **292**(12), 621-628.
- Saraceno, R., and Chimenti, S. (2008). How to manage infections in the era of biologics? *Dermatol Ther*, **21**(3), 180-186.
- Saurat, J. H., Stingl, G., Dubertret, L., Papp, K., Langley, R. G., Ortonne, J. P., Unnebrink, K., Kaul, M., and Camez, A. (2008). Efficacy and safety results from the randomized controlled comparative study of adalimumab vs. methotrexate vs. placebo in patients with psoriasis (CHAMPION). *Br J Dermatol*, **158**(3), 558-566.
- Schottelius, A. J., Moldawer, L. L., Dinarello, C. A., Asadullah, K., Sterry, W., and Edwards, C. K., 3rd. (2004). Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp Dermatol*, **13**(4), 193-222.
- Shirakata, Y., Tohyama, M., Tsuda, T., Tan, E., Yahata, Y., Yamasaki, K., Tokumaru, S., Hanakawa, Y., Sayama, K., and Hashimoto, K. (2004). TNF-alpha, IL-1 alpha and IFN-alpha enhance IFN-gamma-induced fractalkine production in normal human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, **122**(3), A68-A68.
- Simonetti, O., Lucarini, G., Goteri, G., Zizzi, A., Biagini, G., Lo Muzio, L., and Offidani, A. (2006). VEGF is likely a key factor in the link between inflammation and angiogenesis in psoriasis: results of an immunohistochemical study. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **19**(4), 751-760.
- Sirsjo, A., Karlsson, M., Gidlof, A., Rollman, O., and Torma, H. (1996). Increased expression of inducible nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *Br J Dermatol*, **134**(4), 643-648.
- Skobe, M., and Detmar, M. (2000). Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Investig Dermatol Symp Proc*, **5**(1), 14-19.
- Sugaya, M., Nakamura, K., Mitsui, H., Takekoshi, T., Saeki, H., and Tamaki, K. (2003). Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1. *J Dermatol Sci*, **31**(3), 179-187.
- Sur, R., Nigam, A., Grote, D., Liebel, F., and Southall, M. D. (2008). Avenanthramides, polyphenols from oats, exhibit anti-inflammatory and anti-itch activity. *Arch Dermatol Res*, **300**(10), 569-574.

- Takematsu, H., and Tagami, H. (1993). Mode of release of interleukin-8 from proliferating human epidermal keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol*, **2**(3), 121-124.
- Trompezinski, S., Denis, A., Schmitt, D., and Viac, J. (2003). Comparative effects of polyphenols from green tea (EGCG) and soybean (genistein) on VEGF and IL-8 release from normal human keratinocytes stimulated with the proinflammatory cytokine TNFalpha. *Arch Dermatol Res*, **295**(3), 112-116.
- Ulanova, M., Marcet-Palacios, M., Munoz, S., Asfaha, S., Kim, M. K., Schreiber, A. D., and Befus, A. D. (2006). Involvement of Syk kinase in TNF-induced nitric oxide production by airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**(2), 431-437.
- Uyemura, K., Yamamura, M., Fivenson, D. F., Modlin, R. L., and Nickoloff, B. J. (1993). The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol*, **101**(5), 701-705.
- Veale, D., Rogers, S., and Fitzgerald, O. (1995). Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin. *Br J Dermatol*, **132**(1), 32-38.
- Verhoog, N. J., Du Toit, A., Avenant, C., and Hapgood, J. P. (2011). Glucocorticoid-independent repression of tumor necrosis factor (TNF) alpha-stimulated interleukin (IL)-6 expression by the glucocorticoid receptor: a potential mechanism for protection against an excessive inflammatory response. *J Biol Chem*, **286**(22), 19297-19310.
- Wang, H., Syrovets, T., Kess, D., Buchele, B., Hainzl, H., Lunov, O., Weiss, J. M., Scharffetter-Kochanek, K., and Simmet, T. (2009). Targeting NF-kappa B with a natural triterpenoid alleviates skin inflammation in a mouse model of psoriasis. *J Immunol*, **183**(7), 4755-4763.
- Weller, R., and Ormerod, A. (1997). Increased expression of inducible nitric oxide (NO) synthase. *Br J Dermatol*, **136**(1), 136-137.
- Xia, Y. P., Li, B., Hylton, D., Detmar, M., Yancopoulos, G. D., and Rudge, J. S. (2003). Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood*, **102**(1), 161-168.
- Yamaoka, J., Sasaki, M., and Miyachi, Y. (2000). Ultraviolet B radiation downregulates inducible nitric oxide synthase expression induced by interferon-gamma or tumor necrosis factor-alpha in murine keratinocyte Pam 212 cells. *Arch Dermatol Res*, **292**(6), 312-319.
- Young, C. N., Koepke, J. I., Terlecky, L. J., Borkin, M. S., Boyd Savoy, L., and Terlecky, S. R. (2008). Reactive oxygen species in tumor necrosis factor-alpha-activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol*, **128**(11), 2606-2614.

- Zaba, L. C., Suarez-Farinas, M., Fuentes-Duculan, J., Nograles, K. E., Guttman-Yassky, E., Cardinale, I., Lowes, M. A., and Krueger, J. G. (2009). Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. *J Allergy Clin Immunol*, **124**(5), 1022-1010 e1021-1395.
- Zhang, M., Zhu, L., Feng, Y., Yang, Y., Liu, L., and Ran, Y. (2008). Effects of acitretin on proliferative inhibition and RANTES production of HaCaT cells. *Arch Dermatol Res*, **300**(10), 575-581.



## **Chapitre 5. Discussion et Conclusions**

## 5.1 Discussion

Pendant des siècles, les médicaments étaient entièrement d'origine naturelle et ils étaient composés de plantes, de produits animaux et de matériaux inorganiques. Des études cliniques et pharmacologiques des médicaments d'origine naturelle utilisés traditionnellement ont fourni les bases pour le développement de nouveaux médicaments, plusieurs d'entre eux sont actuellement connus, tels l'aspirine, la digitoxine, la morphine, la quinine et la pilocarpine (Grabley and Thiericke, 2000). Une analyse des nouveaux médicaments mis sur le marché durant la période 1981-2006 présentée selon les sources et toutes pathologies confondues (Newman and Cragg, 2007) a permis de constater le rôle que les produits naturels ont joué et continuent de jouer dans le développement de nouveaux médicaments. Ainsi, 52% des nouveaux produits approuvés par les organismes réglementaires au cours de cette période ont eu un lien structural avec les produits naturels ou ont été inspirés de ceux-ci, ce qui représente un pourcentage non négligeable (Newman and Cragg, 2007).

En effet, les molécules d'origine naturelle possèdent des caractéristiques qui en font des candidats privilégiés en tant que source de nouveaux médicaments (Newman *et al.*, 2003). Elles possèdent un nombre plus important de centres chiraux et une complexité stérique supérieure comparativement à ceux des produits synthétiques (Feher and Schmid, 2003 ; Henkel *et al.*, 1999). De plus, elles ont généralement des poids moléculaires plus élevés (Lee and Schneider, 2001) et possèdent une plus grande variété de structures chimiques comparativement aux molécules synthétiques (Feher and Schmidt, 2003 ; Lee and Schneider, 2001). En raison de leur grande taille et de la diversité de leurs structures, les composés naturels peuvent se lier à la surface des protéines et moduler les interactions protéine-protéine (Koehn and Carter, 2005), impliquant l'interaction sur une grande surface (Nicolau *et al.*, 2000). Cette caractéristique leur confère un avantage comme source de nouveaux médicaments comparativement aux produits synthétiques lesquels généralement possèdent une taille plus petite et des structures plus homogènes (Constatino and Barlocco, 2006).

Des résultats précédemment obtenus par notre équipe de recherche ont permis de constater que dans les extraits polaires d'écorces d'essences canadiennes, considérés comme des résidus de l'industrie de transformation du bois, il existe des molécules polyphénoliques ayant des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Diouf *et al.*, 2009; Royer *et al.*, 2011), pouvant être utilisées pour le traitement du psoriasis.

Dans le travail présenté dans cette thèse, on a spécifiquement ciblé l'étude d'extraits riches en polyphénols en raison de la capacité des ces composés à agir via plusieurs mécanismes, ce qui permettrait leur utilisation potentielle en tant qu'agents antioxydants, anti-inflammatoires et antiprolifératifs pour le traitement des maladies multicausales comme le psoriasis. Afin d'atteindre notre objectif général on a suivi une démarche expérimentale pluridisciplinaire qui nous a permis de: a) identifier un extrait brut prometteur parmi plusieurs extraits obtenus à partir d'écorces d'essences industrielles canadiennes; b) purifier cet extrait et caractériser l'extrait purifié obtenu; et enfin c) déterminer l'activité pharmacologique de l'extrait purifié au sein de la voie NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$ , qui est impliquée dans la pathogenèse du psoriasis.

En effet, la multidisciplinarité qui caractérise cette recherche, a permis de faire coexister deux disciplines scientifiques à l'intérieur d'un même travail, à savoir la physico-chimie des substances naturelles et la pharmacologie. Cette approche a l'avantage d'intégrer le savoir propre à ces disciplines afin de répondre à différentes questions qui sont nécessaires lors du développement de nouveaux produits naturels antipsoriasiques.

### 5.1.1 Identification de l'extrait brut polyphénolique le plus prometteur

À partir des années 2000, plusieurs études ont confirmé l'existence de dérèglements quant aux mécanismes de protection antioxydants dans la peau, les érythrocytes et le plasma d'individus atteints de psoriasis (Baz *et al.*, 2003; Yildirim *et al.*, 2003; Utas *et al.*, 2002). Dans le contexte du psoriasis, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (radical hydroxyle et peroxyde, peroxyde d'hydrogène, anion superoxyde) et celles de l'azote (monoxyde d'azote) sont fondamentalement produites par les kératinocytes et les leucocytes (Pelle *et al.*, 2005). En effet, les neutrophiles, qui sont présents au sein des lésions psoriasiques, semblent agir en tant que source de fer, via le relargage de la lactoferrine, une protéine

majeure retrouvée à l'intérieur de leurs granules. L'augmentation de la concentration de fer à l'intérieur de la peau psoriasique favorise la réaction de Fenton, aboutissant à la formation du radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Rocha-Pereira *et al.*, 2004). Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), quant à eux, peuvent être générés sous l'action de la xanthine oxydase, une enzyme qui présente des niveaux d'activité élevés au sein des plaques (Kizaki *et al.*, 1977). De plus, le  $\text{TNF-}\alpha$  semble également contribuer à la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le psoriasis (Young *et al.*, 2008). Des niveaux accrus de monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ) ont été déterminés dans les lésions de patients atteints (Ormerod *et al.*, 1998). La peau psoriasique est également caractérisée par une augmentation du contenu en dialdéhyde malonique démontrant ainsi un état avancé de peroxydation lipidique (Yildirim *et al.*, 2003; Utas *et al.*, 2002). La peroxydation lipidique désigne l'attaque oxydante au niveau des lipides des membranes cellulaires (Schön and Boehncke, 2005), qui aboutit à la formation de nouveaux radicaux, dont le radical peroxyde ( $\text{ROO}^\bullet$ ).

En sachant que le psoriasis se caractérise par un déséquilibre des mécanismes de protection antioxydants, dans cette première étude on a tout d'abord analysé les propriétés antioxydantes d'extraits bruts, riches en polyphénols, issus d'écorces de plusieurs essences canadiennes en les comparant à celles de l'extrait commercial Oligopin<sup>®</sup>, un antioxydant naturel reconnu, obtenu à partir d'écorces du pin maritime français (*Pinus pinaster*). Pour ce faire, les écorces de quatre essences canadiennes ont été sélectionnées, à savoir le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*), le sapin baumier (*Abies balsamea*), le pin gris (*Pinus banksiana*) et l'épinette noire (*Picea mariana*). Ces essences ont été choisies en tenant compte de leur importance pour l'industrie forestière du Québec et de l'existence de données ethnopharmacologiques concernant leur utilisation traditionnelle par les Amérindiens dans le traitement d'affections cutanées.

Les extraits bruts étudiés ont été obtenus en utilisant deux protocoles d'extraction, soit la macération utilisant un mélange éthanol/eau (90:10 v:v) et l'extraction à l'eau chaude. Ces deux méthodes ont été choisies dans le but d'obtenir des extraits ayant un profil différent en composés polyphénoliques. Les taux en polyphénols totaux, flavonoïdes, acides phénoliques et proanthocyanidines dans les extraits bruts ont été déterminés à l'aide des méthodes spectrophotométriques.

Les résultats obtenus montrent que les extraits polyphénoliques ont répondu d'une manière différente face aux différents espèces réactives de l'oxygène et de l'azote analysées ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ), ce qui peut être expliqué par les différences relatives quant à leur composition chimique. En effet, les résultats obtenus ont démontré que la capacité des extraits à piéger le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et le  $\text{O}_2^{\bullet-}$  était principalement corrélée avec la teneur en polyphénols totaux dans les extraits ce qui suggère que l'effet antioxydant envers ces ERO serait due à une synergie des polyphénols présents au sein des extraits analysés (Kumar *et al.*, 2005; D'Angelo *et al.*, 2009). De plus, il semblerait que le contenu en acides hydroxycinnamiques dans les extraits avait une influence sur leur capacité à piéger les radicaux  $\text{OH}^\bullet$  et  $\text{ROO}^\bullet$  (Ohsugi *et al.*, 1999). Toutefois, aucune corrélation n'a été trouvée entre la capacité des extraits à piéger le  $\text{NO}^\bullet$  et les différentes classes de polyphénols analysées, ce qui pourrait s'expliquer par la présence, dans les extraits étudiés, d'autres types de polyphénols non analysés dans cette étude (lignanes, néolignanes et stilbènes).

Globalement, les résultats obtenus ont démontré que l'extrait brut de bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*) a été l'extrait le plus antioxydant parmi les extraits obtenus par macération, tandis que celui produit à partir d'écorces de l'épinette noire (*Picea mariana*) a montré la capacité antioxydante la plus importante parmi les extraits obtenus par extraction à l'eau chaude ( $p < 0,05$ ). De ce fait, ces extraits et l'Oligopin<sup>®</sup> ont été retenus pour la suite des expériences.

Les extraits naturels peuvent contenir des composés chimiques pouvant être toxiques pour les cellules de la peau (Saed and Sabir, 2003). En considérant qu'un candidat thérapeutique efficace pour le traitement du psoriasis doit démontrer une faible toxicité à des concentrations pharmacologiques (Pol *et al.*, 2003), les propriétés toxiques des extraits antioxydants les plus efficaces et celles de l'Oligopin<sup>®</sup> ont été évaluées. Pour ce faire, la méthode du MTT et le test d'exclusion du bleu trypan ont été utilisés et la concentration minimale toxique ( $\text{IC}_{90}$ ) des extraits les plus antioxydants sur les kératinocytes normaux après 24 et 48 h d'exposition a été déterminée (Teepe *et al.*, 1993). On a choisi d'utiliser les kératinocytes normaux en culture comme modèle *in vitro* pour l'étude de la toxicité des extraits retenus, en considérant que des études antérieures avaient montré une bonne

capacité de ce modèle à prédire l'action des agents toxiques irritants sur la peau (Körting *et al.*, 1994; Wilhelm *et al.*, 2001; Benassi *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus ont démontré que l'extrait brut d'épinette noire obtenu par extraction à l'eau chaude a présenté une plus faible toxicité initiale après 24 et 48 h d'exposition par la méthode de MTT comparativement aux autres extraits analysés. Après 24 h, cet extrait a également démontré une moindre toxicité par le test d'exclusion du bleu trypan, tandis qu'après 48 h c'était l'Oligopin<sup>®</sup> qui devenait l'extrait le moins toxique. La toxicité après 24 h d'exposition par les deux méthodes utilisées a généralement été corrélée avec la teneur en acides phénoliques et en proanthocyanidines dans les extraits, tandis qu'après 48 h, aucune corrélation n'a été trouvée entre la toxicité initiale et les différentes classes de polyphénols déterminées dans les extraits par le test d'exclusion du bleu trypan.

En sachant que le psoriasis se caractérise par l'hyperprolifération des kératinocytes, on a finalement testé l'influence de ces mêmes extraits, à des concentrations inférieures à la dose minimale toxique, sur la croissance des kératinocytes normaux et psoriasiques (lésionnels et non lésionnels). L'évaluation de l'effet antiprolifératif des extraits sur ces trois types de kératinocytes en culture, a permis de vérifier si ces extraits pouvaient agir sélectivement sur les kératinocytes psoriasiques lésionnels, comme c'était le cas pour certains traitements antipsoriasiques, tels le propionate de clobétasol (Priestley *et al.*, 1983). Les résultats ont montré que l'effet antiprolifératif des extraits évalués n'a pas été sélectif pour les kératinocytes psoriasiques lésionnels.

L'extrait brut de bouleau jaune ( $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a inhibé la croissance des kératinocytes normaux, tandis que celui obtenu à partir d'écorces de l'épinette noire a montré un effet antiprolifératif significatif ( $110 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sur les kératinocytes normaux et psoriasiques non lésionnels. L'Oligopin<sup>®</sup>, quant à lui, a montré un effet antiprolifératif significatif sur les trois types de kératinocytes fondamentalement à la concentration maximale utilisée ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Les différences entre l'activité antiproliférative de l'extrait brut de l'épinette noire et celle de l'Oligopin<sup>®</sup> ont été expliquées en tenant compte de la composition chimique différente de ces deux extraits. En effet, l'extrait brut de l'épinette noire obtenu par extraction à l'eau chaude est représenté par un mélange complexe de différents composés hydrophyliques non sélectivement extraits dans l'eau à des températures élevées.

Par conséquent, il peut contenir une quantité plus importante de polysaccharides que l'Oligopin<sup>®</sup>, lequel représente la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle, purifié à partir de l'extrait brut aqueux de l'écorce du pin maritime français (Masquelier, 1987). Deters *et al.* ont démontré que la fraction enrichie en polysaccharides, obtenue à partir de l'extrait de l'écorce de *Hamamelis virginiana* n'a pas eu d'influence sur la prolifération des kératinocytes (Deters *et al.*, 2001). De ce fait, on a émis comme hypothèse que la présence de polysaccharides et d'autres molécules hydrosolubles inactives dans l'extrait brut de l'épinette noire obtenu par extraction à l'eau chaude, pourrait être en relation avec l'absence d'activité antiproliférative de cet extrait sur les kératinocytes psoriasiques lésionnels. Par conséquent, la purification de cet extrait semblait nécessaire dans le but de concentrer le mélange polyphénolique et de renforcer son activité biologique sur ces cellules. En effet, une étude *in vitro* effectuée sur des macrophages RAW 264.5 a démontré que la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle obtenue à partir de cet extrait a présenté des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires supérieures à celles retrouvées dans l'extrait brut de départ (Diouf *et al.*, 2009).

Du fait que l'extrait brut d'épinette noire obtenu par extraction à l'eau chaude ait présenté une teneur élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes, tout en montrant une plus faible toxicité sur les kératinocytes normaux humains ainsi qu'une adéquate réactivité chimique vers différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote comparativement aux autres extraits étudiés, ce dernier a été considéré comme étant l'extrait brut le plus prometteur obtenu à partir d'écorces d'essences canadiennes. Toutefois nos résultats ont également suggéré qu'il était nécessaire d'effectuer la purification de cet extrait afin d'améliorer ses propriétés biologiques.

### 5.1.2 Purification de l'extrait brut le plus prometteur et détermination de la structure moléculaire des composés majoritaires présents dans l'extrait purifié

L'utilisation d'extraits polyphénoliques dans la formulation de produits de santé naturels exige l'identification des molécules qui les constituent, ce qui est d'une grande importance pour la normalisation et le contrôle de la qualité des extraits naturels (Santé Canada, 2004).

Étonnamment très peu de la biodiversité mondiale a été analysé phytochimiquement. C'est ainsi que sur environ 250 000 plantes supérieures, un maximum de 15% ont été examinées phytochimiquement (Cragg and Newman, 2005). C'est le cas de l'épinette noire (*Picea mariana*), une des essences les plus importantes pour l'industrie forestière du Québec et du Canada. En effet, la revue de la littérature a permis de constater que les études concernant la caractérisation de polyphénols dans les tissus de cette essence sont insuffisantes. Par conséquent, la purification de l'extrait brut d'épinette noire obtenu par extraction à l'eau chaude et l'identification des molécules majoritaires présentes dans l'extrait purifié pourrait servir à compléter les connaissances sur la composition chimique des écorces de cette essence, en sachant qu'il existe très peu d'études à ce sujet.

En tenant compte des résultats obtenus lors de notre première étude nous nous sommes proposés, dans cette deuxième étude, d'effectuer la purification de l'extrait brut le plus prometteur à l'aide d'une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle dans le but de produire une fraction enrichie en polyphénols. Par la suite, nous avons effectué l'isolement et la quantification des molécules majoritaires contenues dans cette fraction par flash chromatographie et par chromatographie en phase liquide à haute performance. Puis, la structure moléculaire des molécules isolées a été déterminée par spectrométrie de masse (MS) et par spectroscopie de RMN.

Une analyse globale aux différentes classes de polyphénols présentes dans la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle a permis de constater que cette dernière était effectivement plus riche en polyphénols totaux que l'extrait brut de départ (503,65 vs. 404,29 équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait). De plus, cette fraction (ci-après désignée « l'extrait purifié ») a eu un contenu plus important en acides phénoliques et proanthocyanidines, mais une teneur inférieure en flavonoïdes comparativement à l'extrait brut d'épinette noire obtenu par extraction à l'eau chaude.

Au total 28 composés ont été identifiés dans l'extrait purifié, dont cinq néolignanes, sept lignanes, trois acides phénoliques, quatre flavonoïdes, un stilbène, quatre autres composés phénoliques et enfin quatre molécules non phénoliques. En effet, l'analyse chimique a démontré que la plupart de composés isolés étaient des composés phénoliques (84, 91% de la masse totale des molécules isolées). Dans l'ensemble, les cinq composés majoritaires



présents dans cet extrait ont été la cedrusine (0,89% de l'extrait purifié), suivi par l'acide 7-oxo-15-hydroxydehydroabietic (0,58% l'extrait purifié), le pinorésinol (0,56% de l'extrait purifié), le *trans*-resvératrol (0,50% de l'extrait purifié) et la mearsetine (0,49% de l'extrait purifié). Lorsque regroupés dans différentes classes de phénols, les composés prédominants retrouvés dans cette fraction ont été les néolignanes et les lignanes (3,57% de l'extrait purifié), suivis par les flavonoïdes (0,99% de l'extrait purifié).

Le pinorésinol a été le lignane majoritaire identifié dans l'extrait purifié, ce qui suggère qu'il pourrait prédominer dans l'écorce de cette essence. Ce résultat contraste avec celui obtenu par Willfor et collaborateurs en 2004, lesquels avaient identifié l'hydroxymatairésinol comme étant le plus important lignane retrouvé dans les nœuds et le bois de cœur de *Picea mariana* (Willfor *et al.*, 2004). Il est donc possible qu'une distribution différente des composés au sein des différents tissus de cette essence soit nécessaire afin d'assurer le rôle protecteur de l'écorce contre les agressions environnementales.

Cette étude a permis de démontrer pour la première fois que les écorces de l'épinette noire constituent une source nouvelle et accessible de *trans*-resvératrol, un stilbène très reconnu pour ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Kalantari and Das, 2010). En effet, les écorces de cette essence contiennent au moins 104.19  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de ce composé, dépassant la teneur de resvératrol retrouvée dans les raisins secs de la variété Thompson (40,61  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Zhao and Hall, 2008), le chocolat noir (0.4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Counet *et al.*, 2006) et les cacahuètes (0.03-0.14  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Sanders *et al.*, 2000), lesquels sont considérés des sources courantes de cette molécule. De plus, l'extrait purifié contient 502,95 mg de *trans*-resveratrol par 100 g d'extrait sec. En effet, même si cette molécule est présente dans des quantités plus faibles dans l'extrait purifié d'épinette noire comparativement à l'extrait commercial de *Polygonum cuspidatum* (19 719 mg/100 g d'extrait sec), sa teneur dépasse la quantité retrouvée dans d'autres extraits commerciaux obtenus à partir du vin rouge (337 mg/100 g d'extrait sec), de la peau du raisin rouge (60-75 mg/100 g d'extrait sec), de la peau du raisin blanc (63 mg/100 g d'extrait sec), des pépins du raisin rouge (27 mg/100 g d'extrait sec) et des pépins du raisin blanc (25 mg/100 g d'extrait sec) (Counet *et al.*, 2006). De ce fait, l'extrait purifié obtenu dans le cadre de cette recherche, peut être considéré, lui

aussi, comme une source nouvelle de trans-resvératrol. Ceci est particulièrement intéressant en considérant que ce composé possède une large gamme de propriétés biologiques pouvant contribuer aux effets biologiques globaux de l'extrait purifié d'épinette noire pour le traitement du psoriasis.

Une analyse des autres composés identifiés dans cet extrait a permis de constater que d'autres molécules majoritaires dont l'acide 7-oxo-15-hydroxydehydroabietic, le pinorésinol et la mearsetine possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Jung *et al.*, 2010; Sadasivam et Kumaresan, 2011, Kinouchi *et al.*, 2000). De plus, d'autres composés mineurs identifiés dans l'extrait purifié dont l'isolaricirésinol, le sécoisolaricirésinol, l'hydroxymatairésinol, l'acide *para*-coumarique et la taxifoline sont reconnus comme étant des molécules bioactives (Fernandez *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2009; Yesilada, 2008), pouvant donc constituer des principes actifs de cet extrait. Effectivement, les arbres sont caractérisés par une forte lignification de leurs tissus et, par conséquent, ils représentent des sources précieuses de molécules bioactives issues de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, lesquelles sont couramment retrouvées dans les fruits et les légumes, où elles semblent responsables des effets bénéfiques sur la santé de ces aliments (Stevanovic *et al.*, 2009).

D'un point de vue phytochimique cet étude a permis, pour la première fois, d'identifier les composés: pallasine, ( $\pm$ ) épitaxifoline, homovanillyl alcool, orcinol *trans*-(2S,3S) 2,3-dihydro-3-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-7-(3'-hydroxypropyl)-1,4-benzodioxine, thréo et érythro 3-methoxy-8,4'-oxynéoligna-3',4,7,9,9'-pentol, et 2-[4'-(3''-hydroxypropyl)-2-méthoxyphénoxy]-1,3-propanediol dans le genre *Picea*. Ceci pourrait être important pour l'exécution d'études chimiotaxonomiques visant à établir des rapports entre la composition chimique de cette espèce et sa classification taxonomique.

### 5.1.3 Détermination de l'effet pharmacologique de l'extrait purifié sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$ en utilisant des cellules en monocouche essentiellement psoriasiques.

Plusieurs caractéristiques peuvent être observées dans le psoriasis dont la présence d'une hyperprolifération et une différenciation anormale des kératinocytes ainsi que la présence

d'une quantité excessive de cellules inflammatoires Th-1 et Th-17 à l'intérieur des lésions (Azfar and Gelfand, 2008). Bien que plusieurs de ces facteurs semblent être impliqués dans l'apparition de cette maladie, la cause exacte n'est pas encore connue (Bowcock, 2005).

Que l'anomalie primaire soit épidermique ou lymphocytaire, le TNF- $\alpha$  est une molécule inflammatoire qui est au centre de la physiopathologie du psoriasis comme le montre l'effet antipsoriasique significatif des molécules biologiques (infliximab, etanercept et adalimumab) capables de bloquer son action (Rozieres *et al.*, 2006). L'inflammation induite par le TNF passe par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B qui fait suite à la liaison de cette cytokine avec son récepteur. La famille NF- $\kappa$ B compte plusieurs membres chez les mammifères, l'hétérodimère p50/p65 étant la forme la plus abondante retrouvée dans les cellules (Ghosh and Karin, 2002). À la suite d'une stimulation avec le TNF- $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$  serait dégradé permettant la migration de NF- $\kappa$ B vers le noyau, où il jouerait sa fonction de facteur de transcription de nombreuses protéines impliquées dans la pathogenèse du psoriasis telles l'IL-6, l'IL-8, la CX3CL1/fractalkine, l'iNOS, l'élafine, le VEGF et l'ICAM-1 (Abeyama *et al.*, 2000; Bhavsar *et al.*, 2008; Bingle *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009; Ulanova *et al.*, 2006). Ainsi, le TNF- $\alpha$ , par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, induit la sécrétion de cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance et de molécules d'adhérence cellulaire, aboutissant à l'amplification de l'inflammation au sein des lésions psoriasiques.

Bien que les médicaments anti-TNF- $\alpha$  aient démontré une remarquable efficacité thérapeutique pour le traitement du psoriasis, plusieurs réactions indésirables liées à leur utilisation ont été reportées au cours des dernières années (Chen *et al.*, 2011; Keystone *et al.*, 2011; Sfikakis *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2010). Ceci constitue une limitation importante pour le traitement du psoriasis, surtout en considérant que cette maladie est chronique et qu'elle requiert des traitements à long terme. De ce fait, il est donc impératif de continuer les recherches afin d'identifier de nouvelles molécules faiblement toxiques pouvant diminuer les effets du TNF- $\alpha$  au niveau cutané (Aggarwal *et al.*, 2006).

La revue de la littérature permet de constater qu'il existe plusieurs études ayant analysé l'action des polyphénols pour le traitement d'autres maladies auto-immunes où le TNF- $\alpha$  joue un rôle essentiel, telles l'arthrite et la maladie inflammatoire de l'intestin. Ainsi, des

polyphénols comme la curcumine peuvent induire l'apoptose et diminuer la production de la prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) au sein des fibroblastes synoviaux provenant des patients atteints d'arthrite, ce qui suggère que ce composé pourrait être utilisé pour contrôler l'hyperplasie de ces cellules (Park *et al.* 2007). La curcumine peut également supprimer l'expression des MMPs (métalloprotéases matricielles) impliquées dans la destruction du cartilage, au sein de chondrocytes stimulés avec le TNF- $\alpha$  (Liacini *et al.*, 2003). Le resvératrol quant à lui, réduit significativement l'inflammation dans un modèle animale mimant la maladie inflammatoire de l'intestin, via la diminution du pourcentage de neutrophiles au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques ainsi que la diminution des cellules T CD<sub>3</sub><sup>+</sup> exprimant le TNF- $\alpha$  et l'INF- $\gamma$  (Cui *et al.*, 2010).

Dans le cas du psoriasis, les études *in vitro* en utilisant des polyphénols sur des kératinocytes ont été effectuées sur des cellules normales ou immortalisées. Ceci limite la compréhension du rôle de ces molécules pour le traitement de cette maladie, en considérant que les kératinocytes psoriasiques ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles qui les différencient d'autres types de kératinocytes (Giustizieri *et al.*, 2001; Rozieres *et al.*, 2006).

En sachant que le TNF- $\alpha$  joue un rôle central dans la pathogenèse du psoriasis et que les études *in vitro* en utilisant les polyphénols sur les kératinocytes psoriasiques sont, au mieux de notre connaissance, inexistantes, dans cette troisième étude nous nous sommes proposés d'étudier l'effet pharmacologique de l'extrait purifié de l'épinette noire, préalablement caractérisé, sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$  en utilisant des cellules en monocouche essentiellement psoriasiques. Pour ce faire, nous avons déterminé l'action de cet extrait sur: a) l'expression d'ICAM-1; b) la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, CX3CL1/fractalkine ; c) la production de VEGF; d) la production de monoxyde d'azote ; e) la production de l'élafine et enfin f) l'activation de NF- $\kappa$ B au sein des kératinocytes psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$ . Dans plusieurs cas, les résultats ont été comparés à ceux obtenus en utilisant des kératinocytes normaux.

Au cours du psoriasis, les kératinocytes expriment fortement ICAM-1, une molécule d'adhérence qui sert de point d'ancrage pour l'adhésion des leucocytes LFA-1<sup>+</sup> aux kératinocytes (Griffiths *et al.*, 1989; Uyemura *et al.*, 1993; Veale *et al.*, 1995). Nos résultats

démontrent que les kératinocytes psoriasiques expriment plus d'ICAM-1 constitutivement et après la stimulation avec le TNF- $\alpha$  comparativement aux kératinocytes normaux (Griffiths *et al.*, 1989; Uyemura *et al.*, 1993; Veale *et al.*, 1995; Gilhar *et al.*, 1996). L'extrait purifié d'épinette noire, quant à lui, à 250 et 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a significativement inhibé cette expression au sein de deux types de kératinocytes étudiés. Nous croyons que cet effet pourrait probablement être relié à la présence de la taxifoline et du *trans*-resvératrol dans l'extrait. En effet, d'autres études ont montré que ces molécules sont capables d'inhiber l'expression d'ICAM-1 induite par le TNF- $\alpha$  dans d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales microvasculaires et les cellules endothéliales coronaires (Csiszar *et al.*, 2006; Freischmidt *et al.*, 2011).

Des études antérieures ont montré que l'IL-6 est surexprimée au sein de la peau psoriasique (Grossman *et al.*, 1989; Ohta *et al.*, 1991), où elle joue un rôle important en stimulant la prolifération des kératinocytes (Grossman *et al.*, 1989). Nos résultats montrent une hétérogénéité considérable quant à la production d'IL-6 par les kératinocytes normaux et psoriasiques en réponse au TNF- $\alpha$ . En effet, après 24 h de stimulation avec le TNF- $\alpha$ , les kératinocytes psoriasiques ont significativement augmenté la production d'IL-6 ( $816.41 \pm 242.31 \text{ pg}/10^6 \text{ cellules/mL}$ ), ce qui n'a pas été le cas pour les kératinocytes normaux où cette production n'a pas pu être constatée. L'extrait purifié d'épinette noire, particulièrement à 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a significativement inhibé la sécrétion d'IL-6 au sein des kératinocytes psoriasiques. Il est possible que la présence de quantités importantes de *trans*-resvératrol dans cet extrait puisse être en relation avec cet effet. En fait, d'autres études ont démontré que le *trans*-resvératrol est capable d'inhiber l'expression et la production d'IL-6 induites par le TNF- $\alpha$  dans différents types cellulaires (Csiszar *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2010).

Les lésions psoriasiques sont caractérisées par des modifications vasculaires en incluant la dilatation et la tortuosité des capillaires, l'angiogenèse et la formation de vénules (Lowe *et al.*, 2004). L'angiogenèse et l'hyperperméabilité vasculaires dans le psoriasis semblent être liées à une production accrue de VEGF par les kératinocytes (Simonetti *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que les kératinocytes normaux et psoriasiques secrètent des quantités comparables de VEGF en absence et en présence du TNF- $\alpha$ . On a également constaté que

ces deux types cellulaires ont présenté une réponse différente à la suite du traitement avec l'extrait purifié d'épinette noire. En effet, cet extrait aux trois concentrations testées (100, 250 et 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a significativement inhibé la sécrétion de VEGF par les kératinocytes normaux. Toutefois, lorsqu'il a été utilisé sur les kératinocytes psoriasiques à 100 et 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , aucun effet inhibiteur significatif sur le relargage du VEGF n'a été observé. De plus, on a constaté que, lorsque l'extrait purifié a été utilisé à 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , l'inhibition de la production de VEGF a été réduite de 82,21% sur les kératinocytes normaux vers 31,08% sur les kératinocytes psoriasiques. Bien que l'activation de NF- $\kappa$ B puisse contribuer à la production de cette cytokine (Abeyama *et al.*, 2000), l'expression et la production du VEGF au sein des kératinocytes pourrait également dépendre de l'activation d'autres facteurs de transcription, tels AP-1 et AP-2 (Diaz *et al.*, 2000; Gille *et al.*, 2000). Ainsi, il est donc probable que le TNF- $\alpha$  stimule la production de VEGF au sein des kératinocytes psoriasiques via l'activation de ces deux facteurs de transcription, et que cette activation ne soit pas efficacement bloquée par l'extrait purifié. Une autre explication pourrait être reliée à la présence du *trans*-resvératrol au sein de l'extrait purifié. En effet, une étude précédente a montré que ce composé n'a pas été capable d'inhiber le relargage du VEGF par les kératinocytes (Redondo *et al.*, 2000). Bien que la raison exacte de cet effet doit être élucidée, nos résultats mettent en évidence des différences quant à la capacité de l'extrait purifié d'épinette noire à inhiber la sécrétion du VEGF en fonction de l'état pathologique ou normal des kératinocytes analysés.

De par son action chimiotactique puissante sur les leucocytes, l'IL-8 est considérée comme étant une chimiokine très importante dans la pathogenèse du psoriasis (Nickoloff *et al.*, 1990; Nickoloff *et al.*, 1994). Nos résultats ont démontré que les kératinocytes psoriasiques sécrètent une quantité plus importante d'IL-8 constitutivement et après la stimulation avec le TNF- $\alpha$  comparativement aux kératinocytes normaux (Giustizieri *et al.*, 2001). L'extrait purifié, quant à lui, a significativement inhibé cette augmentation dans les deux types de kératinocytes analysés, et ce, d'une manière dose-dépendante. Nous croyons que la présence du *trans*-resvératrol dans cet extrait pourrait être en lien avec l'effet inhibiteur observé sur la production d'IL-8. En effet, Chuang *et al* ont démontré que ce composé est capable d'atténuer la production d'IL-8 par les adipocytes stimulés avec le TNF- $\alpha$  (Chuang *et al.*, 2010).

Dans cette étude nous démontrons pour la première fois que le TNF- $\alpha$  est capable d'induire l'expression génique de la fractalkine (CX3CL1) tout en augmentant la sécrétion de cette chimiokine par les kératinocytes psoriasiques. Par contre, les kératinocytes normaux n'ont pas produit de la fractalkine à la suite de leur stimulation avec le TNF- $\alpha$ , ce qui est en accord avec des études antérieures (Shirakata *et al.*, 2004; Sugaya *et al.*, 2003). Ces résultats fournissent des indices supplémentaires concernant le rôle actif du TNF- $\alpha$  dans la pathogenèse du psoriasis. Ainsi, en augmentant la synthèse de la fractalkine par les kératinocytes psoriasiques, le TNF- $\alpha$  favorise le recrutement et l'adhésion des leucocytes vers la peau tout en amplifiant l'inflammation au sein des plaques. Nos résultats démontrent également que l'extrait purifié d'épinette noire inhibe d'une manière dose-dépendante la sécrétion de la fractalkine induite par le TNF- $\alpha$ , ce qui semble être relié à ses effets inhibiteurs sur la synthèse *de novo* de cette chimiokine par les kératinocytes psoriasiques.

Dans le cadre de cette recherche, nous avons voulu vérifier si l'extrait purifié d'épinette noire pouvait avoir des effets inhibiteurs au niveau de la production de l'élafine, une protéine reliée à la différenciation aberrante retrouvée dans le psoriasis (Pfundt *et al.*, 2000). Nos résultats ont montré que cet extrait diminue d'une manière dose-dépendante la sécrétion de l'élafine autant chez les kératinocytes normaux que psoriasiques. Toutefois, aucune étude n'a été trouvée par rapport aux effets des composés majeurs présents dans l'extrait purifié sur la production de l'élafine au sein de différents types cellulaires.

Le traitement du psoriasis avec la bétamétasone, le goudron, le dithranol et le calcipotriol s'accompagne d'une réduction de la production de monoxyde d'azote (NO) dans les plaques psoriasiques (Gottlieb *et al.*, 2005; Ormerod *et al.*, 1997; Ormerod *et al.*, 1998). Effectivement, le NO, de par ses effets vasodilatateurs, joue un rôle très important au niveau de l'hyperplasie et l'érythème cutané qui caractérisent le psoriasis (Morhenn, 1997). On a voulu donc vérifier si l'extrait purifié d'épinette noire pouvait inhiber la production de monoxyde d'azote au sein des kératinocytes normaux et psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$ . Nos résultats ont démontré que le TNF- $\alpha$  est un puissant inducteur de la production de NO autant chez les kératinocytes normaux que psoriasiques, mais ces derniers en produisent plus que les kératinocytes normaux.

On montre pour la première fois que le TNF- $\alpha$  est capable d'augmenter l'expression génique de l'enzyme oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) chez les kératinocytes psoriasiques, ce qui contraste avec des études antérieures qui ont démontré que seule la combinaison du TNF- $\alpha$  avec d'autres cytokines telles l'IL-1 $\beta$  ou l'INF- $\gamma$  pouvait induire l'expression génique d'iNOS chez les kératinocytes normaux (Bruch-Gerharz *et al.*, 1996; Bruch-Gerharz *et al.*, 2003; Sirsjo *et al.*, 1996). L'extrait purifié, quant à lui, diminue significativement la production de NO par les kératinocytes normaux et psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$ . Ainsi, il semblerait que la diminution de la transcription d'iNOS par l'extrait purifié puisse être en relation avec cette diminution dans le cas des kératinocytes psoriasiques. D'autres études montrent que le pinorésinol et le *trans*-resvératrol, deux composés majeurs retrouvés dans cet extrait, ont la capacité d'inhiber la production de NO dans différents types cellulaires (Jung *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2000). Ainsi, il est donc possible que ces molécules aient un rôle à jouer dans les effets globaux de l'extrait au niveau de l'inhibition de la production de monoxyde d'azote par les kératinocytes.

Des études précédentes ont démontré que l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$  est une étape cruciale pour la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales, y compris ceux codant pour l'IL-8, l'IL-6, l'ICAM-1, le VEGF, la fractalkine, l'élafine et l'iNOS (Banno *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2008; Bhavsar *et al.*, 2008; Bingle *et al.*, 2001; Ulanova *et al.*, 2006). Considérant qu'une amélioration clinique significative du psoriasis après le traitement avec l'etanercept a été corrélée avec la diminution de l'activation de NF- $\kappa$ B au sein de l'épiderme (Lizzul *et al.*, 2005), nous avons enfin testé l'action de l'extrait purifié sur l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF- $\alpha$  dans les kératinocytes psoriasiques. Nos résultats montrent que cet extrait inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B via l'inhibition de la phosphorylation et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  ainsi que la phosphorylation de p65, trois étapes importantes impliquées dans l'activation de ce facteur de transcription. Par conséquent, nous supposons que les effets anti-inflammatoires de l'extrait purifié d'épinette noire sur les kératinocytes psoriasiques seraient principalement dus à l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B.



Globalement, les résultats présentés dans cette étude, démontrent que les kératinocytes psoriasiques répondent au TNF- $\alpha$  en augmentant significativement l'expression d'ICAM-1, la production de monoxyde d'azote et la sécrétion de l'IL-6, l'IL-8 et la fractalkine comparativement aux kératinocytes normaux. Ces résultats supportent l'hypothèse généralement acceptée qui reconnaît la contribution des kératinocytes psoriasiques dans la pathogenèse du psoriasis via leur capacité intrinsèque à réagir d'une façon exagérée face à des stimuli pro-inflammatoires, ce qui se traduit par une amplification de l'inflammation à l'intérieur des plaques psoriasiques.

De plus, cette étude démontre pour la première fois le rôle immunopharmacologique d'un extrait polyphénolique en tant qu'agent anti-TNF- $\alpha$  sur les kératinocytes psoriasiques. En fait, nous démontrons pour la première fois que l'extrait purifié d'épinette noire obtenu à partir de résidus de l'industrie forestière canadienne, fournit un moyen simple, peu coûteux et efficace de réduire l'inflammation induite par le TNF- $\alpha$  au sein des kératinocytes psoriasiques. Étant donné que très peu d'études ont été trouvées dans la littérature scientifique par rapport aux effets anti-inflammatoires des molécules présentes dans cet extrait sur la diminution des réponses induites par le TNF- $\alpha$  dans les kératinocytes, nous considérons que cette recherche pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour l'étude du rôle immunopharmacologique individuel de ces composés pour le traitement des maladies où le TNF joue un rôle essentiel, tel le psoriasis.

## 5.2 Perspectives

### 5.2.1 Étude de l'effet pharmacologique des polyphénols isolés à partir de l'extrait purifié de l'épinette noire (*Picea mariana*) sur des voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse du psoriasis

Deux méthodes sont présentement utilisées par l'industrie pharmaceutique dans la découverte de nouveaux candidats thérapeutiques à partir de produits naturels, soit les méthodes dites classiques (fractionnement bioguidé) et les méthodes à haut débit (Younes *et al.*, 2007 ; Ulrich *et al.*, 2002). Dans les deux cas, le but ultime est d'identifier un principe actif à l'état pur pouvant être utilisé pour traiter une maladie donnée. Lorsque l'utilisation du principe actif d'origine naturel est limitée par ses caractéristiques

pharmacocinétiques, de stabilité ou encore par des difficultés au niveau de sa synthèse chimique, la réalisation d'études ultérieures d'optimisation chimique peut être nécessaire (Nielsen, 2002 ; Cordier *et al.*, 2008). Dans ce cas, le principe actif devient une «tête de série» et subira des modifications chimiques permettant la création d'analogues ayant meilleures caractéristiques que la molécule de départ (Nielsen, 2002 ; Cordier *et al.*, 2008). De nos jours, un nouveau concept est donc en vogue, soit celui de la synthèse orientée vers la diversité (*diversity-oriented synthesis*) (Screiber, 2000) qui a comme objectif la préparation de collections de composés structurellement complexes et diverses, dans plusieurs cas inspirés de produits naturels existants (*natural-product-like compounds*) (Clardy and Walsh, 2004), lesquels seront utilisés en tant que « tête de séries» pour la création de nouveaux composés bioactifs (Spring, 2003; Nielsen, 2002).

En tenant compte de l'importance de l'identification de nouveaux principes actifs d'origine naturel dans la découverte de médicaments, il semble donc essentiel d'effectuer l'étude de la bioactivité des molécules individuelles présentes dans l'extrait purifié d'épinette noire en vue d'identifier de nouveaux principes actifs ayant un potentiel pour traiter le psoriasis. En effet, ces composés pourront probablement contribuer au développement de nouveaux médicaments ou à la synthèse de nouvelles molécules bioactives pour le traitement de cette maladie.

L'identification des principes actifs de l'extrait purifié d'épinette noire peut également servir à des fins de la normalisation de cet extrait. Ainsi, ces molécules peuvent contribuer à garantir que chaque lot d'extrait ait le même effet physiologique, une fois que les limites d'activité quantitatives supérieures et inférieures propres aux composés retenus soient déterminées (Santé Canada, 2004).

Étant donné que, dans le cadre de ce travail, nous avons démontré le potentiel immunopharmacologique de l'extrait purifié d'épinette noire en tant qu'agent anti-TNF- $\alpha$  pour le traitement du psoriasis, il serait donc important de déterminer la nature des molécules responsables de cette activité. Fait intéressant, très peu d'études ont été trouvées dans la littérature scientifique par rapport aux effets anti-inflammatoires des molécules présentes dans cet extrait sur la diminution des réponses induites par le TNF- $\alpha$ , ce qui ouvre des possibilités quant à l'identification de nouveaux agents anti-TNF- $\alpha$  pouvant être utilisés

pour le traitement du psoriasis. Une démarche expérimentale pour cibler de telles molécules pourrait inclure le travail avec les composés majoritaires présents dans l'extrait purifié sur plusieurs types cellulaires stimulés au TNF- $\alpha$  (kératinocytes, lymphocytes, neutrophiles). Ceci permettrait d'identifier les molécules les plus actives ayant une activité anti-TNF- $\alpha$  tout en permettant de vérifier la susceptibilité propre de ces cellules, fortement impliquées dans le psoriasis, à l'action individuelle des polyphénols présents dans l'extrait.

En tenant compte de la polyvalence quant au mécanisme d'action des polyphénols, d'autres études pourraient être effectuées afin d'établir l'action des molécules majoritaires présentes dans l'extrait purifié sur d'autres dérèglements impliqués dans le psoriasis. Notamment, l'étude de la capacité de ces composés à agir au niveau de la normalisation de la différenciation et de la prolifération des kératinocytes psoriasiques au sein des substituts psoriasiques développés par génie tissulaire pourrait élargir les possibilités d'utilisation de ces composés en tant qu'agents antiprolifératifs pour le traitement du psoriasis. De plus, l'influence des polyphénols sur d'autres voies de signalisation d'importance dans le développement de cette maladie pourrait être explorée *in vitro*, par exemple celle qui relie l'IL-22 avec l'activation du facteur de transcription STAT-3 (Sestito *et al.*, 2011). En effet, il a été récemment démontré sur des modèles animaux que l'IL-22, qui est surexprimée au sein de la peau psoriasique, serait impliquée dans l'hyperprolifération et la différenciation aberrante des kératinocytes (Zeng *et al.*, 2007) et que l'inhibition de cette cytokine et du STAT-3 conduirait à une amélioration du psoriasis (Jacobs *et al.*, 2011 ; Miyoshi *et al.*, 2011).

Une fois que les molécules les plus bioactives seront identifiées sur des modèles *in vitro*, elles pourraient être testées sur des modèles animaux ayant des ressemblances avec le psoriasis. Pour ce faire, une panoplie de modèles sont disponibles, chacun ayant ses forces et ses limitations. En lien avec les résultats obtenus dans le cadre de ce travail, le modèle de souris hypomorphique CD18 semble particulièrement intéressant. En effet, ces souris résultent de l'atténuation du gène des intégrines CD11/CD18 (Kess *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Les lésions cutanées dans ce modèle ressemblent à celles retrouvées dans le psoriasis, caractérisées par la présence d'une hyperplasie cutanée, de microabscesses, de l'érythème et d'un infiltrat inflammatoire. Des niveaux élevés du TNF- $\alpha$  ont été déterminés

à l'intérieur des lésions et une activation très importante de NF- $\kappa$ B a été constatée dans les macrophages et la peau lésionnelle chez ces souris (Wang *et al.*, 2009). Fait intéressant, une amélioration significative des lésions est constatée à la suite du traitement avec un agent anti-TNF- $\alpha$  (étanercept). Ainsi, nous croyons qu'un tel modèle pourrait permettre de tester *in vivo* l'activité anti-TNF des polyphénols identifiés dans cette étude.

À long terme, l'utilisation d'un modèle de xénotransplantation pourrait s'avérer une bonne alternative afin de continuer l'étude de l'action des polyphénols issus de l'extrait purifié en tant qu'agents antipsoriasiques. La xénotransplantation consiste à greffer sur une souris génétiquement immunodéprimée un morceau de peau provenant d'un patient atteint de psoriasis. Ce modèle est présentement très utilisé par l'industrie pharmaceutique pour tester l'efficacité clinique des nouveaux produits antipsoriasiques de par sa capacité à montrer une bonne concordance avec les résultats obtenus lors des études cliniques (Petersen, 2006). Enfin, la réalisation des études cliniques permettrait d'établir l'impact de l'utilisation des polyphénols présents dans l'extrait purifié pour le traitement du psoriasis.

5.2.2 Étude de la pénétration cutanée de l'extrait purifié et des polyphénols isolés sur des substituts cutanés sains et psoriasiques préparés par génie tissulaire, le comparant à celle obtenue sur la peau normale humaine et la peau psoriasique native.

La possibilité pour les polyphénols de faire partie de nouvelles formulations topiques antipsoriasiques dépend de leur efficacité clinique, mais également de leur capacité à pénétrer l'épiderme (Korkina *et al.*, 2008). Le passage des polyphénols à travers la peau doit être un paramètre voulu afin de permettre leur interaction avec les voies de signalisation impliquées dans le psoriasis, leurs permettant ainsi d'exercer l'action pharmacologique souhaitée. De nos jours, l'évaluation de la pénétration cutanée des polyphénols se réalise fondamentalement sur la peau normale humaine ou sur la peau animale (Ma *et al.*, 2007; Sarikaki *et al.*, 2005), ce qui n'est pas bien adapté à la situation réelle de la peau psoriasique caractérisée par une réduction de la barrière cutanée. Effectivement, la peau psoriasique lésionnelle est environ deux fois plus perméable à l'eau que la peau normale et cette perméabilité est également augmentée vis-à-vis d'autres molécules (Oestmann *et al.*, 1993).

Grâce aux études effectuées au sein de notre groupe de recherche, on dispose aujourd'hui de substituts cutanés psoriasiques, fabriqués par génie tissulaire, capables de maintenir, pendant un certain temps, le phénotype psoriasique tout en facilitant les études d'absorption percutanée (Jean *et al.*, 2009). De ce fait, nous croyons que l'étude du passage des polyphénols contenus dans l'extrait purifié à travers des substituts normaux et psoriasiques ainsi que sur la peau normale humaine et la peau psoriasique native, est une étape essentielle pour le développement de nouvelles formulations topiques destinées à traiter le psoriasis.

Effectivement, l'étude de la pharmacocinétique cutanée des polyphénols au sein de la peau pathologique est très importante, car elle permettra de décrire en fonction du temps, le pourcentage respectif des constituants du mélange polyphénolique ayant traversé les différents types de peaux. La détermination des paramètres pharmacocinétiques reliés à la pénétration cutanée des polyphénols tels, le flux percutané, la constante de perméabilité et le temps de latence permettront de mieux concevoir des nouvelles formulations antipsoriasiques tout en améliorant leur stabilité, leur sécurité et leur efficacité thérapeutique.

### 5.2.3 Analyses de la stabilité de l'extrait purifié

L'instabilité chimique de certains polyphénols est un des inconvénients qui pourrait limiter leur utilisation au sein de nouvelles formulations antipsoriasiques. En effet, des polyphénols comme l'acide gallique et la catéchine subissent des autooxydations pouvant être initiés par différents types d'ions présents dans leur environnement proche, tels le fer et le cuivre (Nkhili, 2009). Sous certaines conditions, les tannins ont la capacité de s'agréger en particules colloïdales, lesquelles sont susceptibles d'être déstabilisées par les protéines (Riou *et al.*, 2002). De plus, les polyphénols sont généralement reconnus comme des molécules photosensibles (Munin and Edwards-Levy, 2011).

De ce fait, il devient donc nécessaire de déterminer la stabilité de l'extrait purifié dans le but de mieux connaître son aptitude à conserver ses propriétés physico-chimiques et biopharmaceutiques totales pendant la durée de validité de son utilisation. Pour ce faire, des études de vieillissement accéléré et en temps réel peuvent être exécutées. En effet, ces

essais ont pour but de fournir des données probantes sur la façon dont la qualité de l'extrait varie en fonction du temps sous l'effet de divers facteurs environnementaux comme la température, l'humidité et la lumière permettant ainsi de définir ses conditions de conservation et sa durée de validité (Santé Canada, 2004).

Étant donné que, dans le cadre de ce travail, nous avons déterminé la nature des molécules majoritaires présentes dans l'extrait purifié d'épinette noire et que certaines d'entre elles pourraient devenir des « biomarqueurs » de cet extrait, il serait donc important de suivre la stabilité de l'extrait en suivant celle des « biomarqueurs » (Santé Canada, 2004). Une telle approche permettrait de: a) identifier les produits de dégradation les plus fréquemment retrouvés; b) établir une cinétique d'apparition de ces produits de dégradation; c) prévenir certaines incompatibilités qui pourraient survenir lors de l'utilisation de l'extrait au sein des nouvelles formulations; d) orienter le choix des méthodes qui doivent être utilisées pour évaluer la stabilité des nouvelles formulations; e) déterminer les conditions les plus appropriées de conservation; et enfin f) déterminer la durée de validité de l'extrait.

### **5.3 Conclusions**

Les polyphénols, métabolites presque exclusivement d'origine végétale, sont aujourd'hui reconnus pour leur propriétés antioxydantes, antiprolifératives et anti-inflammatoires. De ce fait, ils ont été particulièrement étudiés pour le traitement de maladies comme le cancer et les maladies cardiovasculaires. Toutefois, les études *in vitro* concernant l'action pharmacologique des polyphénols naturels sur des voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse du psoriasis, sont insuffisantes. Ceci limite notre compréhension sur le rôle que ces molécules pourraient avoir pour traiter cette maladie.

En sachant que les polyphénols sont des molécules multifonctionnelles qui pourraient être utilisées pour le traitement de maladies pluricausales comme le psoriasis, nous avons donc voulu vérifier l'effet pharmacologique d'extraits polyphénoliques issus d'écorces d'essences canadiennes en vue d'une utilisation possible pour le traitement du psoriasis.

Pourquoi s'intéresser à l'étude d'extraits naturels issus d'écorces ? L'écorce est considérée comme un sous-produit de la production de bois de sciage, de panneaux agglomérés et dans

certains cas des pâtes et papiers. Au Québec 2830 tma d'écorces sont produites par année, lesquelles ont pour l'instant que des débouchés limités (principalement la combustion pour la production d'énergie). Il demeure donc pertinent de chercher des utilisations alternatives de l'écorce permettant de valoriser davantage cette ressource. La valorisation de l'écorce par l'identification des nouveaux composés bioactifs représente une avenue intéressante afin d'accéder à de nouveaux marchés reliés au développement de produits naturels et/ou médicaments.

Afin d'atteindre notre objectif général, nous avons donc décidé de suivre une démarche expérimentale multidisciplinaire nous permettant de: a) choisir un extrait brut prometteur parmi plusieurs extraits polyphénoliques issus d'écorces d'essences forestières canadiennes; b) effectuer la purification de cet extrait brut et déterminer la structure moléculaire des composés majoritaires contenus dans l'extrait purifié ; c) déterminer l'effet pharmacologique de l'extrait purifié sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associé au TNF- $\alpha$ .

La première étude, présentée dans le cadre de cette thèse, a permis de démontrer pour la première fois les effets toxiques et antiprolifératifs d'extraits polyphénoliques issus d'écorces d'essences canadiennes en utilisant des kératinocytes normaux et psoriasiques. En effet, bien que les écorces et les résines d'espèces canadiennes telles que l'épinette noire, le sapin baumier, le bouleau jaune et le pin gris avaient déjà été utilisées par les Amérindiens pour le traitement d'affections cutanées, leurs extraits n'avaient jamais été testés sur les cellules de la peau.

Les résultats de cette étude ont permis d'identifier l'extrait aqueux issu de l'écorce de l'épinette noire (*Picea mariana*) comme étant l'extrait brut le plus prometteur obtenu à partir d'écorces d'essences canadiennes. En effet, il a été choisi en tenant compte de sa teneur élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes, de sa faible toxicité sur les kératinocytes normaux humains ainsi que de sa réactivité chimique envers différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Toutefois nos résultats ont également suggéré qu'il était nécessaire d'effectuer sa purification afin d'améliorer ses propriétés biologiques.

En tenant compte des résultats obtenus lors de notre première étude, nous nous sommes proposés, dans la deuxième étude, d'effectuer la purification de l'extrait brut aqueux issu de

l'écorce de l'épinette noire ainsi que de caractériser les molécules majoritaires contenues dans l'extrait purifié. Au total 28 composés ont été identifiés dans l'extrait purifié, dont cinq néolignanes, sept lignanes, trois acides phénoliques, quatre flavonoïdes, un stilbène, quatre autres composés phénoliques et enfin quatre molécules non phénoliques. Au mieux de notre connaissance, cette étude constitue le premier rapport exhaustif répertoriant les polyphénols contenus dans l'écorce de *Picea mariana*.

On a démontré que la plupart de composés isolés à partir de l'extrait purifié sont effectivement des composés phénoliques (84,91% de la masse totale des molécules isolées). On a également constaté que les composés majoritairement retrouvés dans cet extrait sont des néolignanes et des lignanes (3,57% de l'extrait purifié), suivis par des flavonoïdes (0,99% de l'extrait purifié). De plus, il a été possible de démontrer que les écorces de l'épinette noire et l'extrait purifié, lui-même, constituent une source nouvelle et accessible de *trans*-resvératrol, un stilbène reconnu pour ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. De même, nos résultats ont révélé que cet extrait contient d'autres molécules bioactives telles le pinorésinol, la mearsetine, l'isolaricirésinol, le sécoisolaricirésinol, l'hydroxymatairésinol, l'acide *para*-coumarique et la taxifoline, qui pourraient contribuer à l'action anti-inflammatoire globale de cet extrait.

L'isolement des composés contenus dans l'extrait purifié d'épinette noire constitue une tâche ardue, surtout en considérant le grand nombre d'isomères et l'importante diversité chimique qui caractérisent les écorces de cette essence. De ce fait, nous croyons que les méthodes de purification utilisées dans cette étude pourraient être utilisées pour l'obtention de quantités suffisantes de composés purs afin d'étudier leur potentiel thérapeutique pour le développement de nouvelles thérapies antipsoriasiques.

Lors de la troisième étude présentée dans le cadre de cette thèse, nous avons souhaité vérifier l'action pharmacologique de l'extrait purifié d'épinette noire, préalablement caractérisé, sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B associée au TNF- $\alpha$  en utilisant des kératinocytes psoriasiques. On a constaté que cet extrait a la capacité d'inhiber : a) l'expression d'ICAM-1; b) la production de l'IL-6, l'IL-8 et de la fractalkine; c) la production de VEGF; d) la production de monoxyde d'azote; et enfin e) la production de



l'élafine au sein des kératinocytes normaux et psoriasiques stimulés avec le TNF- $\alpha$ , et ce, à des concentrations qui n'ont pas affectée la viabilité des cellules.

En sachant que l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$  est une étape cruciale pour la régulation de l'expression de gènes codant pour l'IL-8, l'IL-6, l'ICAM-1, le VEGF, la fractalkine, l'élafine et l'iNOS, nous avons enfin testé l'action de l'extrait purifié sur l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF- $\alpha$  au sein des kératinocytes psoriasiques. On a constaté que cet extrait inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B via l'inhibition de la phosphorylation et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  ainsi que la phosphorylation de p65, trois étapes importantes impliquées dans l'activation de ce facteur de transcription. Par conséquent, on a supposé que les effets anti-inflammatoires de l'extrait purifié d'épinette noire sur les kératinocytes psoriasiques à la suite de la stimulation avec le TNF- $\alpha$ , seraient principalement dus à l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B.

En général, les résultats présentés dans cette troisième étude, montrent que les kératinocytes psoriasiques répondent au TNF- $\alpha$  en augmentant significativement l'expression d'ICAM-1, la production de monoxyde d'azote et la sécrétion de l'IL-6, l'IL-8 et la fractalkine comparativement aux kératinocytes normaux. Fait intéressant, nous démontrons pour la première fois que le TNF- $\alpha$  est capable d'induire l'expression génique de la fractalkine (CX3CL1) et de l'enzyme oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) chez les kératinocytes psoriasiques, ce qui contraste avec des études antérieures qui ont démontré que seule la combinaison du TNF- $\alpha$  avec d'autres cytokines pouvait induire cette expression chez les kératinocytes normaux. Ainsi, nous croyons que ces résultats fournissent des indices supplémentaires concernant le rôle actif du TNF- $\alpha$  dans la pathogenèse du psoriasis et supportent l'hypothèse généralement acceptée qui reconnaît la contribution des kératinocytes psoriasiques dans la pathogenèse du psoriasis via leur capacité intrinsèque à réagir d'une façon exagérée face à des stimuli pro-inflammatoires.

Par ailleurs, cette étude démontre que l'extrait purifié d'épinette noire obtenu à partir de résidus de l'industrie forestière canadienne, fournit un moyen simple, peu coûteux et efficace de réduire l'inflammation induite par le TNF- $\alpha$  au sein des kératinocytes psoriasiques. Étant donné que très peu d'études ont été trouvées dans la littérature scientifique par rapport aux effets anti-inflammatoires des molécules présentes dans

l'extrait purifié sur la diminution des réponses induites par le TNF- $\alpha$  dans les kératinocytes, nous considérons que cette recherche pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour l'étude du rôle immunopharmacologique individuel de ces composés pour le traitement du psoriasis. Effectivement, ce contexte nous permet d'envisager d'autres travaux à réaliser dans les prochaines années.

En perspective, la recherche présentée dans cette thèse pourra possiblement contribuer au développement de nouvelles thérapies antipsoriasiques sous forme de médicaments ou de produits de santé naturels efficaces et rigoureusement caractérisés, ce qui pourrait avoir des répercussions importants sur la qualité de vie et la santé des patients atteints de psoriasis.

## Bibliographie

- Abe, Y., Hashimoto, S., and Horie, T. (1999). Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, **39**(1), 41-47.
- Abeyama, K., Eng, W., Jester, J. V., Vink, A. A., Edelbaum, D., Cockerell, C. J., Bergstresser, P. R., and Takashima, A. (2000). A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. *J Clin Invest*, **105**(12), 1751-1759.
- Abla, J.M., and Banga, A.K. (2012). Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity. *International Journal of Cosmetic Science*, 1-8
- Abrams, J. N., Zhao, Q., Ghiviriga, I., and Minaruzzaman. (2012). Palladium(II)-catalyzed enyne cyclization strategies toward the podophyllotoxin ring system. *Tetrahedron*, **68**(2), 423-428.
- Aehle, E., Muller, U., Eklund, P. C., Willfor, S. M., Sippl, W., and Drager, B. (2011). Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity. *Phytochemistry*, **72**(18), 2396-2405.
- Afaq, F., and Katiyar, S. K. (2011). Polyphenols: Skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **11**(14), 1200-1215.
- Aggarwal, B. B., and Shishodia, S. (2004). Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1030**, 434-441.
- Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Takada, Y., Jackson-Bernitsas, D., Ahn, K. S., Sethi, G., and Ichikawa, H. (2006). TNF blockade: an inflammatory issue. *Ernst Schering Research Foundation workshop*(56), 161-186.
- Al-Bandak, G., and Oreopoulou, V. (2007). Antioxidant properties and composition of *Majorana syriaca* extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**(3), 247-255.
- Ali, S. M., Brodell, R. T., Balkrishnan, R., and Feldman, S. R. (2007). Poor adherence to treatments: a fundamental principle of dermatology. *Archives of dermatology*, **143**(7), 912-915.
- Alibardi, L. (2001). Keratinization in the epidermis of amphibians and the lungfish: comparison with amniote keratinization. *Tissue & cell*, **33**(5), 439-449.
- Alkemade, H. A., van Vlijmen-Willems, I. M., van Haelst, U. J., van de Kerkhof, P. C., and Schalkwijk, J. (1994). Demonstration of skin-derived antileukoprotease (SKALP)

- and its target enzyme human leukocyte elastase in squamous cell carcinoma. *The Journal of pathology*, **174**(2), 121-129.
- Altobelli, E., Marziliano, C., Fagnoli, M. C., Petrocelli, R., Maccarone, M., Chimenti, S., and Peris, K. (2011). Current psoriasis treatments in an Italian population and their association with socio-demographical and clinical features. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*.
- Ammon, H. P. T., and Wahl, M. A. (1991). Pharmacology of Curcuma-Longa. *Planta medica*, **57**(1), 1-7.
- Anderegg, R. J., and Rowe, J. W. (1974). Lignans, major component of resin from Araucaria-angustifolia knots. *Holzforschung*, **28**(5), 171-175.
- Anderson, J. A., Knott, A. W., Wilson, M. A., Garrison, R. N., Sims, D. E., and Edwards, M. J. (1995). The effect of soluble tumor necrosis factor receptor-II on endotoxin-mediated hemodynamic instability. *The Journal of surgical research*, **58**(1), 53-57.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., and Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst*, **125**(5), 989-1009.
- Araujo, R., Fernandes, M., Cavaco-Paulo, A., and Gomes, A. (2011). Biology of human hair: know your hair to control it. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, **125**, 121-143.
- Arin, M. J., and Mueller, F. B. (2007). Keratins and their associated skin disorders. *European journal of dermatology : EJD*, **17**(2), 123-129.
- Arnason, T., Hebda, R. J., and Johns, T. (1981). Use of Plants for Food and Medicine by Native Peoples of Eastern Canada. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, **59**(11), 2189-2325.
- Aron, P. M., and Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular nutrition & food research*, **52**(1), 79-104.
- Asarch, A., Barak, O., Loo, D. S., and Gottlieb, A. B. (2008). Th17 cells: a new paradigm for cutaneous inflammation. *The Journal of dermatological treatment*, **19**(5), 259-266.
- Asawanonda, P., and Nateetongrungsak, Y. (2006). Methotrexate plus narrowband UVB phototherapy versus narrowband UVB phototherapy alone in the treatment of plaque-type psoriasis: a randomized, placebo-controlled study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **54**(6), 1013-1018.
- Ashcroft, D. M., Li Wan Po, A., and Griffiths, C. E. (2000). Therapeutic strategies for psoriasis. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, **25**(1), 1-10.

- Ashikawa, K., Majumdar, S., Banerjee, S., Bharti, A. C., Shishodia, S., and Aggarwal, B. B. (2002). Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB-mediated gene expression through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation. *Journal of immunology*, **169**(11), 6490-6497.
- Athar, M. (2002). Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian J Exp Biol*, **40**, 656-67
- Aubin, F. (2011). [What's new in dermatological research?]. *Annales de dermatologie et de venerologie*, **138 Suppl 4**, S233-240.
- Aung, G., Niyonsaba, F., Ushio, H., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2011). Elafin and secretory leukocyte protease inhibitor stimulate the production of cytokines and chemokines by human keratinocytes via MAPK/ERK and NF-kappaB activation. *Journal of dermatological science*, **63**(2), 128-131.
- Azfar, R. S., and Gelfand, J. M. (2008). Psoriasis and metabolic disease: epidemiology and pathophysiology. *Curr Opin Rheumatol* **20**, 416-22.
- Bahner, J. D., Cao, L. Y., and Korman, N. J. (2009). Biologics in the management of psoriasis. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, **2**, 111-128.
- Balasubramanian, S., Efimova, T., and Eckert, R. L. (2002). Green tea Polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(3), 1828-1836.
- Balasubramanian, S., Zhu, L., and Eckert, R. L. (2006). Apigenin inhibition of involucrin gene expression is associated with a specific reduction in phosphorylation of protein kinase Cdelta Tyr311. *The Journal of biological chemistry*, **281**(47), 36162-36172.
- Banno, T., Gazel, A., and Blumenberg, M. (2004). Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem*, **279**(31), 32633-32642.
- Barker, C. L., McHale, M. T., Gillies, A. K., Waller, J., Pearce, D. M., Osborne, J., Hutchinson, P. E., Smith, G. M., and Pringle, J. H. (2004). The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*, **123**(5), 892-901.
- Basavaraj, K. H., Ashok, N. M., Rashmi, R., and Praveen, T. K. (2010). The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *International journal of dermatology*, **49**(12), 1351-1361.
- Bate-Smith, E. C. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. I. Dicotyledons. *J. Linn. Soc. (Bot.)*, **58**, 669- 705.

- Baz, K., Cimen, M.Y., Kokturk, A., Yazici, A.C., Eskandari, G., Ikizoglu, G., Api, H., Atik, U. (2003). Oxidant/antioxydant status in patients with psoriasis. *Yonsei Medical Journal*, **44** (6), 987-990
- Bazzoni, F., and Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *The New England journal of medicine*, **334**(26), 1717-1725.
- Ben-Arye, E., Ziv, M., Frenkel, M., Lavi, I., and Rosenman, D. (2003). Complementary medicine and psoriasis: linking the patient's outlook with evidence-based medicine. *Dermatology*, **207**(3), 302-307.
- Benassi, L., Bertazzoni, G., Magnoni, C., Rinaldi, M., Fontanesi C., and Seidenari, S. (2003). Decrease in toxic potential of mixed tensides maintained below the critical micelle concentration: an in vitro study. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. **16**, 156–164
- Bennion, S. D., Middleton, M. H., David-Bajar, K. M., Brice, S., and Norris, D. A. (1995). In three types of interface dermatitis, different patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) indicate different triggers of disease. *The Journal of investigative dermatology*, **105**(1 Suppl), 71S-79S.
- Berger, M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**, 48-53
- Bernstein, J. E., Parish, L. C., Rapaport, M., Rosenbaum, M. M., and Roenigk, H. H., Jr. (1986). Effects of topically applied capsaicin on moderate and severe psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **15**(3), 504-507.
- Bertelli, A. A. E., Gozzini, A., Stradi, R., Stella, S., and Bertelli, A. (1998). Stability of resveratrol over time and in the various stages of grape transformation. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, **24**(4), 207-211.
- Bérubé-Gagnon, J. (2006). *Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de Picea mariana*. Université du Québec à Chicoutimi Chicoutimi.
- Bharti, A. C., Donato, N., and Aggarwal, B. B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *Journal of immunology*, **171**(7), 3863-3871.
- Bhavsar, P. K., Sukkar, M. B., Khorasani, N., Lee, K. Y., and Chung, K. F. (2008). Glucocorticoid suppression of CX3CL1 (fractalkine) by reduced gene promoter recruitment of NF-kappaB. *Faseb J*, **22**(6), 1807-1816.
- Bingle, L., Tetley, T. D., and Bingle, C. D. (2001). Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **25**(1), 84-91.

- Birbach, A., Gold, P., Binder, B. R., Hofer, E., de Martin, R., and Schmid, J. A. (2002). Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *The Journal of biological chemistry*, **277**(13), 10842-10851.
- Bito, T., Roy, S., Sen, C. K., and Packer, L. (2000). Pine bark extract pycnogenol downregulates IFN-gamma-induced adhesion of T cells to human keratinocytes by inhibiting inducible ICAM-1 expression. *Free Radic Biol Med*, **28**(2), 219-227.
- Blumenberg, M., and Tomic-Canic, M. (1997). Human epidermal keratinocyte: keratinization processes. *Exs*, **78**, 1-29.
- Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H., and Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, **46**(6), 2123-2129.
- Bononi, M., and Tateo, F. (2007). Stabilization of cranberry anthocyanins in nutraceutical capsules. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **58**(2), 142-149.
- Boocock, D.J., Faust, G.E., Patel, K.R., Schinas, A.M., Brown, V.A., Ducharme, M.P., Booth, T.D., Crowell, J.A., Perloff, M., Gescher, A.J., Steward WP, Brenner DE (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **16** (6), 1246–1252
- Bowcock, A. M. (2005). The genetics of psoriasis and autoimmunity. *Annual review of genomics and human genetics*, **6**, 93-122.
- Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2005). Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature reviews. Immunology*, **5**(9), 699-711.
- Boyman, O., Hefti, H. P., Conrad, C., Nickoloff, B. J., Suter, M., and Nestle, F. O. (2004). Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of experimental medicine*, **199**(5), 731-736.
- Brennan, P., and O'Neill, L. A. (1998). Inhibition of nuclear factor kappaB by direct modification in whole cells--mechanism of action of nordihydroguaiaritic acid, curcumin and thiol modifiers. *Biochemical pharmacology*, **55**(7), 965-973.
- Bring, D. K., Paulson, K., Renstrom, P., Salo, P., Hart, D. A., and Ackermann, P. W. (2012). Residual substance P levels after capsaicin treatment correlate with tendon repair. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, **20**(1), 50-60.
- Brivanlou, A. H., and Darnell, J. E., Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, **295**(5556), 813-818.

- Bruch-Gerharz, D., Fehsel, K., Suschek, C., Michel, G., Ruzicka, T., and Kolb-Bachofen, V. (1996). A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med*, **184**(5), 2007-2012.
- Bruch-Gerharz, D., Schnorr, O., Suschek, C., Beck, K. F., Pfeilschifter, J., Ruzicka, T., and Kolb-Bachofen, V. (2003). Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol*, **162**(1), 203-211.
- Budic-Leto, I., Lovric, T., Pezo, I., and Kljusuric, J. G. (2005). Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. *Food Technology and Biotechnology*, **43**(1), 47-53.
- Camacho-Barquero, L., Villegas, I., Sanchez-Calvo, J. M., Talero, E., Sanchez-Fidalgo, S., Motilva, V., and de la Lastra, C. A. (2007). Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and NOS expression in chronic experimental colitis. *International immunopharmacology*, **7**(3), 333-342.
- Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **6**(4), 328-340.
- Capon, F., Burden, A. D., Trembath, R. C., and Barker, J. N. (2012). Psoriasis and other complex trait dermatoses: from Loci to functional pathways. *The Journal of investigative dermatology*, **132**(3 Pt 2), 915-922.
- Carlsson, H., Yhr, M., Petersson, S., Collins, N., Polyak, K., and Enerback, C. (2005). Psoriasin (S100A7) and calgranulin-B (S100A9) induction is dependent on reactive oxygen species and is downregulated by Bcl-2 and antioxidants. *Cancer Biol Ther*, **4**(9), 998-1005.
- Cashman, M. W., and Sloan, S. B. (2010). Nutrition and nail disease. *Clinics in dermatology*, **28**(4), 420-425.
- Caughman, S. W., Li, L. J., and Degitz, K. (1992). Human intercellular adhesion molecule-1 gene and its expression in the skin. *The Journal of investigative dermatology*, **98**(6 Suppl), 61S-65S.
- Cho, J. Y., Kim, A. R., and Park, M. H. (2001). Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles. *Planta Med*, **67**(4), 312-316.
- Clardy, J., and Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*, **432**, 829-837
- Clark, C. M., McKay, R. A., Fortune, D. G., and Griffiths, C. E. M. (1998). Use of alternative treatments by patients with psoriasis. *Br J Gen Pract*, **48**, 1873-1874.



- Constatino, L., and Barlocco, D. (2006). Privileged structures as leads in medicinal chemistry. *Curr Med Chem*, **13**, 65-85
- Contard, P., Bartel, R. L., Jacobs, L., 2nd, Perlish, J. S., MacDonald, E. D., 2nd, Handler, L., Cone, D., and Fleischmajer, R. (1993). Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *The Journal of investigative dermatology*, **100**(1), 35-39.
- Corden, L. D., and McLean, W. H. (1996). Human keratin diseases: hereditary fragility of specific epithelial tissues. *Experimental dermatology*, **5**(6), 297-307.
- Cornell, R. C. (1992). Clinical trials of topical corticosteroids in psoriasis: correlations with the vasoconstrictor assay. *International journal of dermatology*, **31 Suppl 1**, 38-40.
- Counet, C., Callemien, D., and Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, **98**(4), 649-657.
- Crisan, G., Kiss, B., Vlase, L., Balica, G., and Tamas, M. (2009). HPLC determination of some phenolic compounds of *Scrophularia nodosa* AND *S. scopolii*. *Chemistry of Natural Compounds*, **45**(6), 885-888.
- Culav, E. M., Clark, C. H., and Merrilees, M. J. (1999). Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Physical therapy*, **79**(3), 308-319.
- Chaarani, J., and Lebwohl, M. (2010). Alefacept: where it stands today. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, **6**(3), 355-361.
- Chafer, A., Pascual-Marti, M. C., Salvador, A., and Berna, A. (2005). Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin. *Journal of separation science*, **28**(16), 2050-2056.
- Chan, M.M.Y., Mattiacci, J.A., Hwang, H.S., Shah, A and Fong, D. (2000). Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochemical Pharmacology*, **60**, 1539-1548
- Chatterjea, S. M., Resing, K. A., Old, W., Nirunsuksiri, W., and Fleckman, P. (2011). Optimization of filaggrin expression and processing in cultured rat keratinocytes. *Journal of dermatological science*, **61**(1), 51-59.
- Chaudhari, U., Romano, P., Mulcahy, L. D., Dooley, L. T., Baker, D. G., and Gottlieb, A. B. (2001). Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet*, **357**(9271), 1842-1847.
- Chen, M., Holland, M. J., Mir, M. R., Wong, M. G., Kelley, B. P., Grim, K. D., Bhuchar, S. S., and Hsu, S. (2011). Frequency of thrombocytopenia in psoriasis patients treated with tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, **10**(3), 280-284.

- Chen, P. C., Wheeler, D. S., Malhotra, V., Odoms, K., Denenberg, A. G., and Wong, H. R. (2002). A green tea-derived polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits I $\kappa$ B kinase activation and IL-8 gene expression in respiratory epithelium. *Inflammation*, **26**(5), 233-241.
- Cho, J. W., Lee, K. S., and Kim, C. W. (2007). Curcumin attenuates the expression of IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappa B and MAPKs as potential upstream targets. *International journal of molecular medicine*, **19**(3), 469-474.
- Cho, J. Y., Park, J., Yoo, E. S., Yoshikawa, K., Baik, K. U., Lee, J., and Park, M. H. (1998). Inhibitory effect of lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* var. *dissecta* on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Archives of pharmacal research*, **21**(1), 12-16.
- Choi, J., and Koo, J. Y. (2003). Quality of life issues in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **49**(2 Suppl), S57-61.
- Choi, J. S., Choi, Y. J., Park, S. H., Kang, J. S., and Kang, Y. H. (2004). Flavones mitigate tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor-kappa B. *The Journal of nutrition*, **134**(5), 1013-1019.
- Christophers, E. (2001). Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clinical and experimental dermatology*, **26**(4), 314-320.
- Chuang, C. C., Martinez, K., Xie, G., Kennedy, A., Bumrungpert, A., Overman, A., Jia, W., and McIntosh, M. K. (2010). Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr*, **92**(6), 1511-1521.
- Cordier, C., Morton, D., Murrison, S., Nelson, A., O'Leary-Steele, C. (2008). Natural products as an inspiration in the diversity-oriented synthesis of bioactive compound libraries. *Nat Prod Rep*, **25**, 719-737
- Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2005). Biodiversity : A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem*, **77** (1), 7-24
- Csiszar, A., Smith, K., Labinskyy, N., Orosz, Z., Rivera, A., and Ungvari, Z. (2006). Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**(4), H1694-1699.
- Cui, X., Yu, J., Hofseth, A.B., Pena, E., Habiger, J., Chumanevich, A., Poudyal, D., Nagarkatti, P.S., Singh, U.P., Hofseth, L.J. (2010). Resveratrol supresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prev Res*, **3**(4), 549-559.

- D'Angelo, S., Morana, A., Salvatore, A., Zappia, V., and Galletti, P. (2009). Protective effect of polyphenols from glycyrrhiza glabra against oxidative stress in caco-2 cells. *Journal of medicinal Food*, **12**, 1326-1333
- Darmstadt, G. L., Fleckman, P., and Rubens, C. E. (1999). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1alpha decrease the adherence of Streptococcus pyogenes to cultured keratinocytes. *The Journal of infectious diseases*, **180**(5), 1718-1721.
- dermatologie, A. c. d. (2009). Lignes directrices canadiennes pour la prise en charge du psoriasis en plaques. In: Comité canadien des lignes directrices sur le psoriasis
- Deters, A., Dauer, A., Schnetz, E., Fartasch, M., and Hensel, A. (2001). High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from Hamamelis virginiana bark : influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*, **58**, 949-958
- Detmar, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Yeo, K. T., Kocher, O., Jackman, R. W., Berse, B., and Dvorak, H. F. (1994). Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *The Journal of experimental medicine*, **180**(3), 1141-1146.
- Dewick, P. M. (1997). *Medicinal natural products. A biosynthetic Approach*: Ed. Jhon Wiley & Sons Ltd.
- Diaz, B. V., Lenoir, M. C., Ladoux, A., Frelin, C., Demarchez, M., and Michel, S. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem*, **275**(1), 642-650.
- DiGiovanna, J. J., Aoyagi, T., Taylor, J. R., and Halprin, K. M. (1981). Inhibition of epidermal adenyl cyclase by lithium carbonate. *The Journal of investigative dermatology*, **76**(4), 259-263.
- Diouf, P. N., Stevanovic, T., and Cloutier, A. (2009). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from Picea mariana bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, **113**(4), 897-902.
- Directive sur les solvants résiduels. (1999) Santé Canada.
- Droque, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **82**, 47-95
- du Vivier, A. (2002). The atlas of clinical dermatology In Elsevier (Ed.), Third edition.
- Duvic, M., Nagpal, S., Asano, A. T., and Chandraratna, R. A. (1997). Molecular mechanisms of tazarotene action in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **37**(2 Pt 3), S18-24.

- Eckert, R. L. (1989). Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiological reviews*, **69**(4), 1316-1346.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., and Balasubramanian, S. (2004). Antioxidants regulate normal human keratinocyte differentiation. *Biochemical pharmacology*, **68**(6), 1125-1131.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., and Balasubramanian, S. (2006). Opposing action of curcumin and green tea polyphenol in human keratinocytes. *Molecular nutrition & food research*, **50**(2), 123-129.
- Eckert, R. L., and Rorke, E. A. (1989). Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environmental health perspectives*, **80**, 109-116.
- Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M., and Rorke, E. A. (2005). Transglutaminases in epidermis. *Progress in experimental tumor research*, **38**, 115-124.
- Eckert, R. L., Yaffe, M. B., Crish, J. F., Murthy, S., Rorke, E. A., and Welter, J. F. (1993). Involucrin--structure and role in envelope assembly. *The Journal of investigative dermatology*, **100**(5), 613-617.
- Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., Lippens, S., Vandenabeele, P., and Tschachler, E. (2000). Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *Journal of Investigative Dermatology*, **115**(6), 1148-1151.
- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, **5**, 264-270.
- Edwards, C. K., 3rd. (1999). PEGylated recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I (r-Hu-sTNF-RI): novel high affinity TNF receptor designed for chronic inflammatory diseases. *Annals of the rheumatic diseases*, **58 Suppl 1**, I73-81.
- Elder, J. T. (2006). PSORS1: linking genetics and immunology. *The Journal of investigative dermatology*, **126**(6), 1205-1206.
- Elder, J. T., Nair, R. P., Henseler, T., Jenisch, S., Stuart, P., Chia, N., Christophers, E., and Voorhees, J. J. (2001). The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Archives of dermatology*, **137**(11), 1447-1454.
- Ellis, C. N., Berberian, B., Sulica, V. I., Dodd, W. A., Jarratt, M. T., Katz, H. I., Prawer, S., Krueger, G., Rex, I. H., Jr., and Wolf, J. E. (1993). A double-blind evaluation of topical capsaicin in pruritic psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **29**(3), 438-442.
- Erkin, G., Ugur, Y., Gurer, C. K., Asan, E., Korkusuz, P., Sahin, S., and Kolemen, F. (2007). Effect of PUVA, narrow-band UVB and cyclosporin on inflammatory cells of the psoriatic plaque. *Journal of cutaneous pathology*, **34**(3), 213-219.

- Escarpa, A., Morales, M. D., and Gonzalez, M. C. (2002). Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds using real samples by high-performance liquid chromatography-diode-array detection. *Analytica Chimica Acta*, **460**(1), 61-72.
- Escribano-Bailón, C., and Santos-Buelga, M. T. (2003). Polyphénols extraction from foods. In T. G. House (Ed.), *Methods in polyphenol analysis*, (pp. 1-16). Cambridge.
- Ettehadi, P., Greaves, M. W., Wallach, D., Aderka, D., and Camp, R. D. (1994). Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clinical and experimental immunology*, **96**(1), 146-151.
- Eugui, E. M., DeLustro, B., Rouhafza, S., Ilnicka, M., Lee, S. W., Wilhelm, R., and Allison, A. C. (1994). Some antioxidants inhibit, in a co-ordinate fashion, the production of tumor necrosis factor-alpha, IL-beta, and IL-6 by human peripheral blood mononuclear cells. *International immunology*, **6**(3), 409-422.
- Evensen, P. C., Solheim, H., Hoiland, K., and Stenersen, J. (2000). Induced resistance of Norway spruce, variation of phenolic compounds and their effects on fungal pathogens. *Forest Pathology*, **30**(2), 97-108.
- Failmezger, T. C. (1978). A clinical survey of skin diseases in selected Latin American countries. *International journal of dermatology*, **17**(7), 583-591.
- Fairbanks, L. D., Ruckemann, K., Qiu, Y., Hawrylowicz, C. M., Richards, D. F., Swaminathan, R., Kirschbaum, B., and Simmonds, H. A. (1999). Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? *The Biochemical journal*, **342** ( Pt 1), 143-152.
- Farber, E. M., and Nall, L. (1994). Psoriasis in the tropics. Epidemiologic, genetic, clinical, and therapeutic aspects. *Dermatologic clinics*, **12**(4), 805-816.
- Fauconneau, B., WaffoTeguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., and Merillon, J. M. (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life sciences*, **61**(21), 2103-2110.
- Feher, M., Schmidt, J.M. (2003) Property distributions : differences between drugs, natural products and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Compt Sci*, **43**, 218-227
- Feldman, S. R., Fleischer, A. B., Jr., and Cooper, J. Z. (2000). New topical treatments change the pattern of treatment of psoriasis: dermatologists remain the primary providers of this care. *International journal of dermatology*, **39**(1), 41-44.
- Feldman, S. R., Gordon, K. B., Bala, M., Evans, R., Li, S., Dooley, L. T., Guzzo, C., Patel, K., Menter, A., and Gottlieb, A. B. (2005). Infliximab treatment results in significant

- improvement in the quality of life of patients with severe psoriasis: a double-blind placebo-controlled trial. *The British journal of dermatology*, **152**(5), 954-960.
- Ferguson, P. J., Kurowska, E., Freeman, D. J., Chambers, A. F., and Koropatnick, D. J. (2004). A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *Journal of Nutrition*, **134**(6), 1529-1535.
- Fernandez, M. A., Saenz, M. T., and Garcia, M. D. (1998). Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **50**(10), 1183-1186.
- Final-report. (2007). Wood Material Science and Engineering Research Programme. Value-added products from barks of Nordic wood species using bioconversion and chemical technology (WoodBiocon) Stockholm.
- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476, 52-4
- Finlay, A. Y. (2005). Current severe psoriasis and the rule of tens. *The British journal of dermatology*, **152**(5), 861-867.
- Flamini, R., Vedova, A. D., Cancian, D., Panighel, A., and De Rosso, M. (2007). GC/MS-positive ion chemical ionization and MS/MS study of volatile benzene compounds in five different woods used in barrel making. *Journal of Mass Spectrometry*, **42**(5), 641-646.
- Fleischer, A. B., Jr., Feldman, S. R., Rapp, S. R., Reboussin, D. M., Exum, M. L., and Clark, A. R. (1996). Alternative therapies commonly used within a population of patients with psoriasis. *Cutis; cutaneous medicine for the practitioner*, **58**(3), 216-220.
- Fouere, S., Adjadj, L., and Pawin, H. (2005). How patients experience psoriasis: results from a European survey. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, **19 Suppl 3**, 2-6.
- Freischmidt, A., Jurgenliemk, G., Kraus, B., Okpanyi, S. N., Muller, J., Kelber, O., Weiser, D., and Heilmann, J. (2011). Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised Willow bark extract. *Phytomedicine*, **19**(3-4), 245-252.
- Gallo, E., Cabaleiro, T., Roman, M., Abad-Santos, F., and Dauden, E. (2011). Study of Genetic Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor alpha Promoter Region in Spanish Patients With Psoriasis. *Actas dermo-sifiliograficas*.
- Grabley, S and Thiericke, R. (2000) In Drug discovery from Nature; Grabley and Thiericke, Eds, Springer, Berlin, 3-37
- Garrod, D. (2010). Desmosomes in vivo. *Dermatology research and practice*, **2010**, 212439.

- George, S. E., Anderson, R. J., Cunningham, A., Donaldson, M., and Groundwater, P. W. (2010). Evaluation of a range of anti-proliferative assays for the preclinical screening of anti-psoriatic drugs: a comparison of colorimetric and fluorimetric assays with the thymidine incorporation assay. *Assay and drug development technologies*, **8**(3), 389-400.
- Gerritsen, M. J., Rulo, H. F., Van Vlijmen-Willems, I., Van Erp, P. E., and van de Kerkhof, P. C. (1993). Topical treatment of psoriatic plaques with 1,25-dihydroxyvitamin D3: a cell biological study. *The British journal of dermatology*, **128**(6), 666-673.
- Gilhar, A., David, M., Kalish, R. S., and Weisinger, G. (1996). In vivo effects of cytokines on psoriatic skin grafted on nude mice: involvement of the tumour necrosis factor (TNF) receptor. *Clin Exp Immunol*, **106**(1), 134-142.
- Gille, J., Reisinger, K., Asbe-Vollkopf, A., Hardt-Weinelt, K., and Kaufmann, R. (2000). Ultraviolet-A-induced transactivation of the vascular endothelial growth factor gene in HaCaT keratinocytes is conveyed by activator protein-2 transcription factor. *J Invest Dermatol*, **115**(1), 30-36.
- Ghoreschi, K., Mrowietz, U., and Rocken, M. (2003). A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *Journal of molecular medicine*, **81**(8), 471-480.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109** Suppl, S81-96.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, **16**, 225-260.
- Giustizieri, M. L., Mascia, F., Frezzolini, A., De Pita, O., Chinni, L. M., Giannetti, A., Girolomoni, G., and Pastore, S. (2001). Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **107**(5), 871-877.
- Glade, C. P., van der Vleuten, C. J., van Erp, P. E., and van de Kerkhof, P. C. (2002). Flow cytometric assessment of clearance and relapse characteristics in psoriasis vulgaris after treatment with weekly clobetasol lotion under hydrocolloid occlusion versus twice-daily clobetasol ointment. *Skin pharmacology and applied skin physiology*, **15**(2), 92-99.
- Goffe, B., and Cather, J. C. (2003). Etanercept: An overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **49**(2 Suppl), S105-111.
- Goni, I., and Serrano, J. (2005). The intake of dietary fiber from grape seeds modifies the antioxidant status in rat cecum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**(11), 1877-1881.

- Gommans, J.M., Bergers, M., Van Erp, P.E., van den Hurk, J.J., Mier, P.D., and Roelfzema, H. (1979). Studies on the plasma membrane of normal and psoriatic keratinocytes. *British Journal of Dermatology*, **101**: 407-9
- Goodfield, M., Hull, S. M., Holland, D., Roberts, G., Wood, E., Reid, S., and Cunliffe, W. (1994). Investigations of the 'active' edge of plaque psoriasis: vascular proliferation precedes changes in epidermal keratin. *The British journal of dermatology*, **131**(6), 808-813.
- Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.*, **9**(12), 767-776.
- Gordon, K. B., Langley, R. G., Leonardi, C., Toth, D., Menter, M. A., Kang, S., Heffernan, M., Miller, B., Hamlin, R., Lim, L., Zhong, J., Hoffman, R., and Okun, M. M. (2006). Clinical response to adalimumab treatment in patients with moderate to severe psoriasis: double-blind, randomized controlled trial and open-label extension study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **55**(4), 598-606.
- Gottlieb, A. B. (2005). Psoriasis: emerging therapeutic strategies. *Nature reviews. Drug discovery*, **4**(1), 19-34.
- Gottlieb, A. B., Chamian, F., Masud, S., Cardinale, I., Abello, M. V., Lowes, M. A., Chen, F., Magliocco, M., and Krueger, J. G. (2005). TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol*, **175**(4), 2721-2729.
- Gottlieb, A. B., Masud, S., Ramamurthi, R., Abdulghani, A., Romano, P., Chaudhari, U., Dooley, L. T., Fasanmade, A. A., and Wagner, C. L. (2003). Pharmacodynamic and pharmacokinetic response to anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody (infliximab) treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **48**(1), 68-75.
- Gottlieb, S., Hayes, E., Gilleaudeau, P., Cardinale, I., Gottlieb, A. B., and Krueger, J. G. (1996). Cellular actions of etretinate in psoriasis: enhanced epidermal differentiation and reduced cell-mediated inflammation are unexpected outcomes. *Journal of cutaneous pathology*, **23**(5), 404-418.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **83**(5), 793-802.
- Griffiths, C. E., and Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*, **370**(9583), 263-271.
- Griffiths, C. E., Christophers, E., Barker, J. N., Chalmers, R. J., Chimenti, S., Krueger, G. G., Leonardi, C., Menter, A., Ortonne, J. P., and Fry, L. (2007). A classification of



- psoriasis vulgaris according to phenotype. *The British journal of dermatology*, **156**(2), 258-262.
- Griffiths, C. E., and Nickoloff, B. J. (1989). Keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression precedes dermal T lymphocytic infiltration in allergic contact dermatitis (Rhus dermatitis). *The American journal of pathology*, **135**(6), 1045-1053.
- Griffiths, C. E., Voorhees, J. J., and Nickoloff, B. J. (1989). Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol*, **20**(4), 617-629.
- Gromova, A. C., Lutsky, V. I., and Tyukavkina, N. A. (1977). Stilbenes of ritidom pinus sibirica and Picea koraiensis. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*(2), 275-276.
- Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., and Gottlieb, A. B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(16), 6367-6371.
- Grundmann-Kollmann, M., Ludwig, R., Zollner, T. M., Ochsendorf, F., Thaci, D., Boehncke, W. H., Krutmann, J., Kaufmann, R., and Podda, M. (2004). Narrowband UVB and cream psoralen-UVA combination therapy for plaque-type psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **50**(5), 734-739.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*, **27**(1), 1-93.
- Guttman-Yassky, E., and Krueger, J. G. (2007). Psoriasis: evolution of pathogenic concepts and new therapies through phases of translational research. *The British journal of dermatology*, **157**(6), 1103-1115.
- Habtemariam, S. (1997). Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha in L-929 tumor cells. *Journal of natural products*, **60**(8), 775-778.
- Habtemariam, S. (2000). Natural inhibitors of tumour necrosis factor-alpha production, secretion and function. *Planta medica*, **66**(4), 303-313.
- Hancox, J. G., Sheridan, S. C., Feldman, S. R., and Fleischer, A. B., Jr. (2004). Seasonal variation of dermatologic disease in the USA: a study of office visits from 1990 to 1998. *International journal of dermatology*, **43**(1), 6-11.
- Harding, C. R. (2004). The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologic therapy*, **17 Suppl 1**, 6-15.

- He, F., Pan, Q. H., Shi, Y., and Duan, C. Q. (2008). Chemical Synthesis of Proanthocyanidins in Vitro and Their Reactions in Aging Wines. *Molecules*, **13**(12), 3007-3032.
- Hehlgans, T., and Mannel, D. N. (2002). The TNF-TNF receptor system. *Biological chemistry*, **383**(10), 1581-1585.
- Hemingway, R. W., Foo, L. Y., and Porter, L. J. (1982). Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3 cis-procyanidins. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*(5), 1209-1216.
- Henkel, T., Brunne, R., Muller, H., and Reichel, F. (1999) Statistical investigation of structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, **38**, 643-647
- Hemwimon, S., Pavasant, P., and Shotipruk, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, **54**(1), 44-50.
- Heng, M. C., Song, M. K., Harker, J., and Heng, M. K. (2000). Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. *The British journal of dermatology*, **143**(5), 937-949.
- Heng, M. C., Song, M. K., and Heng, M. K. (1994). Elevated phosphorylase kinase activity in psoriatic epidermis: correlation with increased phosphorylation and psoriatic activity. *The British journal of dermatology*, **130**(3), 298-306.
- Herath, H. M., Takano-Ishikawa, Y., and Yamaki, K. (2003). Inhibitory effect of some flavonoids on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage cell line J774.1. *Journal of medicinal food*, **6**(4), 365-370.
- Heydendael, V. M. R., Spuls, P. I., Opmeer, B. C., de Borgie, C., Reitsma, J. B., Goldschmidt, W. F. M., Bossuyt, P. M. M., Bos, J. D., and de Rie, M. A. (2003). Methotrexate versus cyclosporine in moderate-to-severe chronic plaque psoriasis. *New England Journal of Medicine*, **349**(7), 658-665.
- Hino, H., Kobayasi, T., and Asboe-Hansen, G. (1982). Desmosome formation in normal human epidermal cell culture. *Acta dermato-venereologica*, **62**(3), 185-191.
- Hoffmann, D. (2003). Medical Herbalism. In H. A. Press (Ed.). Rochester (VT).
- Hohl, D. (1990). Cornified cell envelope. *Dermatologica*, **180**(4), 201-211.
- Holder, G. M., Plummer, J. L., and Ryan, A. J. (1978). The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*, **8**(12), 761-768.

- Holian, O., and Walter, R. J. (2001). Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, **Suppl 36**, 55-62.
- Honigsmann, H., Wolff, K., Gschnait, F., Brenner, W., and Jaschke, E. (1980). Keratoses and Non-Melanoma Skin Tumors in Long-Term Photochemotherapy (Puva). *Journal of the American Academy of Dermatology*, **3**(4), 406-414.
- Horn, E. J., Fox, K. M., Patel, V., Chiou, C. F., Dann, F., and Lebwohl, M. (2007). Are patients with psoriasis undertreated? Results of National Psoriasis Foundation survey. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **57**(6), 957-962.
- Hrenn, A., Steinbrecher, T., Labahn, A., Schwager, J., Schempp, C. M., and Merfort, I. (2006). Plant phenolics inhibit neutrophil elastase. *Planta medica*, **72**(12), 1127-1131.
- Hsu, S., Bollag, W. B., Lewis, J., Huang, Q., Singh, B., Sharawy, M., Yamamoto, T., and Schuster, G. (2003). Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **306**(1), 29-34.
- Hsu, S., Borke, J., Walsh, D. S., Wood, J., Qin, H., Winger, J., Pearl, H., Schuster, G., and Bollag, W. B. (2007). Green tea polyphenols reduced psoriasiform lesions in a mouse model for human psoriasis in association with caspase 14 activation. *Journal of Investigative Dermatology*, **127**, S8-S8.
- Hu, S. M., Snipas, S. J., Vincenz, C., Salvesen, G., and Dixit, V. M. (1998). Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(45), 29648-29653.
- Ignat, I., Volf, I., and Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **126**(4), 1821-1835.
- Iizuka, H., Takahashi, H., Honma, M., and Ishida-Yamamoto, A. (2004a). Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *The Journal of dermatology*, **31**(4), 271-276.
- Iizuka, H., Takahashi, H., and Ishida-Yamamoto, A. (2004b). Psoriatic architecture constructed by epidermal remodeling. *Journal of dermatological science*, **35**(2), 93-99.
- Ireson, C. R., Jones, D. J., Orr, S., Coughtrie, M. W., Boocock, D. J., Williams, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P., and Gescher, A. J. (2002). Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, **11**(1), 105-111.

- Isbrucker, R. A., Bausch, J., Edwards, J. A., and Wolz, E. (2006). Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: Genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, **44**(5), 626-635.
- Ishida-Yamamoto, A., Eady, R. A., Watt, F. M., Roop, D. R., Hohl, D., and Iizuka, H. (1996). Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelope formation in normal and psoriatic epidermis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, **44**(2), 167-175.
- Ishida-Yamamoto, A., Tanaka, H., Nakane, H., Takahashi, H., and Iizuka, H. (1998). Inherited disorders of epidermal keratinization. *Journal of dermatological science*, **18**(3), 139-154.
- Iversen, L., Johansen, C., and Kragballe, K. (2005). Signal transduction pathways in human epidermis. *European journal of dermatology : EJD*, **15**(1), 4-12.
- Jackson, S. M., Williams, M. L., Feingold, K. R., and Elias, P. M. (1993). Pathobiology of the stratum corneum. *The Western journal of medicine*, **158**(3), 279-285.
- Jacobs, K., Pittman, D.D., Fouser, L., Spauldin, L., Xuan, C.H. (2011). Methods of treating psoriasis by administering IL-22 antibodies, or binding fragments thereof. US 7951372B1
- Jean, J., Lapointe, M., Soucy, J., and Pouliot, R. (2009). Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *Journal of dermatological science*, **53**(1), 19-25.
- Jean, J., and Pouliot, R. (2010). In vivo and in vitro models of psoriasis. In E. D (Ed.), *Tissue engineering*, (pp. 359-382).
- Jean, J., Soucy, J., and Pouliot, R. (2011). Effects of retinoic acid on keratinocyte proliferation and differentiation in a psoriatic skin model. *Tissue engineering. Part A*, **17**(13-14), 1859-1868.
- Jensen, P. (1990). Use of alternative medicine by patients with atopic dermatitis and psoriasis. *Acta dermato-venereologica*, **70**(5), 421-424.
- Johnston, A., Gudjonsson, J. E., Sigmundsdottir, H., Love, T. J., and Valdimarsson, H. (2004). Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8(+) T cells. *Clinical and experimental immunology*, **138**(1), 83-93.
- Jung, H. W., Mahesh, R., Lee, J. G., Lee, S. H., Kim, Y. S., and Park, Y. K. (2010). Pinorexinol from the fruits of *Forsythia koreana* inhibits inflammatory responses in LPS-activated microglia. *Neuroscience Letters*, **480**(3), 215-220.
- Kai, M., Yasuda, S., Imai, S., Toyota, M., Kanoh, H., and Sakane, F. (2009). Diacylglycerol kinase alpha enhances protein kinase C zeta-dependent

- phosphorylation at Ser311 of p65/RelA subunit of nuclear factor-kappaB. *FEBS letters*, **583**(19), 3265-3268.
- Kalantari, H., and Das, D. K. (2010). Physiological effects of resveratrol. *Biofactors*, **36**(5), 401-406.
- Kalinin, A. E., Kajava, A. V., and Steinert, P. M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **24**(9), 789-800.
- Kamili, Q. U., and Menter, A. (2009). Topical treatment of psoriasis. *Current problems in dermatology*, **38**, 37-58.
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD*, **12**(4), 390-399; quiz 400-391.
- Karin, M. (1999). The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry*, **274**(39), 27339-27342.
- Karin, M., and Delhase, M. (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in immunology*, **12**(1), 85-98.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology*, **3**(3), 221-227.
- Katalinic, V., Mozina, S. S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Milos, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., and Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, **119**(2), 715-723.
- Kawada, A., Tezuka, T., Nakamizo, Y., Kimura, H., Nakagawa, H., Ohkido, M., Ozawa, A., Ohkawara, A., Kobayashi, H., Harada, S., Igarashi, A., and Japanese Society for Psoriasis, R. (2003). A survey of psoriasis patients in Japan from 1982 to 2001. *Journal of dermatological science*, **31**(1), 59-64.
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N., and Braun, M. M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine*, **345**(15), 1098-1104.
- Kess, D., Peters, T., Zamek, J., Wickenhauser, C., Tawadros, S., Loser, K., Varga, G., Grabbe, S., Nischt, R., Sunderkotter, C., Muller, W., Krieg, T., Scharffeter, K. (2003). CD4+ T cell-associated pathophysiology critically depends on CD18 gene dose effects in a murine model of psoriasis. *J. Immunol*, **171**, 5697-5706.

- Keystone, E. C., Papp, K. A., and Wobeser, W. (2011). Challenges in diagnosing latent tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor antagonists. *The Journal of rheumatology*, **38**(7), 1234-1243.
- Kieda, C., Condaminet, B., and Redziniak, G. (1995). Les lectines endogènes de l'épiderme. In D. Schmitt (Ed.), *Biologie de la peau*. Paris: Editions Inserm
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique*. Bruxelles.
- Kim, H., Oh, S. J., Liu, Y., and Lee, M. Y. (2011). A Comparative Study of the Anti-Platelet Effects of cis- and trans-Resveratrol. *Biomol. Ther.*, **19**(2), 201-205.
- Kinouchi, Y., Ohtsu, H., Tokuda, H., Nishino, H., Matsunaga, S., and Tanaka, R. (2000). Potential antitumor-promoting diterpenoids from the stem bark of *Picea glehni*. *Journal of Natural Products*, **63**(6), 817-820.
- Kis, K., Bodai, L., Polyanka, H., Eder, K., Pivarsci, A., Duda, E., Soos, G., Bata-Csorgo, Z., and Kemeny, L. (2006). Budesonide, but not tacrolimus, affects the immune functions of normal human keratinocytes. *International immunopharmacology*, **6**(3), 358-368.
- Kiss, G. A. C., Forgacs, E., Cserhati, T., Mota, T., Morais, H., and Ramos, A. (2000). Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum* L.) powders. *Journal of Chromatography A*, **889**(1-2), 41-49.
- Kizaki, H., Matsuo, I., and Sakurada, T. (1977). Xanthine oxidase and guanase activities in normal and psoriatic epidermis. *Clinica chimica acta*. **75**,1-4
- Koehn, F.E., Carter, G.T. (2005).The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews*, **4**, 206-220
- Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, **30**, 620-650
- Kohen, R., Vellaichamy, E., Hrbac, J., Gati, I., and Tiroch, O. (2000). Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radic Biol Med*, **28**, 871-9
- Koo, J. (1996). Population-based epidemiologic study of psoriasis with emphasis on quality of life assessment. *Dermatologic clinics*, **14**(3), 485-496.
- Korkina, L.G, Pastore, S., De Luca, C., and Costyuk, V.A. (2008).Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Curr Drug Metab*, **9** (8), 710-729

- Korting, H.C., Herzinger, T., Hartinger, A., Kersch, M., Angerpointner T., and Maibach, H.I. (1994). Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *Journal of Dermatological Science*. **7**, 119–129
- Korutla, L., Cheung, J. Y., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (1995). Inhibition of ligand-induced activation of epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation by curcumin. *Carcinogenesis*, **16**(8), 1741-1745.
- Korutla, L., and Kumar, R. (1994). Inhibitory effect of curcumin on epidermal growth factor receptor kinase activity in A431 cells. *Biochimica et biophysica acta*, **1224**(3), 597-600.
- Krathen, R. A., Berthelot, C. N., and Hsu, S. (2006). Sustained efficacy and safety of infliximab in psoriasis: a retrospective study of 73 patients. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, **5**(3), 251-254.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S. D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, **53**(1), 45-53.
- Kristensen, M., Chu, C. Q., Eedy, D. J., Feldmann, M., Brennan, F. M., and Breathnach, S. M. (1993). Localization of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and its receptors in normal and psoriatic skin: epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor. *Clinical and experimental immunology*, **94**(2), 354-362.
- Kroll, M., Conconi, M., Desterro, M. J., Marin, A., Thomas, D., Friguet, B., Hay, R. T., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Rodriguez, M. S. (1997). The carboxy-terminus of I kappaB alpha determines susceptibility to degradation by the catalytic core of the proteasome. *Oncogene*, **15**(15), 1841-1850.
- Krueger, G., Koo, J., Lebwohl, M., Menter, A., Stern, R. S., and Rolstad, T. (2001). The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. *Archives of dermatology*, **137**(3), 280-284.
- Krueger, J. G., and Bowcock, A. (2005). Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Annals of the rheumatic diseases*, **64 Suppl 2**, ii30-36.
- Kumar, B., Saraswat, A., and Kaur, I. (2002). Palmoplantar lesions in psoriasis: a study of 3065 patients. *Acta dermato-venereologica*, **82**(3), 192-195.
- Kumar, R.S., Sivakumar, T., Sunderam, R.S., Gupta, M., Mazumdar, U.K., Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Saravanan, S., Kumar, M.S., Muruges, K., and Kumar, K.A. (2005). Antioxidant and antimicrobial activities of Bauhinia racemosa L. stem bark. *Brazilian Journal of Medical and Biological research*. **38**, 1015-1024

- Kurd, S. K., Smith, N., VanVoorhees, A., Troxel, A. B., Badmaev, V., Seykora, J. T., and Gelfand, J. M. (2008). Oral curcumin in the treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: A prospective clinical trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **58**(4), 625-631.
- Kurkcuoglu, N., and Alaybeyi, F. (1990). Topical capsaicin for psoriasis. *The British journal of dermatology*, **123**(4), 549-550.
- Lai, H. W., Chien, S. Y., Kuo, S. J., Tseng, L. M., Lin, H. Y., Chi, C. W., and Chen, D. R. (2011). The Potential Utility of Curcumin in the Treatment of HER-2-Overexpressed Breast Cancer: An In Vitro and In Vivo Comparison Study with Herceptin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Lamont, S. M. (1977). *The Fisherman Lake Slave and Their Environment : A Story of Floral and Faunal Resources*. University of Saskatchewan, Saskatoon.
- Landmann, L. (1988). The epidermal permeability barrier. *Anatomy and embryology*, **178**(1), 1-13.
- Lavoie, J.M. (2005). *Optimisation de l'extraction des triterpènes par ultrasons et identification du contenu moléculaire libre des tissus de bouleau jaune (Betula Alleghaniensis)*. Université Laval, Québec.
- Lavoie, J.M., and Stevanovic, T. (2007). Selective ultrasound assisted extractions of lipophilic constituents from *Betula alleghaniensis* and *B. papyrifera* wood at low temperatures. *Phytochemical analysis*, **18** (4), 291-299
- Lebwohl, M. (1999). The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. *International journal of dermatology*, **38**(1), 16-24.
- Lebwohl, M., and Ali, S. (2001). Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **45**(4), 487-498; quiz 499-502.
- Lee, A. S., Jung, Y. J., Kim, D. H., Lee, T. H., Kang, K. P., Lee, S., Lee, N. H., Sung, M. J., Kwon, D. Y., Park, S. K., and Kim, W. (2009). Epigallocatechin-3-O-gallate decreases tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced fractalkine expression in endothelial cells by suppressing NF- $\kappa$ B. *Cell Physiol Biochem*, **24**(5-6), 503-510.
- Lee, M.L., and Schneider, G. (2001) Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: Application in the desing of natural product-based libraries. *J Comb Chem*, **3**, 284-289
- Lee, S. H., and Hannink, M. (2002). Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). *The Journal of biological chemistry*, **277**(26), 23358-23366.



- Leon, A., Nguyen, A., Letsinger, J., and Koo, J. (2007). An attempt to formulate an evidence-based strategy in the management of moderate-to-severe psoriasis: a review of the efficacy and safety of biologics and prebiologic options. *Expert opinion on pharmacotherapy*, **8**(5), 617-632.
- Leonardi, C. L., Powers, J. L., Matheson, R. T., Goffe, B. S., Zitnik, R., Wang, A., Gottlieb, A. B., and Etanercept Psoriasis Study, G. (2003). Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *The New England journal of medicine*, **349**(21), 2014-2022.
- Li, W., Han, J., Choi, H. K., and Qureshi, A. A. (2012). Smoking and risk of incident psoriasis among women and men in the United States: a combined analysis. *American journal of epidemiology*, **175**(5), 402-413.
- Liacini, A., Sylvester, J., Li, W.Q., Huang, W., Dehnade, F., Ahmad, M., Zafarullah, M. (2003). Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF- $\alpha$  is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF- $\kappa$ B transcription factors in articular chondrocytes. *Exp. Cell Res*, **288**, 208-217.
- Liddle, M., Hull, C., Liu, C., and Powell, D. (2006). Contact urticaria from curcumin. *Dermatitis*, **17**(4), 196-197.
- Lippens, S., Kockx, M., Knaapen, M., Mortier, L., Polakowska, R., Verheyen, A., Garmyn, M., Zwijsen, A., Formstecher, P., Huylebroeck, D., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2000). Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death and Differentiation*, **7**(12), 1218-1224.
- Liu, Y., Krueger, J. G., and Bowcock, A. M. (2007). Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes and immunity*, **8**(1), 1-12.
- Lizzul, P. F., Aphale, A., Malaviya, R., Sun, Y., Masud, S., Dombrovskiy, V., and Gottlieb, A. B. (2005). Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. *The Journal of investigative dermatology*, **124**(6), 1275-1283.
- Louli, V., Ragoussis, N., and Magoulas, K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource technology*, **92**(2), 201-208.
- Lowes, M. A., Lew, W., and Krueger, J. G. (2004). Current concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin*, **22**(4), 349-369, vii.
- Lowes, M. A., Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, **445**(7130), 866-873.
- Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., Bowman, E. P., and Krueger, J. G. (2008). Psoriasis vulgaris lesions contain discrete

- populations of Th1 and Th17 T cells. *The Journal of investigative dermatology*, **128**(5), 1207-1211.
- Ma, Q.H., Xia, Q., Lu, Y.Y., Hao, X.Z., Gu, N., Lin, X.F., and Luo, D. (2007). Preparation of tea polyphenols-loaded solid lipid nanoparticles based on the phase behaviours of hot microemulsions. *Solid state phenomena*, **121-123**, 705-708
- MacDonald, A., and Burden, A. D. (2007). Psoriasis: advances in pathophysiology and management. *Postgrad Med J*, **83**(985), 690-697.
- Madsen, P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honore, B., Dejgaard, K., Olsen, E., Kiil, J., Walbum, E., Andersen, A. H., Basse, B., and et al. (1991). Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *The Journal of investigative dermatology*, **97**(4), 701-712.
- Maltzman, W., and Czyzyk, L. (1984). Uv Irradiation Stimulates Levels of P53 Cellular Tumor-Antigen in Nontransformed Mouse Cells. *Molecular and cellular biology*, **4**(9), 1689-1694.
- Manna, S. K., Mukhopadhyay, A., and Aggarwal, B. B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Journal of immunology*, **164**(12), 6509-6519.
- Manners, G. D., and Swan, E. P. (1971). Stilbenes in barks of 5 Canadian species. *Phytochemistry*, **10**(3), 607-&.
- Mannila, E., Talvitie, A., and Kolehmainen, E. (1993). Antileukemic compounds derived from stilbenes in Picea abies bark. *Phytochemistry*, **33**(4), 813-816.
- Mansbridge, J. N., Knapp, A. M., and Strefling, A. M. (1984). Evidence for an alternative pathway of keratinocyte maturation in psoriasis from an antigen found in psoriatic but not normal epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, **83**(4), 296-301.
- Manthey, J. A., Grohmann, K., Montanari, A., Ash, K., and Manthey, C. L. (1999). Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor-alpha expression by human monocytes. *Journal of natural products*, **62**(3), 441-444.
- Margottin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K., and Benarous, R. (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Molecular cell*, **1**(4), 565-574.
- Marin, Y. E., Wall, B. A., Wang, S., Namkoong, J., Martino, J. J., Suh, J., Lee, H. J., Rabson, A. B., Yang, C. S., Chen, S., and Ryu, J. H. (2007). Curcumin downregulates the constitutive activity of NF-kappa B and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells. *Melanoma Research*, **17**(5), 274-283.

- Marshall, R. C., Orwin, D. F., and Gillespie, J. M. (1991). Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. *Electron microscopy reviews*, **4**(1), 47-83.
- Martino, K. G., and Guyer, D. (2004). Supercritical fluid extraction of quercetin from onion skins. *Journal of Food Process Engineering*, **27**(1), 17-28.
- Masquelier, J. 1987. Plant extract with a proanthocyanidin content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. United States Patent 4,698,360
- May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Pober, J. S., and Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science*, **289**(5484), 1550-1554.
- McCord, J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, **73**, 159-163
- McCune, L. M., and Johns, T. (2002). Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *Journal of ethnopharmacology*, **82**(2-3), 197-205.
- Mease, P. J. (2003). Etanercept, a TNF antagonist for treatment for psoriatic arthritis and psoriasis. *Skin therapy letter*, **8**(1), 1-4.
- Melissopoulos, A., and Levacher, C. (1998). La peau : structure et physiologie. In). Paris.
- Menter, A. (2009). The status of biologic therapies in the treatment of moderate to severe psoriasis. *Cutis; cutaneous medicine for the practitioner*, **84**(4 Suppl), 14-24.
- Menter, A., Feldman, S. R., Weinstein, G. D., Papp, K., Evans, R., Guzzo, C., Li, S., Dooley, L. T., Arnold, C., and Gottlieb, A. B. (2007). A randomized comparison of continuous vs. intermittent infliximab maintenance regimens over 1 year in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **56**(1), 31 e31-15.
- Menter, A., Tying, S. K., Gordon, K., Kimball, A. B., Leonardi, C. L., Langley, R. G., Strober, B. E., Kaul, M., Gu, Y., Okun, M., and Papp, K. (2008). Adalimumab therapy for moderate to severe psoriasis: A randomized, controlled phase III trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **58**(1), 106-115.
- Meyer-Hoffert, U., Wingertzahn, J., and Wiedow, O. (2004). Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation by epidermal growth factor receptor activation. *The Journal of investigative dermatology*, **123**(2), 338-345.
- Milavec-Puretic, V., Mance, M., Ceovic, R., and Lipozencic, J. (2011). Drug induced psoriasis. *Acta dermatovenerologica Croatica : ADC*, **19**(1), 39-42.

- Mils, V., Basset-Seguin, N., Moles, J. P., Tesniere, A., Leigh, I., and Guilhou, J. J. (1994). Comparative analysis of normal and psoriatic skin both in vivo and in vitro. *Differentiation; research in biological diversity*, **58**(1), 77-86.
- Miyoshi, K., Takaishi, M., Nakajima, K., Ikeda, M., Kanda, T., Tarutani, M., Iiyama, T., Asao, N., DiGiovanni, J., Sano, S. (2011). Stat 3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a STAT-3 inhibitor. *Journal of Investigative Dermatology*, **131**, 108-117
- Mizutani, H., Ohmoto, Y., Mizutani, T., Murata, M., and Shimizu, M. (1997). Role of increased production of monocytes TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in psoriasis: relation to focal infection, disease activity and responses to treatments. *Journal of dermatological science*, **14**(2), 145-153.
- Mizutani, H., Yamanaka, K., Konishi, H., and Murakami, T. (2003). Animal models of psoriasis and pustular psoriasis. *Archives of dermatological research*, **295**, S67-S68.
- Monfrecola, G., and Baldo, A. (2009). Retinoids and phototherapy for psoriasis. *The Journal of rheumatology. Supplement*, **83**, 71-72.
- Morel, P., Revillard, J. P., Nicolas, J. F., Wijdenes, J., Rizova, H., and Thivolet, J. (1992). Anti-CD4 monoclonal antibody therapy in severe psoriasis. *Journal of autoimmunity*, **5**(4), 465-477.
- Morhenn, V. B. (1997). Langerhans cells may trigger the psoriatic disease process via production of nitric oxide. *Immunol Today*, **18**(9), 433-436.
- Moss, G. P. (2000). Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, **72**(8), 1493-1523.
- Mossner, R., Kingo, K., Kleensang, A., Kruger, U., Konig, I. R., Silm, H., Westphal, G. A., and Reich, K. (2005). Association of TNF -238 and -308 promoter polymorphisms with psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis but not with pustulosis palmoplantaris. *The Journal of investigative dermatology*, **124**(1), 282-284.
- Moulin, V., Goulet, F., Berthod, F., Germain, L., and Auger, F. A. (2003). Le génie tissulaire au service de la compréhension du vivant. *M/S : médecine sciences*, **19**, 1003-1010.
- Mukherjee, P. K., and Wahile, A. (2006). Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. *Journal of ethnopharmacology*, **103**(1), 25-35.
- Mukhtar, H., and Ahmad, N. (2000). Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**(6), 1698S-1702S.
- Munin, A., and Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, **3**, 793-829

- Mussi, A., Bonifati, C., Carducci, M., D'Agosto, G., Pimpinelli, F., D'Urso, D., D'Auria, L., Fazio, M., and Ameglio, F. (1997). Serum TNF-alpha levels correlate with disease severity and are reduced by effective therapy in plaque-type psoriasis. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, **11**(3), 115-118.
- Nagao, S., Seishima, M., Mori, S., and Nozawa, Y. (1988). Increased protein kinase C activity in fibroblast membranes from psoriatic patients. *The Journal of investigative dermatology*, **90**(3), 406-408.
- Nair, R. P., Duffin, K. C., Helms, C., Ding, J., Stuart, P. E., Goldgar, D., Gudjonsson, J. E., Li, Y., Tejasvi, T., Feng, B. J., et al. (2009). Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nature genetics*, **41**(2), 199-204.
- Nair, R. P., Stuart, P. E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V., Jenisch, S., Weichenthal, M., Abecasis, G. R., Lim, H. W., Christophers, E., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (2006). Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *American journal of human genetics*, **78**(5), 827-851.
- Nakane, H., Ishida-Yamamoto, A., Takahashi, H., and Iizuka, H. (2002). Elafin, a secretory protein, is cross-linked into the cornified cell envelopes from the inside of psoriatic keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, **119**(1), 50-55.
- Naldi, L., and Griffiths, C. E. (2005). Traditional therapies in the management of moderate to severe chronic plaque psoriasis: an assessment of the benefits and risks. *The British journal of dermatology*, **152**(4), 597-615.
- Nardini, M., Scaccini, C., Packer, L., and Virgili, F. (2000). In vitro inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract. *Biochimica et biophysica acta*, **1474**(2), 219-225.
- Navarro-Peran, E., Cabezas-Herrera, J., Garcia-Canovas, F., Durrant, M. C., Thorneley, R. N. F., and Rodriguez-Lopez, J. N. (2005). The antifolate activity of tea catechins. *Cancer research*, **65**(6), 2059-2064.
- Nemes, Z., and Steinert, P. M. (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental & molecular medicine*, **31**(1), 5-19.
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H., and Barker, J. (2009). Psoriasis. *The New England journal of medicine*, **361**(5), 496-509.
- Nevado, J. J. B., Salcedo, A. M. C., and Penalvo, G. C. (1999). Simultaneous determination of cis- and trans-resveratrol in wines by capillary zone electrophoresis. *The Analyst*, **124**(1), 61-66.
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, **70**(3), 461-477.

- Newman, D. J., Cragg, G. M., and Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of natural products*, **66**(7), 1022-1037.
- Nickoloff, B. J., Griffiths, C. E., and Barker, J. N. (1990). The role of adhesion molecules, chemotactic factors, and cytokines in inflammatory and neoplastic skin disease--1990 update. *J Invest Dermatol*, **94**(6 Suppl), 151S-157S.
- Nickoloff, B. J., Mitra, R. S., Varani, J., Dixit, V. M., and Polverini, P. J. (1994). Aberrant production of interleukin-8 and thrombospondin-1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis. *Am J Pathol*, **144**(4), 820-828.
- Nickoloff, B. J., and Wrone-Smith, T. (1999). Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *The American journal of pathology*, **155**(1), 145-158.
- Nicolaou, K.C., Pfefferkorn, J.A., Roecker, A.J., Cao, G.K., Barluenga, S., Mitchell, H.S. (2000). Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures. 1. General Principles and Solid-Phase Synthesis of Benzopyrans. *J.Am.Chem.Soc*, **122**, 9954-9967
- Nielsen, J. (2002). Combinatorial synthesis of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**, 297-305
- Niemetz, R., and Gross, G. G. (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*, **66**(17), 2001-2011.
- Nkhili, E. (2009). Polyphénols de l'alimentation: extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. These de doctorat. Science des aliments. Université Cadi Ayyad, Université d'avignon et des pays de vaucluse.
- O'Brien, M., and Koo, J. (2006). The mechanism of lithium and beta-blocking agents in inducing and exacerbating psoriasis. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, **5**(5), 426-432.
- Oestmann, E., Lavrijzen, A. P., Hermans, J., and Ponc, M. (1993). Skin barrier function in healthy volunteers as assessed by transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate: intra- and inter-individual variability. *Br J Dermatol*, **128**, 130-6
- O'Neill, J. L., and Kalb, R. E. (2009). Ustekinumab in the therapy of chronic plaque psoriasis. *Biologics : targets & therapy*, **3**, 159-168.
- Ockenfels, H. M., Wagner, S. N., Keim-Maas, C., Funk, R., Nussbaum, G., and Goos, M. (1996). Lithium and psoriasis: cytokine modulation of cultured lymphocytes and psoriatic keratinocytes by lithium. *Archives of dermatological research*, **288**(4), 173-178.
- Odland, G. F., and Short, J. (1971). Structure of the skin. In M. Graw-Hill (Ed.), *Dermatology in general medicine*.

- OhnishiKameyama, M., Yanagida, A., Kanda, T., and Nagata, T. (1997). Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **11**(1), 31-36.
- Ohsugi, M., Fan, W., Hase, K., Xiong, Q., Tezuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., Saitoh, T., Tazawa, K., and Kadota, S. (1999). Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *Journal of Ethnopharmacology*. **67**, 111-119
- Ohta, Y., Katayama, I., Funato, T., Yokozeki, H., Nishiyama, S., Hirano, T., Kishimoto, T., and Nishioka, K. (1991). In situ expression of messenger RNA of interleukin-1 and interleukin-6 in psoriasis: interleukin-6 involved in formation of psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res*, **283**(6), 351-356.
- Omori, E., Matsumoto, K., Sanjo, H., Sato, S., Akira, S., Smart, R. C., and Ninomiya-Tsuji, J. (2006). TAK1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, **281**(28), 19610-19617.
- Ormerod, A. D., Dwyer, C. M., Weller, R., Cox, D. H., and Price, R. (1997). A comparison of subjective and objective measures of reduction of psoriasis with the use of ultrasound, reflectance colorimetry, computerized video image analysis, and nitric oxide production. *J Am Acad Dermatol*, **37**(1), 51-57.
- Ormerod, A.D., Weller, R., Copeland, P., Benjamin, N., Ralston, S.H., Grabowski, P., and Herriot, R. (1998). Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*. **290**, 3-8
- Owens, D. W., and Lane, E. B. (2003). The quest for the function of simple epithelial keratins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **25**(8), 748-758.
- Pan, H. F., and Lundgren, L. N. (1995). Phenolic extractives from root bark of *Picea abies*. *Phytochemistry*, **39**(6), 1423-1428.
- Papp, K. A. (2006). The long-term efficacy and safety of new biological therapies for psoriasis. *Archives of dermatological research*, **298**(1), 7-15.
- Papp, K. A., Tying, S., Lahfa, M., Prinz, J., Griffiths, C. E., Nakanishi, A. M., Zitnik, R., van de Kerkhof, P. C., Melvin, L., and Etanercept Psoriasis Study, G. (2005). A global phase III randomized controlled trial of etanercept in psoriasis: safety, efficacy, and effect of dose reduction. *The British journal of dermatology*, **152**(6), 1304-1312.
- Park, C., Moon, D.O., Choi, I.W., Choi, B.T., Nam, T.J., Rhu, C.H., Kwon, T.K., Lee, W.H., Kim, G.Y., Choi, Y.H. (2007). Curcumin induces apoptosis and inhibits

prostaglandin E(2) production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med*, **20**, 365-372.

- Pastore, S., Lulli, D., Potapovich, A. I., Fidanza, P., Kostyuk, V. A., Dellambra, E., De Luca, C., Maurelli, R., and Korkina, L. G. (2011). Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells. *Journal of dermatological science*, **63**(2), 104-114.
- Pastore, S., Mascia, F., Mariotti, F., Dattilo, C., and Girolomoni, G. (2004). Chemokine networks in inflammatory skin diseases. *European journal of dermatology : EJD*, **14**(4), 203-208.
- Paul, A. T., Gohil, V. M., and Bhutani, K. K. (2006). Modulating TNF-alpha signaling with natural products. *Drug discovery today*, **11**(15-16), 725-732.
- Pauls, K., Schon, M., Kubitza, R. C., Homey, B., Wiesenborn, A., Lehmann, P., Ruzicka, T., Parker, C. M., and Schon, M. P. (2001). Role of integrin alphaE(CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes. *The Journal of investigative dermatology*, **117**(3), 569-575.
- Pelle, E., Mammone, T., Maes, D., and Frenkel, K. (2005). Keratinocytes act as a source of reactive oxygen species by transferring hydrogen peroxide to melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. **124**,793-797
- Pellegrini, N., Valtuena, S., Ardigo, D., Brighenti, F., Franzini, L., Del Rio, D., Scazzina, F., Piatti, P. M., and Zavaroni, I. (2010). Intake of the plant lignans matairesinol, secoisolariciresinol, pinoresinol, and lariciresinol in relation to vascular inflammation and endothelial dysfunction in middle age-elderly men and post-menopausal women living in Northern Italy. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, **20**(1), 64-71.
- Pelliccia, M. T., Gianella, A., and Gianella, J. (2001). Use of resveratrol for the treatment of exfoliative eczema, acne and psoriasis *United States Patent US2001/0056071 A1*.
- Peritz, A. E., and Gasparro, F. P. (1999). Psoriasis, PUVA, and skin cancer-molecular epidemiology: The curious question of T -> A transversions. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, **4**(1), 11-16.
- Petersen, T. K. (2006). In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **99**(2), 104-115.
- Peus, D., Beyerle, A., Rittner, H. L., Pott, M., Meves, A., Weyand, C., and Pittelkow, M. R. (2000). Anti-psoriatic drug anthralin activates JNK via lipid peroxidation: mononuclear cells are more sensitive than keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, **114**(4), 688-692.
- Pfundt, R., Wingers, M., Bergers, M., Zweers, M., Frenken, M., and Schalkwijk, J. (2000). TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes



- by a p38 MAP kinase-dependent pathway. *Archives of dermatological research*, **292**(4), 180-187.
- Phillips, K., Husni, M. E., Karlson, E. W., and Coblyn, J. S. (2002). Experience with etanercept in an academic medical center: are infection rates increased? *Arthritis and rheumatism*, **47**(1), 17-21.
- Pietarinen, S. P., Willfor, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., and Holmbom, B. R. (2006). Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *Journal of Wood Science*, **52**(5), 436-444.
- Piette, J., Piret, B., Bonizzi, G., Schoonbroodt, S., Merville, M. P., Legrand-Poels, S., and Bours, V. (1997). Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biological chemistry*, **378**(11), 1237-1245.
- Pinelo, M., Laurie, V. F., and Waterhouse, A. L. (2006). A simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solid-phase extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**(8), 2839-2844.
- Piskin, G., Heydendael, V. M., de Rie, M. A., Bos, J. D., and Teunissen, M. B. (2003). Cyclosporin A and methotrexate are equally effective in reducing T cell numbers in psoriatic skin lesions but have no consistent effect on IFN-gamma and IL-4 expression in psoriatic skin in situ. *Archives of dermatological research*, **294**(12), 559-562.
- Pistritto, G., Jost, M., Srinivasula, S. M., Baffa, R., Poyet, J. L., Kari, C., Lazebnik, Y., Rodeck, U., and Alnemri, E. (2002). Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death and Differentiation*, **9**(9), 995-1006.
- Pol, A., Bergers, M., and Schalkwijk, J. (2003). Comparison of antiproliferative effects of experimental and established antipsoriatic drugs on human keratinocytes, using a simple 96-well-plate assay. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **39**(1-2), 36-42.
- Pol, A., Bergers, M., van Ruissen, F., Pfundt, R., and Schalkwijk, J. (2002a). A simple technique for high-throughput screening of drugs that modulate normal and psoriasis-like differentiation in cultured human keratinocytes. *Skin pharmacology and applied skin physiology*, **15**(4), 252-261.
- Pol, A., van Ruissen, F., and Schalkwijk, J. (2002b). Development of a keratinocyte-based screening model for antipsoriatic drugs using green fluorescent protein under the control of an endogenous promoter. *Journal of biomolecular screening*, **7**(4), 325-332.
- Popov, I., and Lewin, G.A. (1991). A deficient function of the antioxidative system of the organism as an etiopathogenic factor in psoriasis. *Med Hypotheses*. **35**, 229-236

- Presland, R. B., and Dale, B. A. (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, **11**(4), 383-408.
- Priestley, G.C., Adams, L.W., Oakley, C.A., and Prescott, R.J. (1983). Proliferative responses of fibroblasts from psoriatic and normal skin to clobetasol propionate. *Acta dermato-venereologica*. **63**, 393-396
- Proestos, C., and Komaitis, M. (2006). Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: Comparison with conventional extraction technics. *Journal of Food Quality*, **29**(5), 567-582.
- Prokop, J., Abrman, P., Seligson, A. L., and Sovak, M. (2006). Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols. *Journal of medicinal food*, **9**(1), 11-14.
- Rapp, S. R., Feldman, S. R., Exum, M. L., Fleischer, A. B., Jr., and Reboussin, D. M. (1999). Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **41**(3 Pt 1), 401-407.
- Ravindranath, V., and Chandrasekhara, N. (1980). Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, **16**(3), 259-265.
- Ravindranath, V., and Chandrasekhara, N. (1981). Metabolism of curcumin--studies with [<sup>3</sup>H]curcumin. *Toxicology*, **22**(4), 337-344.
- Raychaudhuri, S. P., and Farber, E. M. (2001). The prevalence of psoriasis in the world. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, **15**(1), 16-17.
- Raynaud, F., and Evain-Brion, D. (1991). Protein kinase C activity in normal and psoriatic cells: cultures of fibroblasts and lymphocytes. *The British journal of dermatology*, **124**(6), 542-546.
- Reagan, A. B. (1928). Plants used by the bois fort chippewa (Ojibwa) Indians of Minnesota. *Wisconsin Archeologist*, **7**(4), 230-248.
- Reddy, S., and Aggarwal, B. B. (1994). Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS letters*, **341**(1), 19-22.
- Redondo, P., Jimenez, E., Perez, A., and Garcia-Foncillas, J. (2000). N-acetylcysteine downregulates vascular endothelial growth factor production by human keratinocytes in vitro. *Arch Dermatol Res*, **292**(12), 621-628.
- Rich, P., and Scher, R. K. (2003). Nail Psoriasis Severity Index: a useful tool for evaluation of nail psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **49**(2), 206-212.

- Richards, H. L., Fortune, D. G., O'Sullivan, T. M., Main, C. J., and Griffiths, C. E. (1999). Patients with psoriasis and their compliance with medication. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **41**(4), 581-583.
- Rihn, B., Saliou, C., Bottin, M. C., Keith, G., and Packer, L. (2001). From ancient remedies to modern therapeutics: pine bark uses in skin disorders revisited. *Phytotherapy research : PTR*, **15**(1), 76-78.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., and Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **16** (1), 17-23.
- RitchKrc, E. M., Turner, N. J., and Towers, G. H. N. (1996). Carrier herbal medicine: An evaluation of the antimicrobial and anticancer activity in some frequently used remedies. *Journal of ethnopharmacology*, **52**(3), 151-156.
- Robinson, T. P., Hubbard, R. B., Ehlers, T. J., Arbiser, J. L., Goldsmith, D. J., and Bowen, J. P. (2005). Synthesis and biological evaluation of aromatic enones related to curcumin. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **13**(12), 4007-4013.
- Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueiredo, A., Quintanilha, A., and Teixeira, F. (2004). The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *The British journal of dermatology*. **150**, 917-928
- Rodriguez, M. S., Thompson, J., Hay, R. T., and Dargemont, C. (1999). Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *The Journal of biological chemistry*, **274**(13), 9108-9115.
- Roenigk, H. H., and Maibach, H. I. (1985). *Psoriasis*: M. Dekker.
- Rollinger, J. M., Langer, T., and Stuppner, H. (2006). Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. *Current medicinal chemistry*, **13**(13), 1491-1507.
- Rosales-Castro, M., Gonzalez-Laredo, R. F., Rocha-Guzman, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Peralta-Cruz, J., Morre, J., and Karchesy, J. J. (2011). Chromatographic Analysis of Bioactive Proanthocyanidins from *Quercus durifolia* and *Quercus eduardii* Barks. *Acta Chromatographica*, **23**(3), 521-529.
- Rosenbloom, J., Abrams, W. R., and Mecham, R. (1993). Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **7**(13), 1208-1218.
- Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, **395**(6699), 297-300.

- Royer, M., Houde, R., and Stevanovic, T. (2010). Potentiel de developement lié aux extractibles forestières: état des connaissances et revue des marchés. Volet 1. Les extractibles forestieres québécois. In *Québec Wood Export Bureau*.
- Royer, M., Diouf, P.N, and Stevanovic, T. (2011). Polyphenol contents and radical scavenging capacity of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food Chem Toxicol*, **49** (9), 2180-2188
- Rozières, A., Hennino, A., and Nicolas, J. F. (2006). [TNF alpha in the physiopathology of psoriasis]. *Annales de dermatologie et de venerologie*, **133**(2), 174-180.
- Rummukainen, A., Julkunen-Tiitto, R., Raisanen, M., and Lehto, T. (2007). Phenolic compounds in Norway spruce as affected by boron nutrition at the end of the growing season. *Plant and Soil*, **292**(1-2), 13-23.
- Sadasivam, K., and Kumaresan, R. (2011). Antioxidant behavior of mearnsetin and myricetin flavonoid compounds - A DFT study. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **79**(1), 282-293.
- Saed, M.A and Sabir, W.A. (2003). Irritant potential of some constituents from the seeds of *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming. *Journal of Asian natural products research*. **5** (1), 35-41
- Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., and Toriumi, W. (1999). IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *The Journal of biological chemistry*, **274**(43), 30353-30356.
- Saleem, A., Kivela, H., and Pihlaja, K. (2003). Antioxidant activity of pine bark constituents. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, **58**(5-6), 351-354.
- Salomon, J., Szepietowski, J. C., and Proniewicz, A. (2003). Psoriatic nails: a prospective clinical study. *J Cutan Med Surg*, **7**(4), 317-321.
- Sanders, T. H., McMichael, R. W., and Hendrix, K. W. (2000). Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(4), 1243-1246.
- Santamaria-Babi, L. F. (2004). CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *European journal of dermatology : EJD*, **14**(1), 13-18.
- Santé Canada. (2004 ). Reglément sur les produits de santé naturels. *Gazette du Canada* **137**(13).
- Santos, M., Paramio, J. M., Bravo, A., Ramirez, A., and Jorcano, J. L. (2002). The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*, **277**(21), 19122-19130.

- Sarikaki, V., Rallis, M., Tanojo, H., Panteri, I., Dotsikas, Y., Loukas, Y.L., Papaioannou, G., Demetzos, C., Weber, S., Moini, H., Maibach, H.L., and Packer, L. (2005). In vitro percutaneous absorption of pine bark extract (Pycnogenol) in human skin. *Cutaneous and ocular toxicology*, **23** (3), 149-158
- Sarilar, M., Koic, E., and Dervinja, F. (2011). Personal experiences of the psoriasis and its relation to the stressful life events. *Collegium antropologicum*, **35 Suppl 2**, 241-243.
- Schallreuter, K. U., and Rokos, H. (2006). Turmeric (curcumin): a widely used curry ingredient, can contribute to oxidative stress in Asian patients with acute vitiligo. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, **72**(1), 57-59.
- Schon, M. P., and Boehncke, W. H. (2005). Psoriasis. *The New England journal of medicine*, **352**(18), 1899-1912.
- Schon, M. P., Boehncke, W. H., and Brocker, E. B. (2005). Psoriasis: Clinical manifestations, pathogenesis and therapeutic perspectives. *Discovery medicine*, **5**(27), 253-258.
- Schottelius, A. J., Moldawer, L. L., Dinarello, C. A., Asadullah, K., Sterry, W., and Edwards, C. K., 3rd. (2004). Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Experimental dermatology*, **13**(4), 193-222.
- Schreiber, S. L. (2000). Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science*, **287**, 1964-1969
- See, A., Teo, B., Kwan, R., Lim, R., Lee, J., Tang, M. B., and Verkooijen, H. M. (2011). Use of complementary and alternative medicine among dermatology outpatients in Singapore. *The Australasian journal of dermatology*, **52**(1), 7-13.
- Segui, B., Cuvillier, O., Adam-Klages, S., Garcia, V., Malagarie-Cazenave, S., Leveque, S., Caspar-Bauguil, S., Coudert, J., Salvayre, R., Kronke, M., and Levade, T. (2001). Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *The Journal of clinical investigation*, **108**(1), 143-151.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**(6), 921-928.
- Sestito, R., Madonna, S., Scarponi, C., Cianfarani, F., Failla, C.M., Cavani, A., Girolomoni, G., Albanesi, C. (2011). STAT3-dependent effects of IL-22 in human keratinocytes are counterregulated by sirtuin 1 through a direct inhibition of STAT3 acetylation. *Faseb J*, **25** (3), 916-927
- Sfikakis, P. P., Iliopoulos, A., Elezoglou, A., Kittas, C., and Stratigos, A. (2005). Psoriasis induced by anti-tumor necrosis factor therapy: a paradoxical adverse reaction. *Arthritis and rheumatism*, **52**(8), 2513-2518.

- Shibutani, S., Samejima, M., and Doi, S. (2004). Effects of stilbenes from bark of *Picea glehnii* (Sieb. et Zucc) and their related compounds against feeding behaviour of *Reticulitermes speratus* (Kolbe). *Journal of Wood Science*, **50**(5), 439-444.
- Shimada, T., Tokuhara, D., Tsubata, M., Kamiya, T., Kamiya-Sameshima, M., Nagamine, R., Takagaki, K., Sai, Y., Miyamoto, K., and Aburada, M. (2012). Flavanganol (pine bark extract) and its major component procyanidin B1 enhance fatty acid oxidation in fat-loaded models. *European journal of pharmacology*, **677**(1-3), 147-153.
- Shirakata, Y., Tohyama, M., Tsuda, T., Tan, E., Yahata, Y., Yamasaki, K., Tokumaru, S., Hanakawa, Y., Sayama, K., and Hashimoto, K. (2004). TNF-alpha, IL-1 alpha and IFN-alpha enhance IFN-gamma-induced fractalkine production in normal human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, **122**(3), A68-A68.
- Siegmund, B., Eigler, A., Moeller, J., Greten, T. F., Hartmann, G., and Endres, S. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-alpha production by interleukin-10 is enhanced by cAMP-elevating agents. *European journal of pharmacology*, **321**(2), 231-239.
- Silva, L. C., Ortigosa, L. C., and Benard, G. (2010). Anti-TNF-alpha agents in the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: mechanisms of action and pitfalls. *Immunotherapy*, **2**(6), 817-833.
- Singh, S., Natarajan, K., and Aggarwal, B. B. (1996). Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is a potent inhibitor of nuclear transcription factor-kappa B activation by diverse agents. *Journal of immunology*, **157**(10), 4412-4420.
- Simonetti, O., Ferretti, G., Offidani, A.M., Gervasi, P., Curatola, G., and Bossi, G. (1996). Plasma membrane fluidity of keratinocytes of normal and psoriatic skin: a study using fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH). *Arch Dermatol Res*. 288: 51-4
- Simonetti, O., Lucarini, G., Goteri, G., Zizzi, A., Biagini, G., Lo Muzio, L., and Offidani, A. (2006). VEGF is likely a key factor in the link between inflammation and angiogenesis in psoriasis: results of an immunohistochemical study. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **19**(4), 751-760.
- Slimestad, R. (2003). Flavonoids in buds and young needles of *Picea*, *Pinus* and *Abies*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**(11), 1247-1255.
- Smith, C. H., Jackson, K., Bashir, S. J., Perez, A., Chew, A. L., Powell, A. M., Wain, M., and Barker, J. N. (2006). Infliximab for severe, treatment-resistant psoriasis: a prospective, open-label study. *The British journal of dermatology*, **155**(1), 160-169.
- Smith, H. H. (1933). Ethnobotany of the Potawatomi Indians. *Bulletin of the Public Museum of Milwaukee*, **7**(1-230).
- Song, Z. J., Chen, W. Q., Du, X. Y., Zhang, H., Lin, L. J., and Xu, H. H. (2011). Chemical constituents of *Picea neveitchii*. *Phytochemistry*, **72**(6), 490-494.

- Spigno, G., and Faveri, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, **78**(3), 793-801.
- Spriggs, D. R., Deutsch, S., and Kufe, D. W. (1992). Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunology series*, **56**, 3-34.
- Spring, D. R. (2003) Diversity-oriented synthesis; a challenge for synthetic chemists. *Org Biomol Chem*, **1**, 3867-3870
- Strivastava, R. K., Unterman, T. G., and Shankar, S. (2010). FOXO transcription factors and VEGF neutralizing antibody enhance antiangiogenic effects of resveratrol. *Molecular and cellular biochemistry*, **337**(1-2), 201-212.
- Srividhya, B., Raj, V., and Subramanian, R. (2011). Determination of Catechins and Antioxidant Properties of Commercial Green and Black Teas. *Asian Journal of Chemistry*, **23**(10), 4603-4605.
- Stevanovic, T. (2005). Chimie du bois. CHM-22170. In U. Laval (Ed.), (pp. 6.6-6.20). Québec.
- Stevanovic, T., Diouf, P. N., and García-Pérez, M.E. (2009). Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. *Current Nutrition & Food Science*, **5**, 264-269.
- Stevanovic, T., and Perrin, D. (2009). Extractives. In PPUR (Ed.), *Chimie du bois*.
- Stevens, A., and Lowe, J. S. (2005). Human histology. In Elsevier/Mosby (Ed.). Philadelphia.
- Strimpakos, A. S., and Sharma, R. A. (2008a). Curcumin: Preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxidants & Redox Signaling*, **10**(3), 511-545.
- Strimpakos, A. S., and Sharma, R. A. (2008b). Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal*, **10**(3), 511-545.
- Strowd, L. C., Yentzer, B. A., Fleischer, A. B., Jr., and Feldman, S. R. (2009). Increasing use of more potent treatments for psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **60**(3), 478-481.
- Sugaya, M., Nakamura, K., Mitsui, H., Takekoshi, T., Saeki, H., and Tamaki, K. (2003). Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1. *J Dermatol Sci*, **31**(3), 179-187.
- Sun, C., McIntyre, K., Saleem, A., Haddad, P. S., and Arnason, J. T. (2012). The relationship between antiglycation activity and procyanidin and phenolic content in commercial grape seed products. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **90**(2), 167-174.

- Sur, R., Nigam, A., Grote, D., Liebel, F., and Southall, M. D. (2008). Avenanthramides, polyphenols from oats, exhibit anti-inflammatory and anti-itch activity. *Archives of dermatological research*, **300**(10), 569-574.
- Suzuki, M., Nakamura, T., Iyoki, S., Fujiwara, A., Watanabe, Y., Mohri, K., Isobe, K., Ono, K., and Yano, S. (2005). Elucidation of anti-allergic activities of curcumin-related compounds with a special reference to their anti-oxidative activities. *Biological & pharmaceutical bulletin*, **28**(8), 1438-1443.
- Szegedi, A., Aleksza, M., Gonda, A., Irinyi, B., Sipka, S., Hunyadi, J., and Antal-Szalmas, P. (2003). Elevated rate of Thelper1 (T(H)1) lymphocytes and serum IFN-gamma levels in psoriatic patients. *Immunology letters*, **86**(3), 277-280.
- Takaesu, G., Surabhi, R. M., Park, K. J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Gaynor, R. B. (2003). TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *Journal of molecular biology*, **326**(1), 105-115.
- Talamonti, M., Spallone, G., Di Stefani, A., Costanzo, A., and Chimenti, S. (2011). Efalizumab. *Expert opinion on drug safety*, **10**(2), 239-251.
- Tam, W. F., and Sen, R. (2001). IkappaB family members function by different mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, **276**(11), 7701-7704.
- Tammela, P., Ekokoski, E., Garcia-Horsman, A., Talman, V., Finel, M., Tuominen, R., and Vuorela, P. (2004). Screening of natural compounds and their derivatives as potential protein kinase C inhibitors. *Drug Development Research*, **63**(2), 76-87.
- Tanew, A., Guggenbichler, A., Honigsmann, H., Geiger, J. M., and Fritsch, P. (1991). Photochemotherapy for severe psoriasis without or in combination with acitretin: a randomized, double-blind comparison study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **25**(4), 682-684.
- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., Reynolds, C., Figari, I. S., Weber, R. F., Fendly, B. M., and Palladino, M. A., Jr. (1993a). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *Journal of immunology*, **151**(9), 4637-4641.
- Tartaglia, L. A., Pennica, D., and Goeddel, D. V. (1993b). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *The Journal of biological chemistry*, **268**(25), 18542-18548.
- Teepe, R.G., Koegrugge, E.J., Clemens, W., Lowik, G.M., Pieter, L., Petit, L.C., Bosboom, R.W., Twiss, I.M., Boxman, H., Vermer, B.J., and Ponc, M. (1993). Cytotoxic effects of topical antimicrobial and antiseptic agents on human keratinocytes in vitro. *The journal of trauma*. **35**, 8-19



- ten Hove, T., van Montfrans, C., Peppelenbosch, M. P., and van Deventer, S. J. (2002). Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*, **50**(2), 206-211.
- Thangapazham, R. L., Sharma, A., and Maheshwari, R. K. (2007). Beneficial role of curcumin in skin diseases. *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, **595**, 343-357.
- Thompson, D. A., and Tan, B. B. (2006). Tetrahydracurcumin-related allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, **55**(4), 254-255.
- Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. (1995). I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell*, **80**(4), 573-582.
- Thornfeldt, C. (2005). Cosmeceuticals containing herbs: fact, fiction, and future. *Dermatol Surg*, **31**(7 Pt 2), 873-880; discussion 880.
- Tisler, V., Galla, E., and Pulkkinen, E. (1986). Fractionation of hot water extract from *Picea abies* Karst bark. *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, **44**(11), 427-431.
- Tonel, G., and Conrad, C. (2009). Interplay between keratinocytes and immune cells--recent insights into psoriasis pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **41**(5), 963-968.
- Trompezinski, S., Denis, A., Schmitt, D., and Viac, J. (2003). Comparative effects of polyphenols from green tea (EGCG) and soybean (genistein) on VEGF and IL-8 release from normal human keratinocytes stimulated with the proinflammatory cytokine TNFalpha. *Archives of dermatological research*, **295**(3), 112-116.
- Tsai, E. Y., Jain, J., Pesavento, P. A., Rao, A., and Goldfeld, A. E. (1996). Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Molecular and cellular biology*, **16**(2), 459-467.
- Turkmen, N., Sari, F., and Velioglu, Y. S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, **99**(4), 835-841.
- Ulanova, M., Marcet-Palacios, M., Munoz, S., Asfaha, S., Kim, M. K., Schreiber, A. D., and Befus, A. D. (2006). Involvement of Syk kinase in TNF-induced nitric oxide production by airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**(2), 431-437.
- Ulrich, A., Koch, C., Speitling, M., and Hansske, F.G. (2002). Modern methods to produce natural-product libraries. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**, 453-458

- Underwood, C. D. T., and Pearce, R. B. (1991). Astringin and isorhapontin distribution in sitka spruce trees. *Phytochemistry*, **30**(7), 2183-2189.
- Utas, S., Köse, K., Yazici, C., Akdaş, A., Keleştimur, F. (2002). Antioxidants potential of propylthiouracil in patients with psoriasis. *Clinical Biochemistry*, **35**, 241-246
- Uyemura, K., Yamamura, M., Fivenson, D. F., Modlin, R. L., and Nickoloff, B. J. (1993). The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol*, **101**(5), 701-705.
- Valdimarsson, H., Thorleifsdottir, R. H., Sigurdardottir, S. L., Gudjonsson, J. E., and Johnston, A. (2009). Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends in immunology*, **30**(10), 494-501.
- Vallat, V. P., Gilleaudeau, P., Battat, L., Wolfe, J., Nabeya, R., Heftler, N., Hodak, E., Gottlieb, A. B., and Krueger, J. G. (1994). PUVA bath therapy strongly suppresses immunological and epidermal activation in psoriasis: a possible cellular basis for remittive therapy. *The Journal of experimental medicine*, **180**(1), 283-296.
- van de Kerkhof, P. C. (1995). Biological activity of vitamin D analogues in the skin, with special reference to antipsoriatic mechanisms. *The British journal of dermatology*, **132**(5), 675-682.
- Van de Kerkhof, P. C., Gerritsen, M. J., and de Jong, E. M. (1996). Transition from symptomless to lesional psoriatic skin. *Clinical and experimental dermatology*, **21**(5), 325-329.
- Van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R. E., and Libert, C. (2011). Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **22**(5-6), 311-319.
- van Rossum, M. M., Mommers, J. M., van de Kerkhof, P. C., and van Erp, P. E. (2000). Coexpression of keratins 13 and 16 in human keratinocytes indicates association between hyperproliferation-associated and retinoid-induced differentiation. *Archives of dermatological research*, **292**(1), 16-20.
- van Ruissen, F., de Jongh, G. J., van Erp, P. E., Boezeman, J. B., and Schalkwijk, J. (1996). Cell kinetic characterization of cultured human keratinocytes from normal and psoriatic individuals. *Journal of cellular physiology*, **168**(3), 684-694.
- Vandermeeren, M., Daneels, G., Bergers, M., van Vlijmen-Willems, I., Pol, A., Geysen, J., and Schalkwijk, J. (2001). Development and application of monoclonal antibodies against SKALP/elafin and other trappin family members. *Archives of dermatological research*, **293**(7), 343-349.
- Veale, D., Rogers, S., and Fitzgerald, O. (1995). Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin. *Br J Dermatol*, **132**(1), 32-38.

- Vergou, T., Moustou, A. E., Sfikakis, P. P., Antoniou, C., and Stratigos, A. J. (2011). Pharmacodynamics of TNF-alpha inhibitors in psoriasis. *Expert review of clinical pharmacology*, **4**(4), 515-523.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *The EMBO journal*, **22**(6), 1313-1324.
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in biochemical sciences*, **30**(1), 43-52.
- Victor, F. C., and Gottlieb, A. B. (2002). TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *Journal of drugs in dermatology : JDD*, **1**(3), 264-275.
- Wada, S., Yasui, Y., Tokuda, H., and Tanaka, R. (2009). Anti-tumor-initiating effects of phenolic compounds isolated from the bark of *Picea jezoensis* var. *jezoensis*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **17**(17), 6414-6421.
- Wada, S. I., Yasui, Y., Hitomi, T., and Tanaka, R. (2007). Structures and radical-scavenging activities of phenolic constituents from the bark of *Picea jezoensis* var. *jezoensis*. *Journal of natural products*, **70**(10), 1605-1610.
- Wadsworth, T. L., and Koop, D. R. (1999). Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical pharmacology*, **57**(8), 941-949.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., and Oatis, J.E. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, **32** (12): 1377-1382
- Walsh, D. S., Borke, J. L., Singh, B. B., Do, N. N., Hsu, S. D., Balagon, M. V., and Abalos, R. M. (2005). Psoriasis is characterized by altered epidermal expression of caspase 14, a novel regulator of keratinocyte terminal differentiation and barrier formation. *Journal of dermatological science*, **37**(1), 61-63.
- Wang, H., T. Peters, D. Kess, A. Sindrilaru, T. Oreshkova, N. Van Rooijen, A. Stratis, A. C. Renkl, C. Sunderkotter, M. Wlaschek, et al. (2006). Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J. Clin. Invest.* **116**, 2105-2114.
- Wang, H., Syrovets, T., Kess, D., Buchele, B., Hainzl, H., Lunov, O., Weiss, J. M., Scharffetter-Kochanek, K., and Simmet, T. (2009). Targeting NF-kappa B with a natural triterpenoid alleviates skin inflammation in a mouse model of psoriasis. *J Immunol*, **183**(7), 4755-4763.

- Wang, L.X., Heredia, A., Song, H., Zhang, Z., Yu, B., Davis, C., and Redfield, R. (2004). Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *J Pharm Sci* **93** (10): 2448–57.
- Weber, H. A., Hodges, A. E., Guthrie, J. R., O'Brien, B. M., Robaugh, D., Clark, A. P., Harris, R. K., Algaier, J. W., and Smith, C. S. (2007). Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants: grape seed and pine bark extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, **55**(1), 148-156.
- Wei, L., Debets, R., Hegmans, J. J., Benner, R., and Prens, E. P. (1999). IL-1 beta and IFN-gamma induce the regenerative epidermal phenotype of psoriasis in the transwell skin organ culture system. IFN-gamma up-regulates the expression of keratin 17 and keratinocyte transglutaminase via endogenous IL-1 production. *The Journal of pathology*, **187**(3), 358-364.
- Whiteside, S. T., Epinat, J. C., Rice, N. R., and Israel, A. (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *The EMBO journal*, **16**(6), 1413-1426.
- Wiedow, O., Wiese, F., and Christophers, E. (1995). Lesional elastase activity in psoriasis. Diagnostic and prognostic significance. *Archives of dermatological research*, **287**(7), 632-635.
- Wilhelm, K.P., Bottjer B., and Siegers, C.P. (2001). Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation tests. *British Journal of Dermatology*. **145**, 709–715.
- Willfor, S., Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C., and Holmbom, B. (2003). Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung*, **57**(1), 27-36.
- Willfor, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M., and Holmbom, B. (2004). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. *Holzforschung*, **58**(4), 335-344.
- Wolff, K., and Holubar, K. (1967). [Odland bodies (Membrane coating granules, keratinosomes) as epidermal lysosomes. An electron microscopic-cytochemical contribution on the cornification process of the skin]. *Archiv fur klinische und experimentelle Dermatologie*, **231**(1), 1-19.
- Wu, C. L., Feng, D. R., Ma, H. L., Xie, H., Wang, H. B., and Wang, J. F. (2009). Effect of *Pinus massoniana* bark extract on IFN-gamma-induced ICAM-1 expression in HaCaT human keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**(1), 48-53.
- Wysocki, A. B. (1999). Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *The Nursing clinics of North America*, **34**(4), 777-797, v.

- Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economou, M., Fotsis, T., and Roussos, C. (2001). Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **296**(1), 181-187.
- Xia, Z. Q., Costa, M. A., Proctor, J., Davin, L. B., and Lewis, N. G. (2000). Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry*, **55**(6), 537-549.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., and Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*, **93**(7), 1231-1240.
- Yang, D. Q., Wang, X. M., Shen, J., and Wan, H. (2004). A rapid method for evaluating antifungal properties of various barks. *Forest Products Journal*, **54**(6), 37-39.
- Yawalkar, N., and Braathem, L. R. (2006). Le psoriasis vulgaire: de la pathogenese au traitement. *Forum Med Suisse*, **6**, 549-554.
- Yesilada, E. (2008). Novel drug leads from Turkish medicinal plants with diverse pharmacological effects. *Drugs of the Future*, **33**(8), 673-680.
- Yildirim, M., Inaloz, H.S., Baysal, V., and Delibas, N. (2003). The role of oxidants and antioxidants in psoriasis. *JEADV*, **17**, 34-37
- Younes, R.N., Varella, A.D., and Suffredini, I.B. (2007). Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. *Clinics*, **62** : 763-68
- Young, C. N., Koepke, J. I., Terlecky, L. J., Borkin, M. S., Boyd Savoy, L., and Terlecky, S. R. (2008). Reactive oxygen species in tumor necrosis factor-alpha-activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. *The Journal of investigative dermatology*, **128**(11), 2606-2614.
- Young, H. S., Summers, A. M., Read, I. R., Fairhurst, D. A., Plant, D. J., Campalani, E., Smith, C. H., Barker, J. N., Detmar, M. J., Brenchley, P. E., and Griffiths, C. E. (2006). Interaction between genetic control of vascular endothelial growth factor production and retinoid responsiveness in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*, **126**(2), 453-459.
- Yu, C. S. (2011). Study on HIF-1alpha Gene Translation in Psoriatic Epidermis with the Topical Treatment of Capsaicin Ointment. *ISRN pharmaceutics*, **2011**, 821874.
- Yu, J., Yu, D. W., Checkla, D. M., Freedberg, I. M., and Bertolino, A. P. (1993). Human hair keratins. *The Journal of investigative dermatology*, **101**(1 Suppl), 56S-59S.

- Yuan, C. J., Huang, C. Y., and Graves, D. J. (1993). Phosphorylase kinase, a metal ion-dependent dual specificity kinase. *The Journal of biological chemistry*, **268**(24), 17683-17686.
- Zachariae, H., Zachariae, R., Blomqvist, K., Davidsson, S., Molin, L., Mork, C., and Sigurgeirsson, B. (2001). Treatment of psoriasis in the Nordic countries: a questionnaire survey from 5739 members of the psoriasis associations data from the Nordic Quality of Life Study. *Acta dermato-venereologica*, **81**(2), 116-121.
- Zandi, E., and Karin, M. (1999). Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. *Molecular and cellular biology*, **19**(7), 4547-4551.
- Zegarska, B., Lelinska, A., and Tyrakowski, T. (2006). Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacological reports : PR*, **58**(1), 13-21.
- Zhang, D. L., Li, X. A., Hao, D. X., Li, G. S., Xu, B. M., Ma, G. H., and Su, Z. G. (2009). Systematic purification of polydatin, resveratrol and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. *Separation and Purification Technology*, **66**(2), 329-339.
- Zhang, X. J., Yan, K. L., Wang, Z. M., Yang, S., Zhang, G. L., Fan, X., Xiao, F. L., Gao, M., Cui, Y., Wang, P. G., Sun, L. D., Zhang, K. Y., Wang, B., Wang, D. Z., Xu, S. J., Huang, W., and Liu, J. J. (2007). Polymorphisms in interleukin-15 gene on chromosome 4q31.2 are associated with psoriasis vulgaris in Chinese population. *The Journal of investigative dermatology*, **127**(11), 2544-2551.
- Zhao, B., and Hall, C. A. (2008). Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chemistry*, **108**(2), 511-518.
- Zhao, J. F., Zhang, Y. J., Jin, X. H., Athar, M., Santella, R. M., Bickers, D. R., and Wang, Z. Y. (1999). Green tea protects against psoralen plus ultraviolet A-induced photochemical damage to skin. *Journal of Investigative Dermatology*, **113**(6), 1070-1075.
- Zheng Y., Danilenko D.M., Valdez P., Kasman I., Eastham-Anderson J., Wu J. Ouyang W. (2007) Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, **445**, 648–651
- Zheng, Z. M., and Specter, S. C. (1996). Delta-9-tetrahydrocannabinol suppresses tumor necrosis factor alpha maturation and secretion but not its transcription in mouse macrophages. *International journal of immunopharmacology*, **18**(1), 53-68.
- Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Molecular cell*, **1**(5), 661-671.

- Zhou, H. Y., Beevers, C. S., and Huang, S. L. (2011). The Targets of Curcumin. *Current Drug Targets*, **12**(3), 332-347.
- Zhou, S., Koh, H. L., Gao, Y., Gong, Z. Y., and Lee, E. J. (2004). Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life sciences*, **74**(8), 935-968.
- Zhou, X., Krueger, J. G., Kao, M. C., Lee, E., Du, F., Menter, A., Wong, W. H., and Bowcock, A. M. (2003). Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiological genomics*, **13**(1), 69-78.
- Zollner, T. M., Podda, M., Pien, C., Elliott, P. J., Kaufmann, R., and Boehncke, W. H. (2002). Proteasome inhibition reduces superantigen-mediated T cell activation and the severity of psoriasis in a SCID-hu model. *The Journal of clinical investigation*, **109**(5), 671-679.

## **Annexes**

### **Annexe 1. Développement de médicaments antipsoriatiques: défis et nouveaux traitements**



**Avant-propos**

Cette annexe fait l'objet d'un article intitulé *Antipsoriatic drug development: challenges and new emerging therapies* qui a été publié dans *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 6 : 3-21, 2012

J'ai effectué la revue de la littérature et la rédaction de cet article. Jessica Jean a apporté des corrections qui ont contribué à son amélioration. La rédaction de cet article a été réalisée sous la supervision de la Dre Roxane Pouliot.

## Résumé

Le psoriasis est une maladie de la peau qui touche plus de 2% de la population mondiale, caractérisée par la présence de plaques rouges généralement visibles ayant des répercussions importantes sur les fonctions physiques et psychologiques des patients atteints. Dans le contexte du psoriasis, l'interaction entre les lymphocytes T pathogéniques, les cellules présentatrices d'antigènes et les kératinocytes est responsable de la perpétuation de cette maladie via la production accrue de cytokines, chimiokines et d'autres médiateurs pro-inflammatoires. Bien qu'il existe plusieurs thérapies pour le traitement du psoriasis, cette maladie ne peut pas encore être complètement guérie et les patients sont très insatisfaits, ce qui a été démontré par des sondages effectués au niveau mondial. À la différence d'autres maladies, le psoriasis ne dispose pas d'un modèle animal représentatif, ce qui complique l'introduction de nouveaux médicaments antipsoriatiques dans des études cliniques. De plus, il touche des enfants et des personnes âgées qui, dans plusieurs cas, requièrent des longs traitements. De ce fait, le développement de nouvelles thérapies doit considérer plusieurs facteurs reliés à l'efficacité, la posologie, la voie d'administration et la toxicité des traitements aussi bien qu'aux comorbidités présentes chez les patients. Cet article analyse les défis actuels reliés au développement de nouveaux médicaments antipsoriatiques. De plus, il contient une révision des nouveaux produits antipsoriatiques décrits dans des brevets publiés entre les années 2000 et 2011. Finalement, les perspectives futures pour le développement de nouvelles thérapies pour le traitement de cette maladie sont discutées.

**Article****Antipsoriatic drug development: challenges and new emerging therapies**

Martha-Estrella García-Pérez<sup>1</sup>, Jessica Jean<sup>1</sup>, Roxane Pouliot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre LOEX de l'Université Laval, Génie tissulaire et régénération : LOEX - Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec, Aile-R, 1401 18<sup>e</sup> rue, Québec, Québec, Canada, G1J 1Z4 and Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, G1V 0A6, Canada

**Address for reprint requests:**

Roxane Pouliot, Ph.D

Centre LOEX de l'Université Laval, Génie tissulaire et régénération: LOEX - Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec, Aile-R, 1401 18<sup>e</sup> rue, Québec, Qc, Canada, G1J 1Z4 and Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6. (1) 418 990 8255 ext. 1706. Fax: (1) 418 990 8248

E-mail address: [roxane.pouliot@pha.ulaval.ca](mailto:roxane.pouliot@pha.ulaval.ca)

**Abstract**

Psoriasis is a chronic recurring skin disorder affecting up to 2% of the world's population. Psoriatic lesions are generally visible, leading to significant emotional and social disabilities for patients. In the context of psoriasis, the orchestrated interplay between activated T cells, antigen-presenting cells and keratinocytes leads to the release of proinflammatory cytokines, chemokines and chemical mediators responsible for the perpetuation of this disease. Even though some therapies are available for psoriasis treatment, there is still no cure for this skin disorder and psoriatic patients are significantly unsatisfied, as demonstrated by recent worldwide surveys. Unlike other diseases, psoriasis does not have a generally accepted animal model, which complicates the successful introduction of new antipsoriatic drugs into clinical phases of development. Moreover, psoriasis affects infants, children and elderly patients which require long-term therapies. Thus, the development of new therapeutic approaches should consider multiple factors such as efficacy, dosing frequency, route of administration, toxicity as well as co-morbidities of patients. This article analyzes current challenges for the antipsoriatic drug development and reviews recent patent applications gathered from 2000 to 2011 for psoriasis treatment. Additionally, future perspectives for antipsoriatic drug development are summarized.

## Introduction

Psoriasis is a skin disorder with macroscopic alterations affecting up to 2% of the world's population (Christophers, 2001). It is probably one of the most misunderstood skin diseases. The most common form of the disease is plaque psoriasis, which affects about 90% of patients. From these patients, approximately 20% have moderate or severe disease (Gelfand *et al.*, 2005; Stern *et al.*, 2004). Psoriasis may start at any age and generally the incidence peaks occur in the second and third decades of life. The diagnosis is usually based on the recognition of well demarcated, erythematous, scaly plaques with predilection for the scalp, the limbs and the trunk. These lesions are often visible, resulting in important physical, emotional and social disabilities for patients (Krueger *et al.*, 2001).

Despite the advances made in psoriasis therapy in the past decades, there is still no cure for this disease and all existing therapies have distinct limitations. Large patient surveys, conducted by the National Psoriasis Foundation (Krueger *et al.*, 2001) and by the European Union Federation of Psoriasis Associations (Dubertret *et al.*, 2006), have highlighted the significant patient dissatisfaction with available therapeutic options. Antipsoriatic treatments primarily depend on the severity of the disease or the extent of involvement, whereas other factors such as cost of therapy, adverse effects, patient preference and availability are also considered (Su and Fang, 2008).

Conventional nonbiological therapies for moderate to severe psoriasis, such as cyclosporine, methotrexate and phototherapy, have proved to be effective in suppressing symptoms. However, because of the chronic nature of this disease, many patients require lifelong treatments (Papp, 2006). The long-term use of these agents may be thus limited by their adverse effects (Griffiths *et al.*, 2000; Naldi and Griffiths, 2005), which include nephrotoxicity (cyclosporine) (Naldi and Griffiths, 2005), hepatotoxicity (methotrexate) (Griffiths *et al.*, 2000), skin cancer (psoralen-ultraviolet A phototherapy) (Nijsten and Stern, 2003), myelosuppression (hydroxyurea) (Yamauchi *et al.*, 2003), lymphocytopenia (fumaric acid esters) and teratogenicity (oral retinoids) (Gollnick and Dummer, 1997). Although available data suggests that conventional nonbiological treatments can be reasonably safe when used with appropriate monitoring for side effects (Stern *et al.*, 2004), the minimization of toxicity while still providing continuous control of psoriasis symptoms

over a patient's lifetime represents a clinical challenge in terms of time, costs and inconvenience.

Recently, an improved understanding of the immunologic basis of psoriasis led to the development of several targeted biological therapies. Thus, two main therapeutic approaches have emerged: treatments modulating T cell activity (alefacept, efalizumab, ustekinumab) or tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) cytokine (etanercept, infliximab, adalimumab) (Kirby and Griffiths, 2002). Phase I-III clinical trials conducted over the last two decades have demonstrated that these treatments provide significant clinical benefits for psoriatic patients (Gordon *et al.*, 2003; Gottlieb *et al.*, 2003; Leonardi *et al.*, 2003; Ortonne, 2003), being relatively safe during short and intermediate-term administration. Nevertheless, the primary concern regarding long-term safety of biologicals is the risk of immunosuppression, which can lead to the development of infections or malignancies. Thus, active tuberculosis has been reported in patients who received different TNF- $\alpha$  inhibitors (Gardam *et al.*, 2003; Keane *et al.*, 2001). Furthermore, rare events of reversible neurologic and demyelinating disorders as well as heart failure have also been reported after TNF- $\alpha$  inhibition (Kwon *et al.*, 2003; Mohan *et al.*, 2001). Additionally, treatment with infliximab has been associated with the formation of neutralizing antibodies, leading some patients to require higher doses in order to maintain efficacy (Baert *et al.*, 2003). Since psoriasis is incurable, discontinuation of treatments eventually leads to a rebound with a rapid worsening of the disease, as it has been observed with nonbiologic and biologic therapies (Boyd and Menter, 1989; Carey *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2005; Kamarashev *et al.*, 2002).

Overall, most of the available approaches for treating psoriasis present side effects and do not lead to a complete regression of the disease in a significant proportion of patients. Therefore, there is a need for new, safe and effective treatments in order to improve quality of life for psoriatic patients.

In this review, the characteristics and the physiopathology of psoriatic skin will be firstly summarized on the basis of current concepts of the pathogenesis. In addition, the quality of life for psoriatic patients and their satisfaction with current therapies, taking into account recent worldwide surveys, will be analyzed. As a logical follow-through, some recent

patents that bear on new antipsoriatic compounds will be presented. These patent applications, gathered from 2000 to 2011, have been categorized as follows: a) natural preparations exhibiting antipsoriatic activity; b) pure chemical compounds exhibiting antipsoriatic activity. Finally, the ongoing challenges in the search for new antipsoriatic compounds and the perspectives for antipsoriatic drug development will be summarized.

### **Characteristics and physiopathology of psoriatic skin**

Various histopathological changes make psoriasis stand apart from other inflammatory skin diseases: epidermis hyperplasia (acanthosis) with loss of the granular layer, regular elongation of the *rete* ridges, thickening of the cornified layer (hyperkeratosis), infiltration of many different leukocytes, increased vascularization in the dermis and keratinocyte hyperproliferation (Tonel and Conrad, 2009).

Additionally, psoriasis is characterized by an abnormal keratinocyte differentiation, which has implications on its pathogenesis. This anomalous differentiation includes the overexpression of the enzyme transglutaminase type I and of involucrin, leading to the excessive cornification and premature formation of the cornified envelope observed in psoriatic lesions (Ishida-Yamamoto and Iizuka, 1995). It also includes the overexpression of elafin, which acts as a substrate for transglutaminase (Ishida-Yamamoto and Iizuka, 1995). Keratin (K) expression is also disrupted in psoriasis (McKay and Leigh, 1995). K6 and K16 are upregulated in psoriatic epidermis, whereas K1 and K10, markers of terminal differentiation, are downregulated (McKay and Leigh, 1995). Filaggrin and loricrin, normally found in the granular layer of the skin, are absent in psoriatic lesions (Iizuka *et al.*, 2004).

Although the initial event responsible for the formation of psoriatic lesions is still unknown, external triggers such as physical trauma (known as the Koebner phenomenon), infection, stress, drugs, alcohol and smoking can all induce an initial episode of psoriasis in individuals genetically predisposed (Bowcock and Krueger, 2005). These initial triggers can activate dendritic cells (DCs), such as Langerhans cells or plasmacytoid DCs (pDCs) and induce their migration to skin-draining lymph nodes. At this site, antigen-specific T cells are primed by the migrated skin DCs to differentiate into effector T cells. These

activated T cells then traffic to the skin where they induce (together with pDCs, dermal DCs and other cells) the formation of psoriatic plaques. Some T cells and DCs start to infiltrate the epidermis and release pro-inflammatory cytokines, which in turn stimulate keratinocyte cells (KCs) (Bowcock and Krueger, 2005). In fact, one of the earliest events driving the development of psoriatic lesions is the secretion of interferon alpha (INF- $\alpha$ ) from pDCs and the production of TNF- $\alpha$  by cells of the innate and adaptive immune system (Nestle *et al.*, 2005). Large amounts of INF- $\alpha$  released by pDCs induce activation of the local immune effector cells, enabling them to secrete cytokines that further promote the inflammatory cascade. TNF- $\alpha$  is a highly active cytokine of the inflammatory infiltrate and is mainly released by activated macrophages, dermal DCs and, to a lesser extent, by keratinocyte and T cells. The high levels of TNF- $\alpha$  lead to the maturation of DCs into potent antigen presenting cells (APCs) and, in conjunction with other cytokines, to an up-regulated expression of adhesion molecules such as the endothelial E-selectin and intercellular adhesion molecule (ICAM-1) that further attract T cells into the skin (Tonel and Conrad, 2009).

Cytokine interactions in psoriasis have been described as a type-1 pathway, where inducers such as interleukin-23 (IL-23) or IL-12 stimulate the production of INF and TNF by type-1 T cells via a downstream activation of numerous genes through the activation of transcription factors such as the transducer and activator of transcription 1 (STAT1), STAT3 and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Lowes *et al.*, 2007). Many immunederived cytokines such as IL-1, IL-6, IL-17, IL-19, IL-20, IL-22, TNF and INFs also regulate keratinocyte proliferation (Lowes *et al.*, 2007). IL-17 can promote the accumulation of neutrophils and impact barrier function (Watanabe *et al.*, 2009), whereas intradermal injection of IL-23 in mice induces the development of epidermal acanthosis as well as the production of IL-17 and IL-22 (Zheng *et al.*, 2007).

Keratinocyte-derived cytokines, such as platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), influence the growth of stromal cells. Activated stromal cells overproduce factors such as keratinocyte growth factor (KGF) that can then induce keratinocyte proliferation (Finch *et al.*, 1997). Neutrophils are also present in early and active psoriatic lesions. Spongiform pustules (micropustules of Kogoj) can be observed



in the epidermis as well as microabscesses of neutrophils in the *stratum corneum*, surrounded by a parakeratotic *stratum corneum* (Munro's microabscesses) (van de Kerkhof, 2007). Human leukocyte-derived elastase is released from neutrophils and has been shown to induce keratinocyte hyperproliferation (Rogalski *et al.*, 2002). The chemokines such as IL-8, the growth-regulated oncogene- $\alpha$  and the S100A7/A8/A9 proteins from keratinocyte produce a chemotactic gradient for the migration of neutrophils into the epidermis (Krueger, 2002). Taken together, the sum of these complex cellular interactions creates the tissue profile which characterizes psoriatic skin.

### **Psoriatic patient's quality of life: are patients satisfied with available therapies?**

Psoriasis is not just a cosmetic problem. Even patients with limited disease involvement find it a big problem in their life (Stern *et al.*, 2004) and surveys clearly demonstrate that this disease has a moderate to great negative impact on their quality of life (Christophers *et al.*, 2006; Dubertret *et al.*, 2006). Furthermore, this skin disorder causes a disability among patients comparable to other chronic illnesses (Rapp *et al.*, 1999). Individuals suffering from psoriasis present high rates of depression and experience psychological distress as a result of stigmatization, self-consciousness and embarrassment; thereby affecting their sexual functioning, productivity and implication in social activities (Gupta and Gupta, 1997; Van Voorhees and Fried, 2009). Absenteeism from the workplace is a concern for these persons, with nearly 60% of the patients reporting missing an average of 26 days a year directly related to their psoriasis (de Arruda and De Moraes, 2001). Psoriatic patients commonly cover their lesions and avoid contact with people in order to evade unpleasant social consequences, leading them to social isolation (Pearce *et al.*, 2006). Additionally, it has been reported that at least 20% of patients contemplate suicide (Krueger *et al.*, 2001). Gupta *et al.* in their study of 127 psoriatic individuals, reported that 9.7% of patients wished to be dead while 5.5% reported active suicidal ideation at the time of the study (Gupta *et al.*, 1993).

On the other hand, psoriatic patients incur greater health care costs compared with the general population (\$5529 vs. \$3509) and these costs increase with psoriasis severity related to the management of symptoms such as itching, burning and pain (Sampogna *et al.*, 2004). A study conducted with 56 528 psoriatic patients in the United States demonstrated

that patients with moderate to severe psoriasis had greater total health care costs than patients with mild psoriasis (\$10 593 vs. \$5011), including greater medical costs (\$5854 vs. \$3728) and drug costs (\$4738 vs. \$1283) (Yu *et al.*, 2009). Moreover, compared to the general population, psoriatic patients present an increased risk of mortality (Gelfand *et al.*, 2007; Gulliver, 2008) and co-morbidities including psoriatic arthritis, cardiovascular disease, depression, diabetes, hyperlipidemia, hypertension, obesity, cerebrovascular disease, and peripheral vascular disease (Yu *et al.*, 2009). On the whole, psoriatic patients have a higher financial and psychological burden than the general healthy population (Finlay and Coles, 1995), with negative repercussions on their quality of life (Feldman *et al.*, 1997).

Previous research suggests that the lack of effective and safe treatments is a very important factor contributing to the decreased quality of life of these patients, mainly of those with moderate and severe disease (Carrascosa *et al.*, 2006). In a cross-sectional study with 1210 psoriatic patients, it was demonstrated that daily treatment time, treatment benefit, disease severity and treatment satisfaction are related with quality of life for these individuals (Blome *et al.*, 2010). Thus, it has been recognized that the use of effective drugs may lead to fewer interventions, fewer inpatient admissions and greater productivity (Carrascosa *et al.*, 2006). This finding suggests that the development of more effective and safer treatments may have substantial benefits for the clinical aspect, quality of life, and economics of psoriatic patients and society.

Conventional antipsoriatic treatment paradigms involve a stepwise approach based on disease severity in which topical therapies are firstly prescribed, followed by phototherapy, systemic medications and then biologic agents (van de Kerkhof, 2006). Table 18 lists therapeutic antipsoriatic treatments as well as some reported adverse effects associated with their use. Known topical psoriasis treatments include: vitamin D analogues, topical corticosteroids, anthralin, tar-based preparations, salicylic acid and topical retinoids (Fluhr *et al.*, 2008). Lack of effective delivery of drugs in topical formulations and undesirable skin interactions (Smith and Lebwohl, 2000) are important reasons for patient noncompliance (Fouere *et al.*, 2005). In the case of phototherapy, an increased risk of malignant skin cancer and melanoma has been reported after its long-term use (Lebwohl

and Ali, 2001a). Concerns also exist about the toxicity of systemic treatments (methotrexate, acitretin, cyclosporine A, fumaric acid esters, sulfasalazine and hydroxyurea) and their use is limited by interindividual variability in response (Warren *et al.*, 2009). Moreover, the experience with biologic treatments such as alefacept, efalizumab and ustekinumab or TNF- $\alpha$  antagonists (infliximab, etanercept and adalimumab) is still incomplete regarding their efficacy, safety for long term therapy and use in combination with other antipsoriatic agents. As a consequence, 40% of psoriatic patients report non-adherence to their medication (Richards *et al.*, 1999) and the results of worldwide surveys show a high level of dissatisfaction with available therapeutic approaches (Table 19).

Table 18 Undesirable effects of available antipsoriatic treatments.

	Psoriasis treatment	Reported side effects	References
<b>Topical</b>	Vitamin D analogues	Irritation	(Lamba and Lebwohl, 2001)
	Retinoids	Pruritus, erythema and burning sensation	(Weinstein <i>et al.</i> , 2003; Weinstein <i>et al.</i> , 1997)
	Corticosteroids	Tachyphylaxis, cutaneous atrophy	(Smith and Lebwohl, 2000)
	Anthralin	Erythema	(Smith and Lebwohl, 2000)
	Tar-based preparations	Photosensitivity	(Smith and Lebwohl, 2000)
	Urea	Irritation	(Smith and Lebwohl, 2000)
	Salicylic acid	Irritation	(Smith and Lebwohl, 2000)
<b>Phototherapy</b>	Broadband UVB	Burns, erythema, photoaging	(Honigsmann, 2001)
	Narrowband UVB	Burns, photoaging	(Honigsmann, 2001)

	Excimer Laser	Erythema, hyperpigmentation, blister, erosion and pain	(Rodewald <i>et al.</i> , 2002)
	PUVA therapy	Nausea, phototoxicity malignant skin cancer	(Lebwohl and Ali, 2001a; Stern and Lange, 1988)
<b>Systemic</b>	Methotrexate	Nausea, mucosal ulceration, erectile dysfunction, stomatitis, hepatotoxicity	(Lebwohl and Ali, 2001b; Wylie <i>et al.</i> , 2009)
	Acitretin	Teratogenesis	(DiGiovanna <i>et al.</i> , 1995) (Lowe <i>et al.</i> , 1996)
	Cyclosporine A	Nephrotoxicity, hypertension	(Mrowietz <i>et al.</i> , 1999)
	Fumaric acid esters	Abdominal pain and diarrhea	
	Sulfasalazine	Headache, gastrointestinal symptoms or rash	(A. K. Gupta <i>et al.</i> , 1990)
	Hydroxyurea	Bone marrow toxicity with leucopenia or thrombocytopenia	(Lebwohl and Ali, 2001b)
<b>Biologics</b>	Alefacept	Headache, pruritus, infection, pharyngitis and rhinitis	(Ortonne, 2003)
	Efalizumab	Psoriasis rebound, erythroderma, demyelinating disease	(Pugashetti and Koo, 2009; Puig <i>et al.</i> , 2009)
	Ustekinumab	Respiratory tract	(Gottlieb <i>et al.</i> , 2007)

	infection, chest pain, gastric ulcer haemorrhage	
Infliximab	Infusion reactions, infections, increased risk for malignancies, headache, vertigo/dizziness, abdominal pain, diarrhea, nausea and dyspepsia	(Caviglia <i>et al.</i> , 2008; Kemta Lekpa <i>et al.</i> , 2009)
Etanercept	Injection-site reactions, rash, pneumonia, interstitial lung disease	(Horneff <i>et al.</i> , 2009; Koike <i>et al.</i> , 2009)
Adalimumab	Injection-site reactions, increased risk of opportunistic infections such as histoplasmosis, coccidioidomycosis, listeriosis, and pneumocystis, risk of lymphoproliferative diseases and malignancies	(Bongartz <i>et al.</i> , 2006; Callen, 2007)

In 1998, a self-administered questionnaire was mailed to the entire membership of the National Psoriasis Foundation (n = 40 350) and followed by a telephone survey of patients with severe disease (Krueger *et al.*, 2001). Younger responders (18-54-year age range) reported a greater negative impact of psoriasis in their quality of life than those of 55 years and older, including difficulties in the workplace as well as contemplation of suicide. Of the 40 350 questionnaires mailed out, a response rate of 43% was achieved. Although 48% of responders were very or fairly satisfied with psoriasis treatments, a nearly similar number of patients (49%) reported that they were only somewhat or not at all satisfied

(Krueger *et al.*, 2001). In the case of severely affected patients, 78% reported that their treatment did not function well enough, thereby leading them to a great frustration (Krueger *et al.*, 2001). In the late 2001, the National Psoriasis Foundation contacted a general population (age 18 or older) representative of residents of the contiguous 48 United States (Stern *et al.*, 2004). Of the 27 220 individuals who completed interviews, 601 (2.2%) respondents were diagnosed with psoriasis by a physician. From these patients, 51% reported to be dissatisfied or somewhat satisfied with available therapies (1-7 scale). Many psoriatic patients with low involvement at the time of the interview considered this disease as a burden in their life.

Quality of life of European psoriatic patients as well as their satisfaction with available treatments was investigated in 2002 by the European Federation of Psoriasis Patient Associations (EUROPSO) (Dubertret *et al.*, 2006). From 18 386 responders, 17 990 had psoriasis at the time of the survey with over 70% reporting low or moderate satisfaction with the available therapies. On the whole, 50% of responders reported that the time consumed during therapies was a difficult aspect, followed by ineffectiveness of the treatments (32%). Amongst severely affected patients, 31% stated that adverse effects were a problem, compared with 23% of patients with mild psoriasis (Dubertret *et al.*, 2006). In 2003, a questionnaire was distributed to patients who sought therapy for their psoriasis at one of three treatment centers located in Kiel (Germany), Nijmegen (the Netherlands) and Manchester (United Kingdom). A total of 301 patients participated in the survey (100 from each centre). Amongst patients treated with conventional therapies, 10-50% reported neither change nor worsening after treatment. Generally, 42% of patients were not satisfied with their treatment options, mainly those who had more frequent relapses of the disease (Christophers *et al.*, 2006).

In 2005, as part of the 2005 Spring US National Psoriasis Foundation survey, 426 random interviews involving patients with psoriasis, psoriatic arthritis or both were conducted in the United States (Ciocon *et al.*, 2008). Responders were subgrouped according to their clinical history of psoriasis and psoriatic arthritis (n = 140) or cutaneous psoriasis only (n = 278). With regard to employment status, respondents with psoriasis and psoriatic arthritis were more likely to be unemployed compared with those having psoriasis only (18% vs.

9%, respectively;  $p = 0.007$ ) and were more likely to report that their disease negatively affected their job (41 vs. 14%, respectively;  $p < 0.001$ ). However, responders with psoriasis and psoriatic arthritis reported higher mean satisfaction levels (6.0) with current treatment options than those with psoriasis only (5.3), though this difference was not significant (1 = non satisfaction, 10 = extreme satisfaction) (Ciocon *et al.*, 2008).

One year later, another survey was conducted at the Dermatology out-patient clinic, Sisli Etfal Research and Training Hospital in Istanbul, Turkey (Gokdemir *et al.*, 2008). A total of 109 patients enrolled in this study, and 103 (44 men, 59 women) completed the study. There was no significant correlation between medication adherence and types of treatment and 53.4% of patients reported to be unsatisfied with their current therapy. In this study, 50 patients (44.8%) did not adhere to treatment. The most frequent reasons for that were linked to be busy, fed up and having inadequate knowledge about their disease and therapy (Gokdemir *et al.*, 2008).

Patients diagnosed with psoriasis in the United States between 2006 and 2007 were contacted to complete an online survey (“Psoriatic Patient Study Wave 1”) related to their psoriasis diagnosis, treatment and treatment satisfaction ( $n = 1006$ ). Of those who had ever taken a prescription ( $n = 557$ ), 31.8% reported that their current treatment was not able to satisfactorily clear their psoriasis. Patients with severe disease were less satisfied than those with moderate and mild disease (47.9 vs. 32.9 vs. 27.6% respectively) (DiBonaventura *et al.*, 2010).

In 2007, an online Canadian survey was conducted with 514 patients diagnosed with psoriasis. Satisfaction with treatments was generally low and only 24% of patients reported to be “very satisfied” with their current therapy. Satisfaction decreased with higher psoriasis severity; 39% of patients with very mild/mild psoriasis reported to be “very satisfied”, compared with 16% of those diagnosed with moderate/severe/very severe psoriasis (Poulin *et al.*, 2010). In this survey, dissatisfaction with the efficacy of antipsoriatic treatments was highlighted by a majority of patients (68%) reporting that “No medication works really well for my psoriasis”. Patients also declared that the reasons for treatment discontinuation were: lack of efficacy (60%), inconvenience (23%), symptoms improvement (22%), side effects (20%), cost (14%) and doctor’s advice (14%) (Poulin *et*

*al.*, 2010). Another Canadian survey conducted in 2008, including 250 participants with psoriasis demonstrated that treatment awareness was greatest for topical medications (n = 228; 92%), over-the-counter topical products (73%), and natural sunlight or phototherapy (59%). Participants with severe disease were more likely to be aware of injectable treatments (28%) and phototherapy options (75%). However, commitment to the last treatment varied depending on psoriasis severity, with patients more severely affected being less strongly committed to their treatment. Additionally, this survey demonstrated that support for psoriatic patients displays multiple deficiencies in Canada, such as insufficient information on treatment options and inadequate decision-making skills (Tan *et al.*, 2010).

Overall, previous worldwide surveys of individuals with psoriasis (Table 19) have revealed widespread dissatisfaction with available treatments, thereby highlighting the need for more appropriate forms of therapy in order to improve patients' quality of life.

Table 19 Results of worldwide surveys related to satisfaction of psoriatic patients with their therapies.

Period of the survey	Institution /Country	Number of participants	% of patients dissatisfied/satisfied with their antipsoriatic therapies	References
2001	National psoriasis foundation (United States)	601 (diagnosed by a physician)	51% reported to be dissatisfied or somewhat satisfied	(Stern <i>et al.</i> , 2004)
1998	National psoriasis foundation (United States)	18 000	49% reported they were somewhat or not at all satisfied	(Krueger <i>et al.</i> , 2001)
2002	European Federation of Psoriasis Patient Associations (EUROPSO)	17 990	70% reported low or moderate satisfaction	(Dubertret <i>et al.</i> , 2006)
2003	Treatment centres located in Kiel (Germany), Nijmegen (the Netherlands) and Manchester (United	301	42% reported to be unsatisfied	(Christophers <i>et al.</i> , 2006)



	Kingdom)			
2005	National psoriasis foundation (United States)	278 (82% received treatment)	mean treatment satisfaction score= 5.3 which corresponds to moderate satisfaction (1=non satisfaction, 10=extreme satisfaction)	(Ciocon <i>et al.</i> , 2008)
2006	Dermatology out-patient clinic, Sisli Etfal Research and Training Hospital, Istanbul/Turkey	103	53.4% reported to be unsatisfied	(Gokdemir <i>et al.</i> , 2008)
2006-2007	United States	557 (number of patients who had ever taken a prescription)	31% reported that their current treatment was not able to satisfactorily clear their psoriasis	(DiBonaventura <i>et al.</i> , 2010)
2007	Canada	514	68% reported that “No medication works really well for my psoriasis”	(Poulin <i>et al.</i> , 2010)

### Recent patent applications gathered from 2000 to 2011 for psoriasis treatment

#### *Natural preparations exhibiting antipsoriatic activity*

There is increasing evidence for the use of alternative medicine in psoriatic patients. Thus, in the survey achieved in 1998 by members of the National Psoriasis Foundation, several responders (43%) stated that they had tried over-the-counter medications or alternative therapies such as herbs, relaxation or acupuncture in order to control their psoriasis (Krueger *et al.*, 2001). Another survey, conducted with 77 psoriatic patients in Israel also demonstrated that 62% of patients used complementary and alternative medicine including herbal medicines and nutritional treatments followed by homeopathy and traditional Chinese medicine. The main reasons underlying the use of complementary medicines were: less toxic indications, disappointment with conventional treatments and stress reduction

(Ben-Arye *et al.*, 2003). Some recent patent applications also show tendencies for the use of complementary medications in psoriasis treatment. Table 20 shows some recent patents published from 2000-2011 describing natural antipsoriatic preparations. Patents showing pure molecules, in some cases from a natural origin, are presented in Table 21

Table 20 Recent patents describing natural preparations for psoriasis treatment

No.	Natural product(s)	Example of <i>in vitro/in vivo</i> study using the natural product	Reviewed patent publication year	Published references
1	Traditional chinese medicinal preparation containing Gan Jiang, Dan Shen, Jiang Xiang, Huang Qi, Gui Zhi and Cang Zhu	252 Psoriatic patients were recruited and divided into two groups: those who had ever taken immune suppressing drugs (group 2) or not (group 1) prior to treatment: about 95% of patients in group 1 showed a complete disappearance of their symptoms after 3 months, however patients in group 2 took a longer time to achieve recovery	2004	(Tan, 2004)
2	Antipsoriatic composition containing an extract from <i>Asphodelus microcarpus</i>	A substantial reduction of keratinocyte growth was observed in a flaky skin mouse model	2006	(Moady, 2006)
3	Whey protein-derived composition enriched in TGF- $\beta$ (XL-828L)	Placebo-controlled study: most of patients improved psoriasis parameters from baseline at days 56 and 112	2006	(Pouliot <i>et al.</i> , 2006)
4	Natural ointment from lard, marigold flowers and pure	No <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> study was presented. Authors recommended the	2007	(Miketin, 2007)

	beeswax, and therapeutic compress containing colts foot leaf, white oak bark, burdock root, horsetail herb.	application of the ointment twice daily to affected areas until a natural cure of the skin disorder was obtained		
5	Crude algae preparation preferably from <i>Dunaliella bardawil</i>	A randomized, double-blind, and vehicle-controlled study was performed with 22 psoriatic patients divided in two groups: a) subjects treated with 4 capsules of <i>D. bardawil</i> during 12 weeks; b) placebo group. After 12 weeks of treatment, 40% of patients in <i>Dunaliella</i> group and 27% in control group achieved 75% improvement in psoriasis disease activity as measured by the Psoriasis Area and Severity Index (PASI)	2011	(Shaish <i>et al.</i> , 2011)

#### *Pure chemical compounds exhibiting antipsoriatic activity*

A range of different compounds have been proposed to be useful for psoriasis treatment in recent patent applications, including small molecules and biotech products (proteins, modified proteins, monoclonal antibodies and related products). Table 21 shows some of compounds described in patents published between 2000 and 2011. Figure 45 illustrates the chemical structure of various small molecules presented in Table 21.

Table 21 Recent patents applications related to pure chemical compounds alone or in combination for psoriasis treatment

No.	Compound(s)	Example of <i>in vitro/in vivo</i>	Reviewed patent	Published
-----	-------------	------------------------------------	-----------------	-----------

	study using the compound(s)	publication year	references
1	10-substituted 1,8-dihydroxy-9(10H) anthracenones compounds	Anthracenones derivatives were able to inhibit the production of leukotriene B4 in isolated bovine polymorphonuclear leucocytes and in some cases this effect was higher compared with anthralin, a compound used for psoriasis treatment (IC50 = 0.3-0.6 $\mu$ M vs. 37 $\mu$ M respectively)	2000 (Müller <i>et al.</i> , 2000)
2	Resveratrol	A prospective, multi-center, double blind study was performed with 48 patients diagnosed with mild to moderate chronic psoriasis. Patients were divided in 4 groups: a) resveratrol group (1% resveratrol ointment); b) control group (ointment without resveratrol); c) vitamin D derivative group (calcipotriol 50 mg/g); d) combination resveratrol/vitamin D derivative group (1% resveratrol/50 mg/g calcipotriol). Patients were treated twice a day during a month. A marked improvement was observed in 80% of patients treated with resveratrol compared to 10% for the control group, 47% for patients treated with calcipotriol and 95% for the combination group using resveratrol/calcipotriol	2001 (Pelliccia <i>et al.</i> , 2001)
3	Administration of one or more compounds from isoindigo, indigo, indirubin or derivatives such	Mesoindigo at a low concentration (30 nM) inhibited the production of multiple pro-inflammatory cytokines including IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . Additionally, it stimulated the	2009 (Wang <i>et al.</i> , 2009)

	as Mesoindigo	production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in human monocytic THP-1 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS)		
4	Therapeutic composition containing cyclopamine or an acceptable salt and a corticosteroid	Psoriatic patients were treated with cyclopamine cream. Tissue sections from the treated lesion revealed return of the thickened and elongated rete ridges to normal levels, marked decrease of epidermal hyperplasia, disappearance of papillary edema, re-appearance of the granular layer of epidermis, disappearance of most of the inflammatory infiltrated cells, particularly CD4 positive lymphocytes. Moreover, treatment with cyclopamine and a corticosteroid significantly increased the therapeutical effectiveness over the use of cyclopamine or corticosteroid alone	2009	(Tas and Oktay, <b>2009a</b> ,  Tas and Oktay <b>2009b</b> )
5	cyclopropyl-N-(2-[(1S)-1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)ethyl]-3-oxoisindoline-4-yl) carboxamide (compound A)	The efficacy of compound A compared to cyclosporine was evaluated in a model of psoriasis using human skin xenotransplanted onto beige severe combined immunodeficiency mice. A sample of each psoriatic donor (n = 6) was transplanted onto 4 mice, and divided in three treatment groups: a) vehicle group; b) compound A group; c) cyclosporine group (7 mice/group). Four weeks after the graft each mouse was injected with $1 \times 10^7$ psoriatic patients activated allogeneic natural killer (NK) cells and 2 weeks following injections they were treated twice a day during	2009	(Schafer <i>et al.</i> , 2009)

		14 days. Compounds were dosed at 5 mg/kg/day, divided into i.b.d doses. Histological evaluation of the skin treated with compound A showed an overall response rate of 57 vs. 42.9% with cyclosporine		
6	Therapy with benzodiazepine, topical steroid, keratolytic agent, topical retinoid, coal tar, vitamin D-3 analog	Novel benzodiazepine analogues inhibited retinoid-induced epidermal hyperplasia in human skin organ culture without detrimental effects on fibroblast function. These compounds downregulated extracellular signal-regulated kinases (Erk) phosphorylation in the pathway leading to epidermal growth factor (EGF) receptor activation and keratinocyte proliferation	2010	(Glick, 2010)
7	Antibody able to binding the p40 subunit of IL-12 and/or IL-23 (ABT-874)	A total of 180 patients with moderate to severe psoriasis were divided in 6 groups: a) 100 mg ABT-874 every other week for 12 weeks; b) 200 mg ABT at week 0; c) 200 mg ABT-874 every week for 4 weeks; d) 200 mg ABT-874 every other week for 12 weeks; e) 200 mg ABT-874 every week for 12 weeks or f) placebo. At week 12, the percentages of patients achieving 75% improvement of psoriasis were significantly higher for patients from the ABT-874 groups vs. placebo (93%, 63%, 90%, 93%, 90% vs. 3% respectively)	2010	(Chartash <i>et al.</i> , 2010)
8	Polyunsaturated long-chain ketones	Experiments performed with HaCaT keratinocytes pre-treated with lipopolysaccharide (200 ng.mL <sup>-1</sup> ) for 30 minutes, treated with a fatty acid derivative	2010	(Johansen <i>et al.</i> , 2010)

		(EPACOCF3) and a COX-2 selective inhibitor (NS-398), during 30 min (0.2-25 $\mu$ M) and further stimulated with the calcium ionophore A23187 for 30 min, demonstrated that EPACOCF3 was more potent than NS-398 in inhibiting prostaglandin E2 (PGE2) production (IC50= 180 nM vs. 240 nM respectively)		
9	Method to inhibit keratinocyte proliferation using inhibitors of soluble adenylyl cyclase such as gossypol, 4-hydroxyestradiol, 2-hydroxyestradiol and other compounds	Experiments performed in C57B1/6 mouse demonstrated that blocking soluble adenylyl cyclase with a specific inhibitor (KH7) interfered with the signal transduction pathway initiated by IL-22 which was further connected with a diminution of acanthosis area compared to controls receiving IL-22 treatment	2010	(Buck <i>et al.</i> , 2010)
10	Hydroxystilbenes and stilbenes derivatives	Experiments in human keratinocytes demonstrated that stilbenes derivatives were able to inhibit keratinocyte proliferation and VEGF concentration in cell supernatants after 24 h of stimulation with recombinant human transforming growth factor alpha (rhTGF- $\alpha$ ).	2011	(Chen <i>et al.</i> , 2011)
		Three volunteers affected with psoriasis received 1% cream of 3,5-dihydroxy-4-isopropylstilbene once a day. Two comparable body areas were chosen, one was treated with a basic cream as the control and the other with a cream containing the compound. The		

		area treated with the stilbene showed improvement for inflammation and a decrease in proliferative cells compared to the control		
11	1-[N <sup>6</sup> -(3-iodobenzyl)-adenin-9-yl]-β-D-ribofuronamide (IB-MECA)	A phase II, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study was conducted in 62 psoriatic patients diagnosed with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis. Patients were divided in 4 groups (administration twice a day): a) placebo; b) 1 mg IB-MECA; c) 2 mg IB-MECA; d) 4 mg IB-MECA. The group receiving the 2 mg dose (total 4 mg/day) had a significantly higher clinical response over the other tested dose groups, as assessed by measurement of the Psoriasis Area and Severity Index	2011	(Fishman, 2011)
12	Alpha-2 adrenergic receptor agonist namely brimonidine	A 52-year-old woman with severe psoriasis received 10 days of treatment with 0.15% brimonide tartrate twice a day. After treatment, redness and itchiness were notably reduced, but not the size of the plaque	2011	(Dejovin, 2011)
13	Humanized antibodies against human IL-22RA (280.346.TSY)	Efficacy of the antibody was determined in a psoriatic mouse model (C57BL/6 mice). Mice were injected with 500 ng of recombinant human IL-23 during 14 days in order to induce ear thickening and different doses of 280.346.TSY were administered subcutaneously. The antibody showed efficacy in this model with an effective dose (ED <sub>50</sub> ) value of 1.8 mg.kg <sup>-1</sup>	2011	(Beckman and Johnson-Leger, 2011)



- |    |   |  |      |                      |
|----|---|--|------|----------------------|
| 14 | Monoclonal or polyclonal antibodies, proteins, peptides and small molecules acting as CD40 antagonists. | Efficacy of a monoclonal antibody (5H7) was evaluated in the severe combined immunodeficiency mouse xenogeneic transplant model system. Mice were subjected, in groups of three, to one of the following treatment regimens: a) Treatment Group-mice transplanted with lesional psoriatic skin were treated with the antibody 5H7 (20 mg/kg) every other day for 2 weeks; b) Treatment Control Group-mice transplanted with lesional psoriatic skin were treated with isotype antibody MsIgG1; c) Prevention Group-mice transplanted with nonlesional psoriatic skin were treated, with $2 \times 10^6$ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) pre-activated <i>ex vivo</i> , in the presence of the antibody 5H7 with staphylococcal superantigens and further treated by <i>in vivo</i> administration of 5H7 as per the "Treatment Group"; and d) Prevention Control Group-mice transplanted with nonlesional psoriatic skin were treated with $2 \times 10^6$ PBMC pre-activated <i>ex vivo</i> with staphylococcal superantigens as in the "Prevention Group" followed by administration of the antibody MsIgG1. Treatment with 5H7 resulted in reduction of epidermal thickness by 30 to 50% as well as in diminution of epidermal hyperproliferation. Normalization of the keratinization pattern was mirrored by reestablishment of the granular layer. Additionally, inflammatory infiltrate was reduced to around 50% | 2011 | (Chu and Wang, 2011) |
|----|---|--|------|----------------------|

15	Molecules able to inhibit the production of IL12 and IL-23	A multicenter, randomized, multiple oral dose outpatient study was done in psoriatic patients having moderate to severe disease. Patients received the compound, namely: 50 ( <i>N</i> -(3-methyl-benzylidene)- <i>N'</i> -[6-morpholin-4-yl-2-(2-pyridin-2-yl-ethoxy)-pyrimidin-4-yl]hydrazine), in doses of 21 or 35 mg orally twice daily and 35 or 70 mg orally once a day during 12 weeks. At week 2, gene expression encoding the p19 subunit of IL-23 and the p40 subunit shared by IL-12 and IL-23 was reduced. Additionally, a marked decrease in CD11c+ cells in epidermis was observed at week 12 in patients receiving 70 mg of compound 50 once a day	2011	(Babu <i>et al.</i> , 2011)
16	Pharmaceutical compositions based on 1,2-bis (3,5-dioxopiperazin-1-yl) propane	Seven psoriatic patients received a pharmaceutical composition based on 1,2-bis (3,5-dioxopiperazin-1-yl) propane. At the beginning of treatment PASI score ranged from 23.1-44.1, whereas at the end of the third cycle of treatment PASI score significantly descended from 3.4-29.7	2004	(Zarmanian and Rogan-Grgas, 2004)
17	Formulations of 2,6-dimethoxynaphtalene or 2,7-dimethoxynaphtalene or their mixture (Endipalene)	Twenty psoriatic patients were divided into two groups (a control group and a test group). Both groups were treated for 20 days, twice a day, with topical application formulations comprising 1-2% or 8% of Endipalene respectively. The test group (8% of Endipalene) showed a significant reduction of the illness onset compared to	2011	(Glorgio, 2011)

		the reduction observed for control group		
18	Tryptamine based drugs such as sumatriptan, almotriptan and functional analogs	A 40-year-old male patient with psoriasis received a cream containing among other ingredients 0.04% sumatriptan for 5 days, once daily. Disappearance of scales was observed, whereas no change was observed on untreated psoriatic lesions	2011	(Dascalu, 2011)

Some of these compounds are known for their anti-inflammatory and antioxidant activities. The resveratrol dose-dependently impairs the release of the elastase from neutrophils (Hrenn *et al.*, 2006). The elastase is a serine protease that acts by degrading normal skin constituents such as keratin, elastin and different types of collagen in inflamed tissues. In psoriatic lesions, this enzyme induces keratinocyte hyperproliferation via the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway (Meyer-Hoffert *et al.*, 2004). The bis-dioxopiperazines represent lipophilic derivatives of EDTA (ethylene diamino tetraacetic acid), a substance known as a chelating agent, which acts by chelating iron, thereby reducing site-specific oxygen radical production. Additionally, they have topoisomerase II inhibitory activity which is responsible for the antitumour activity of these drugs (Zarmanian and Rogan-Grgas, 2004). The compound 1-[N6-(3-iodobenzyl)-adenin-9-yl]- $\beta$ -D-ribofuronamide (IB-MECA/CF-101) is considered an A<sub>3</sub> adenosine receptor (A<sub>3</sub>AR) agonist. This receptor is highly expressed in various tumour cell types and in the peripheral blood mononuclear cells of psoriatic patients (Fishman *et al.*, 2003; Fishman and Cohn, 2008). Activation of this receptor by specific agonists induces modulation of downstream signal transduction pathways which includes Wnt and NF- $\kappa$ B (Fishman *et al.*, 2002; Fishman *et al.*, 2006). Moreover, A<sub>3</sub>AR agonists act as anti-inflammatory agents by improving the inflammatory process in different experimental autoimmune models such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis (Baharav *et al.*, 2005). As to the Endipalene molecules, they act as 5-lipoxygenase inhibitors for treating inflammation related skin

disorders (Glorgio, 2011) whereas triptans are tryptamine based drugs acting as selective 5-hydroxytryptamine-1 inhibitors (Dascalu, 2011).

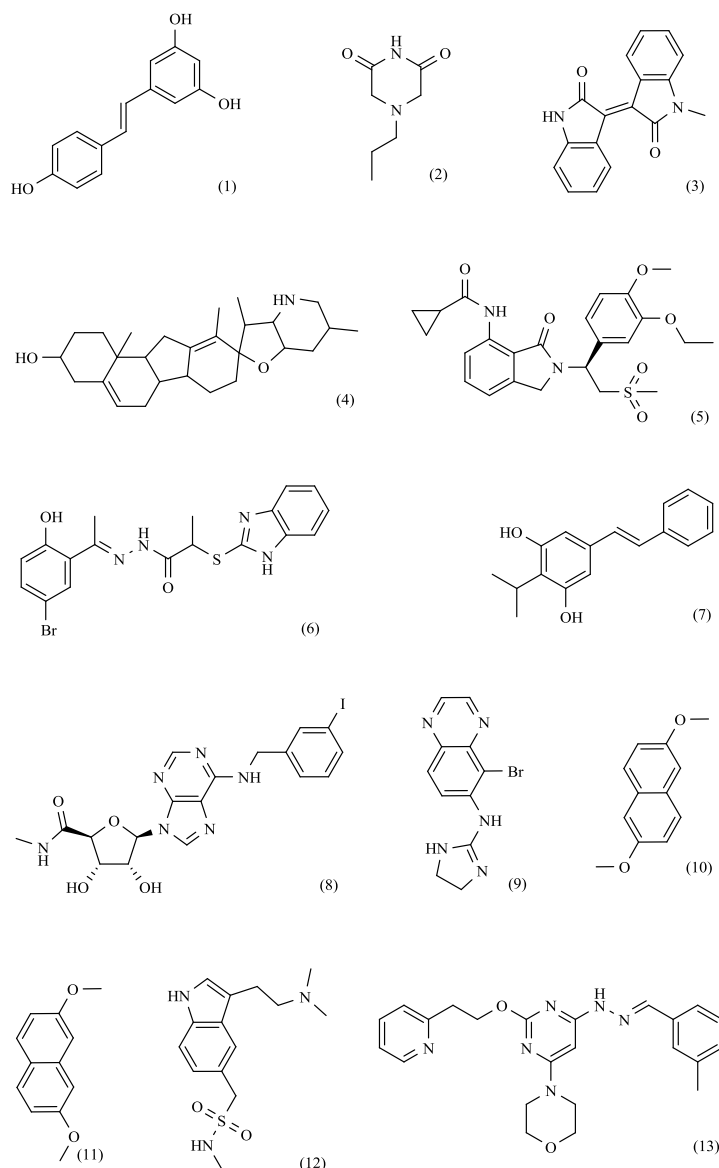


Figure 45 Chemical structure of various small molecules proposed for psoriasis treatment in recent patent applications published from 2000-2011.

(1) resveratrol; (2) 1,2-bis (3,5-dioxopiperazin-1-yl) propane; (3) mesoindigo; (4) cyclopamine; (5) cyclopropyl-N-(2-[(1S)-1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl) ethyl]-3-oxoisindoline-4-yl) carboxamide; (6) adenyl cyclase inhibitor KH7; (7) 3,5-dihydroxy-4-isopropylstilbene; (8) 1-[N<sup>6</sup>-(3-

iodobenzyl)-adenin-9-yl]- $\beta$ -D-ribofuronamide (IB-MECA); (9) brimonidine; (10) 2,6-dimethoxynaphthalene; (11) 2,7-dimethoxynaphthalene; (12) sumatriptan; (13) N-(3-methyl-benzylidene)-N'-[6-morpholin-4-yl-2-(2-pyridin-2-yl-ethoxy)-pyrimidin-4-yl] hydrazine.

### **Challenges in the search for new antipsoriatic compounds**

Maybe the most important challenge for antipsoriatic drug development is minimizing the toxicity of highly effective drugs over a patient's lifetime. Generally, the search for new, safe and effective therapies involves a number of challenges in terms of time, efforts and costs. A conventional vision of this process implies several key steps: a) establishment of biological hypotheses related to the disease pathogenesis; b) identification of potential molecular targets based on previous pathogenesis hypotheses; c) development of a screening assay to identify the molecules able to bind the targets; d) chemical optimization of the most promising compounds, or "hits", in order to produce series of "lead" compounds that will interact with high affinity with the targets; e) testing the lead compounds in relevant animal models to confirm or refute the original hypothesis and also evaluate their efficacy as well as their potential side effects; f) safety evaluation in humans and establishment of pharmacokinetic properties (phase I); g) efficacy testing in small groups of patients (proof-of-concept testing; phase II); f) large-scale multicenter clinical trials to assess efficacy and safety (phase III) (Williams, 2011).

According to this vision, a particular disease is first studied in relevant model systems, in order to determine cellular and molecular mechanisms involved in its pathogenesis and, afterwards, new therapeutic agents are tested in these models before proceeding to clinical trials in humans. Psoriasis is a disease that, throughout its history, has broken this stereotypical view in primary steps of drug development. Thus, former antipsoriatic treatments such as phototherapy UVB and PUVA were initially developed through an empirical approach that was based neither on specific hypothesis of disease pathogenesis nor on mechanistic properties of the therapeutics (Honigsmann, 2001). Nowadays, psoriasis treatments are currently undergoing a paradigm shift on the basis of important advances in the elucidation of biological mechanisms related to its pathogenesis and new biological treatments are available as direct consequences of fundamental discoveries in fundamental science (Guttman-Yassky and Krueger, 2007).

However, psoriatic individuals are highly unsatisfied with current therapies and other medications should still be developed in order to offer individualized treatments able to improve quality of life for patients. Considering psoriasis features, some challenges exist in all stages of drug development which must be taken into account during the search for new antipsoriatic compounds. A discussion of these challenges, based on psoriasis characteristics, is provided in the following paragraphs.

### ***1) Psoriasis pathogenesis is still a subject of scientific debate***

The capability to develop effective antipsoriatic treatments using a rational design is crucially dependent on the elucidation of the molecular network of inflammation implied in the physiopathology of this disease. So far, the pathogenesis of psoriasis is still a matter of scientific debate. Controversy exists about whether this disease starts as a primary abnormality in keratinocytes or as the result of an altered immune response against an undetermined antigen. Some of the questions that remain to be solved in order to refine pathogenic hypotheses include: a) the determination of key triggers of the cellular inflammatory response and the elucidation of their interactions with genetic factors; b) the identification of key self antigens and/or exogenous/endogenous activators of innate immunity; c) the characterization of aberrant wound healing responses from psoriatic keratinocytes in the context of the immune system activation leading to psoriatic lesions; d) the study of dysfunctions in regulatory T cells, DCs or other cells that crossregulate immune responses; e) the identification of psoriasis genes linked to cellular and transcriptional alterations which characterize this disease and make it different from other inflammatory skin disorders (Lowes *et al.*, 2007).

- **Consequences for antipsoriatic drug development:** Even though psoriasis research has progressed far enough to propose relevant and specific molecular or cellular alterations involved in its pathogenesis, more work is still needed to refine pathogenic hypotheses in order to reach the ultimate goal of developing specific treatments. Therefore, the translation of basic scientific discovery linked to relevant pathways to be targeted by new therapies is an important step in order to speed up the process of new effective drugs development. Taking into account that the interaction of multiple

perturbed biologic networks is present in psoriasis, the identification of crucial proteins responsible in reconfigure disturbed networks back towards their normal state would have a critical impact on the identification of new relevant targets. The integration of data from genetic and proteomic analyzes into network models could be useful for delineating key proteins and their importance in this disease. At the same time, the comprehensive analysis of protein functions as part of these pathologic networks might serve to identify nodal points in disease process and exclude a number of putative targets with minor importance in pathogenesis.

## ***2) Psoriasis does not have a validated prognostic biomarker***

A biological biomarker is a “characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes or pharmacologic responses to a therapeutic intervention” (*Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, 2001*). Biomarkers can be used as indicators of treatment efficacy and for the prediction of clinical outcomes. Additionally, they can be used as markers of drug exposure to evaluate the safety of new medications (Lesko and Atkinson, 2001). Currently, there is a high interest in biomarkers in the pharmaceutical industry, in light of the increased costs of research and the pressure to accelerate the rate of bringing new drugs to the marketplace. Biomarkers are seen as important tools for improving the efficiency of drug discovery process, thereby facilitating regulatory decision making.

The identification of relevant biomarkers directly related to psoriasis pathogenesis that could be targeted with effective treatments would allow a quantitative assessment of treatment response (Rashmi *et al.*, 2009). As the factors contributing to the generation of psoriatic lesions are not fully characterized, biomarkers data for this disease are limited. Consequently, other investigations are still needed to identify and validate correlations between the overexpression/underexpression of several proteins and this disease. Moreover, individual variations in biomarkers behaviour need to be explored and studied to ascertain whether these markers are primarily or secondarily involved in psoriasis pathogenesis.

- **Consequences for antipsoriatic drug development:** The absence of psoriasis-relevant biomarkers may delay the process of new drugs development and contribute to the

failure of new compounds at late steps of drug development (de Vlam *et al.*, 2008).

In the context of psoriasis, a key point for identifying satisfactory markers will probably require multi-parameter analyzes of drug response taking into account the interactive networks involved in pathogenesis of this disease. Additionally, the body of evidence progressively provided by preclinical animal investigations and clinical studies could serve for the validation of biomarkers. The scientific schedule for such evaluation must be planned as early as possible in the drug discovery process in order to bring the biomarker into clinical trials and to establish the link with clinical outcomes. The most valuable paradigm for biomarker evaluation during clinical trials include: a) the establishment of relationships between new drug exposure and clinical response; b) the validation of test hypotheses regarding drug action mechanisms and; c) an estimation of the magnitude of clinical benefit (Lesko and Atkinson, 2001). Fortunately, cellular and molecular approaches now available could help identify new biomarkers from psoriatic lesions during preclinical studies. Such biomarkers could then be used for dissecting the effects of specific antagonists during proof-of-concept clinical trials.

### ***3) No animal model can fully mimic psoriasis characteristics***

One of the most important challenges for antipsoriatic drug development is the absence of validated *in vivo* models. Animal models are very important in preclinical stages of drug development and can be used for therapeutic screening, taking a disease animal model and reversing it with a specific compound. Additionally, they can be used in another emerging type of screening, known as pathway screening, in which a compound is expected to change a particular signaling pathway *in vivo* (Williams, 2011). In both cases, a decision must be made about which model system to use.

Mice are the mainstay of *in vivo* immunological experimentation, due in part to their ability to mimic some aspects of human biology (Mestas and Hughes, 2004). However, with the exception of few sporadic cases in primates, psoriasis is exclusive to humans and the available mice models are not able to fully reflect the complex characteristics of this disease (Nestle *et al.*, 2009). There are three types of psoriatic mice models: spontaneous mutation, genetic engineering and xenotransplantation (Nestle *et al.*, 2009). Spontaneous mutations in mouse models show some psoriasis-like characteristics such as skin thickening



and scales formation (Mizutani *et al.*, 2003). Even though these models only represent a limited set of psoriatic features, they can be used to compare drug effects on local pathogenic characteristics such as hyperkeratosis, regulation of neutrophil infiltration, microabscess formation or dermal angiogenesis (Schon, 2008).

In the case of genetically engineered mice, two categories exist: a) mice in which a genetic element has been introduced (transgenic mice) and b) mice in which a genetic element has been made inoperative (knockout mice) or attenuated (hypomorphic mice) (Nestle *et al.*, 2009). These models are used to study the role of a particular mediator or pathway involved in skin inflammation. However, there are inherent limitations in the ability of fixed transgenes to mimic the reversible hyperplasia observed in psoriasis, in which levels of inflammatory cytokines change after treatment intervention (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). Moreover, most of these models do not reflect the complex network observed in psoriasis, mainly due to differences between human and mouse skin regarding the extent of interfollicular epidermis, the thickness of the epidermis, the density of hair follicles, the keratinocyte differentiation program and the immune infiltrate composition (Lowes *et al.*, 2007).

Xenograft models are unique tools for the study of psoriasis pathogenesis. In these humanized models, xenotransplantation experiments are performed by transplanting the skin from psoriatic patients onto immunosuppressed mice. Transplants can be obtained from either symptomless (nonlesional) or lesional skin from psoriatic patients. By using psoriatic skin, the psoriasis plaques phenotype is sustained during 8-10 weeks. Thus, after transplantation (7-10 days), a drug treatment can start either systemically or intralesionally during 2-4 weeks. Drug efficacy is then evaluated with histological analyzes based on the major hallmarks of psoriasis such as *rete* ridge length, acanthosis, absence of granular layer, *stratum corneum* structure and degree of leukocyte infiltration.

Xenotransplantation models have been useful to reassess the mechanism of antipsoriatic drugs and to validate the efficacy of novel agents in preclinical studies (Villadsen *et al.*, 2003). Indeed, a good correlation has been reported between the clinical experience and the efficacy of established antipsoriatic drugs such as cyclosporine A and 1 $\alpha$ .25-dihydroxycholecalciferol, using the psoriasis severe combined immunodeficiency (SCID)

mouse model (Dam *et al.*, 1999). However, some limitations of these models for drug discovery have also been described (Petersen, 2006): a) the transplantation procedure involves a wound healing process that could complicate the interpretation of results; b) the evaluation of drugs that inhibit specific human cytokines can be compromised due to the crosstalk between human and murine immune system; c) if solely skin is transplanted no peripheral or bone marrow cells can participate in the psoriasis process and this could influence the evaluation of drugs acting on traffic between circulating cells; d) human split-skin grafts exhibit deficiencies regarding the barrier function of the skin, so that results of the studies using topically applied drugs should be interpreted with care; e) xenotransplantation models require patients that are willing to donate skin, thus limiting the number of new treatments to be tested (Boehncke, 2005; Gudjonsson *et al.*, 2007). Therefore, these models should be applied only when novel targets or selected drugs have been validated in other primary models.

- **Consequences for antipsoriatic drug development:** The end of the preclinical drug development program should provide information on whether or not the drug has an action in central pathways involved in psoriasis. Highly predictive models can easily translate into significant savings of time and money for the pharmaceutical industry. Considering the remarkable changes in skin structure shown in some mouse models, it is important to carefully evaluate the information derived from animal experiments and to consider the specific details related to psoriasis characteristics in order to develop more selective treatments. In fact, some models of epidermal hyperplasia in mice are as much similar to atopic dermatitis as they are to psoriasis, even when these skin disorders are believed to be clinically different (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). Thus, these models are of questionable value for developing selective antipsoriatic treatments and it is not surprising that targeted therapies such as the antibody efalizumab and calcineurin antagonists are effective in both diseases (Boguniewicz and Leung, 2006; Farshidi and Sadeghi, 2006). Moreover, there is also limited information on how well a compound should be expected to perform in animal models before it should be selected for study in patients. Do you need a 100% reversal or is 75% good enough? Additionally, a multi-step usage of a panel of different psoriatic animal models covering important hallmarks of this disease could avoid wrong assumptions of drug

efficacy in humans, facilitating the successful introduction of new antipsoriatic agents into clinical phases of development.

#### ***4) Psoriasis is a chronic disease which requires longterm treatments***

Although psoriasis may rarely be life-threatening, most of patients experience a chronically remitting and relapsing disease for several years, so the minimization of adverse effects is an important aspect for developing new therapies. Even if the time to improvement and the time to relapse are very important attributes for choosing a treatment option, it has been shown that psoriatic patients would be willing to wait longer for a treatment to work if the possibility of severe adverse effects, such as skin cancer or liver damage, would be considerably reduced (Seston *et al.*, 2007). Moreover, adverse effects related to specific therapies influence antipsoriatic treatment preferences and patient compliance, which importance is magnified by the chronic character of this disease and the perspective of relapse even after successfully remissive treatments (Opmeer *et al.*, 2007).

- **Consequences for antipsoriatic drug development:** Improving the safety of new antipsoriatic drugs is a very important aspect for the success of long-term therapies. This challenge can be overcome through the understanding of the toxicity mechanisms of new agents at early stages of drug development. The use of interspecies biomarkers of toxicity could not only better define toxic pathways, but also improve the association between preclinical studies and clinical trials. Considering that most of the recent psoriasis treatments are biotech products with high target and species specificity, the choice of animal species for preclinical safety assessment studies is very important in order to properly evaluate the risk. The selection of the test species for the evaluation of human-derived proteins is usually accomplished by comparison of their *in vitro* binding affinity or functional activity in human and animal cells, followed by the *in vivo* demonstrations of their pharmacological activity or crossreactivity in the species (Sims, 2001). In general, the toxicity of biotech products is attributed to an exaggerated pharmacological response and their doseresponse curve shape can be unpredictable: bell shaped or bimodal (Brown *et al.*, 2002). Lack of a predictable dose-response curve complicates the extrapolation of toxicological observations from animals to humans.

Unlike other conventional pharmaceutical products, the general toxicity of biotech products can be evaluated in one species (*ICH guidance: S6 safety evaluation of biotechnology derived pharmaceuticals, 1997*). More than one species is needed if previous pilot studies have indicated differences in species responses (Serabian and Pilaro, 1999). In fact, an important challenge for these products is the extrapolation of their specificity of action in humans based on what is observed in animals and the detection of altered immune status and immunogenicity in a foreign host (Black *et al.*, 2000). For long-term toxicological studies, non-human primates have often been needed to minimize the chance of antibody responses. Additionally, transgenic animals and homologous proteins are interesting alternatives (Cavagnaro, 2002).

In clinical trials, long-term safety data beyond a year is usually necessary for novel antipsoriatic compounds, especially for those based on new pharmacological mechanisms (*Guideline on clinical investigation of medicinal products indicated for the treatment of psoriasis, 2004*). In general, it is expected that the risk/benefit of new therapies will be evaluated in relation to other available treatment options because of the disease severity in the intended study population. When topical products are developed, the reduction of systemic exposure is expected and, hence, an increase in their safety margin. However, for these therapeutic agents, local adverse effects including skin atrophy should be assessed as well as the extent of systemic absorption and their potential for systemic effects. Taking into account that psoriatic patients present a high risk of developing skin malignancies and lymphoproliferative diseases, the possibility that previous therapies increase the risk of these side effects should be carefully analyzed. Additionally, the potential of topical drugs to induce phototoxic reactions must be evaluated as well. In the case of new systemic agents acting as immune modulators, their negative effects on the immune system should be documented. Duration of the clinical assessment should be adjusted in order to evaluate short-term and prolonged effects of new drugs (*Guideline on clinical investigation of medicinal products indicated for the treatment of psoriasis, 2004*).

##### **5) Psoriatic patients present high individual response variability to treatments**

In psoriasis, substantial genetic heterogeneity is noticeable between patients. Indeed, most established antipsoriatic drugs exhibit response rates no higher than approximately 80% (*Guideline on clinical investigation of medicinal products indicated for the treatment of psoriasis, 2004*). From a clinical viewpoint, it has been considered that every patient has his/her own form of psoriasis (van de Kerkhof, 2008). Thus, within the same patient, psoriasis can significantly vary. Some patients present early psoriasis onset, while others display late onset. A number of patients have chronic stable lesions, and others have fast-relapsing disease with short remissions. Although some genetic factors could encode components of the same biochemical pathway, and thus not require different treatments to stop the progress of disease, it is probable that genetic heterogeneity leads to fine differences in efficacy of different treatment protocols. For example, a variable therapeutic response has been observed to alefacept treatment in individual patients. Genomic measures of T cell responses in patients under alefacept treatment show unexpected agonist activities that seem to differentiate responding from nonresponding psoriatic patients (Haider *et al.*, 2007).

- **Consequences for antipsoriatic drug development:** In order to develop selective and personalized treatments, more work is needed to elucidate the basis of individual response variability. The identification of genetic variants in psoriatic patients could improve the quality of care management by identifying which patients should avoid a specific drug and which patients should be administered a modified dose. This strategy could potentially reduce medical costs and improve the success of drug therapy (van de Kerkhof, 2008). So far, the use of pharmacogenomics approaches in psoriasis has remained elusive even if this technique can predict therapy response as well as the risks for adverse reactions. In fact, the main limitation of pharmacogenomic approaches in the case of psoriasis is that they tend to work best if a single identifiable genetic variation appears frequently enough to be detectable in relatively small clinical trials (Kimball and Kupper, 2008). However, in clinical practice, some of the adverse effects and aberrant clinical responses that follow psoriasis treatments appear in a low proportion of patients. Consequently, if a mutation is too frequent it may not make sense to test for it (Kimball and Kupper, 2008).

So far, the increased expression of many genes has been identified in psoriasis, but a specific marker for predicting therapeutic response has yet to be determined. A recent study conducted with nine Tunisian multiplex families with autosomal recessive generalized pustular psoriasis, demonstrated the existence of a homozygous mutation in IL36RN, the gene encoding IL-36Ra (also known as IL-1F5) (Marrakchi *et al.*, 2011). Aberrant IL-36Ra structure and function was related to unregulated secretion of inflammatory cytokines (IL-8 in particular) by keratinocytes of patients leading to generalized pustular psoriasis. Authors considered that putative dysregulation of the IL-36-IL-36Ra signaling pathway could confer a predisposition to other common forms of psoriasis (Marrakchi *et al.*, 2011).

Given the absence of robust pharmacogenomic approaches, it is important that clinical trials be designed to collect as much information as possible about symptom clusters as well as their differential expression and responsiveness to specific antipsoriatic treatments. Additionally, it is imperative to recognize that even highly targeted treatment can alter multiple outputs, taking into account that diverse psoriasis mechanisms are interconnected. Moreover, combinations of antipsoriatic therapies should be taken into consideration in order to individualize treatments, especially in psoriatic patients recalcitrant to individual second-line therapies (Lebwohl and Ali, 2001b; Menter *et al.*, 1996). The validity of such combination therapies can be evaluated by clinical trials taking into account: a) the efficacy of an additive treatment vs. each agent vs. placebo; b) the patients' tolerance to combination therapy compared to each agent alone; c) the reduction of cumulative exposure leading to diminution of long-term toxicity (*Guideline on clinical investigation of medicinal products indicated for the treatment of psoriasis, 2004*). Short-term efficacy studies might accomplish the first two aims, but may also be insufficient if a lower therapeutic response appears with time. Clinical trials of at least one year could be advisable for the evaluation of long-term toxicity of additive treatments (*Guideline on clinical investigation of medicinal products indicated for the treatment of psoriasis, 2004*).

## **6) Psoriasis affects pediatric patients**

Psoriasis is rare in children younger than 3 years of age. However, this disease represents 4.1% of all dermatoses observed in children under the age of 16 in Europe and North America (Beylot *et al.*, 1979). Predisposing factors for pediatric psoriasis include: a) genetic background; b) streptococcal infections, trauma and stress; c) human immunodeficiency virus; d) drugs such as growth hormone, lithium beta-blockers and recombinant gamma and alpha-interferon (Marcoux and Prost, 2002). Randomized controlled clinical trials involving children under the age of 12 suffering from psoriasis have rarely been reported, and only for topical treatments (Herz *et al.*, 1991; Oranje *et al.*, 1997).

- **Consequences for antipsoriatic drug development:** In general, children with psoriasis prefer topical treatments whereas systemic treatments are scarcely used. If there are no particular safety concerns, clinical trials in children with plaque psoriasis are not warranted. Efficacy studies could be needed when specific locations (ex. face) are investigated. Pediatric studies should specifically focus on long-term potential systemic effects (*Guideline on clinical investigation of medicinal products indicated for the treatment of psoriasis, 2004*).

Considering specific concerns related to higher percutaneous absorption and toxicity in children, formulations of new drugs to be topically applied should include pediatric dosage forms and use appropriate delivery vehicles in order to attain the desirable attributes for use in dehydrated and thickened psoriatic skin showing lipid imbalance and high sensitivity to irritants (Katare, 2010; Kreilgaard, 2002). Some of the challenges for the development of more effective topical antipsoriatic formulations for paediatric populations include: a) the evaluation of the reservoir capacity of the skin from children of different ages; b) the variability of percutaneous absorption due to plaques localization, disease severity and age differences; c) the heterogeneity of the skin in turn-over and metabolism and d) the identification of specific carrier systems in order to reduce the percutaneous absorption and systemic toxicity of new drugs.

#### **7) A high proportion of psoriatic patient present comorbidities**

In clinical practice, comorbidities are common in psoriatic patients and should be considered during treatment approaches and surveillance, particularly in patients requiring systemic therapies. Several observational studies have suggested that psoriasis is associated with psoriatic arthritis, cardiovascular disease, metabolic syndrome, cancer, chronic obstructive pulmonary disease, depression and osteoporosis (Dreiherr *et al.*, 2009; Dreiherr *et al.*, 2008; Gelfand *et al.*, 2006; Mallbris *et al.*, 2004). Chronic inflammation and elevated levels of the multifunctional cytokine TNF- $\alpha$  have been linked with comorbidities in psoriasis (Nijsten and Wakkee, 2009). However, other factors seem to play important roles in this association: a) psoriasis is associated with depressive symptoms leading to unhealthy lifestyle behaviours such as smoking, alcoholism, decreased physical activity and obesity which are risk factors for other diseases; b) some antipsoriatic therapies such as cyclosporine and topical steroids increase the risk of cardiovascular disease and osteoporosis, respectively; c) some drugs used to treat co-morbidities may induce or exacerbate psoriasis such as  $\beta$ -blockers and lithium; d) psoriatic patients are more likely to visit physicians than healthy people from the general population, which increases their probability of being diagnosed for other diseases (Nijsten and Wakkee, 2009).

- **Consequences for antipsoriatic drug development:** The high proportion of psoriatic patients with comorbidities can make the development of effective and safe antipsoriatic treatments difficult and complex. In fact, these medical problems place additional challenges on treatment paradigms. New treatments need to be developed for patients with comorbid psoriasis in order to prevent severe adverse events. Clinical trials that consider new approaches through the inclusion of patients with cardiovascular disease, liver disease, diabetes and so forth, could lead to treatment recommendations in more realistic conditions reflecting complex psoriasis scenarios (Strober *et al.*, 2009). Additionally, in the case of new systemic medications, possible drug interactions must be taken into consideration. Moreover, the physiological basis linking chronic inflammation with psoriasis and comorbidities should be further investigated taking into account common pathways and inherent differences of psoriatic patients.



**8) Medication formulation, cost and administration inconvenience are connected with success/failure of antipsoriatic treatments**

In the case of drugs approved for clinical use, their costs, patient access, and administration inconvenience must be considered. The importance of medication formulation for the quality of life of psoriatic patients was illustrated in a study performed by Bergstrom *et al.* Using a single blind design, the investigators randomised 32 patients with scalp and non-scalp psoriasis to either clobetasol foam applied to skin and scalp or a combination of clobetasol cream to the skin and clobetasol solution to the scalp. After 2 weeks of treatment, subjects in the foam group exhibited greater improvement in psoriasis severity (mean Psoriasis Activity and Severity Index decrease of 5.0 vs. 3.3,  $p = 0.05$ ). For both global quality of life and skin-specific quality of life, patients treated with clobetasol foam alone reported a greater benefit than those assigned to combination therapy and statistical significance was seen for global quality of life. Moreover, patients using foam reported to spend considerably less time in applying foam relative to other topical medications, whereas cream/solution users reported spending a similar amount of time in applying medication compared with other non-foam topical agents (Bergstrom *et al.*, 2003).

- **Consequences for antipsoriatic drug development:** For localized psoriasis, the cosmetic appearance of new topical formulations and their ease of administration will have an important impact on patient adherence and clinical efficacy (Reid and Kimball, 2005). Such elements will thus warrant serious consideration during formulation. Given that psoriasis exerts a substantial economic toll for patients, cost-effectiveness of new antipsoriatic drugs should be evaluated if possible in order to plan coverage and reimbursement strategies. These considerations may influence the need for a particular therapy and will lead to differences in individual treatment preferences, thereby enhancing patients' compliance with therapy and improving its effectiveness in clinical practice.

**Current & future developments**

Taking into account psoriasis features, future therapeutic approaches must be individualized on the basis of the nature and extension of this disease, its anatomical

locations, and its implications for patient's quality of life as well as the presence of comorbidities. To achieve the development of more effective and safer treatments, further investigations should be pursued mainly in three key scientific areas: a) the elucidation of biological mechanisms involved in psoriasis pathogenesis; b) the development of more predictive *in vitro* and *in vivo* models and c) the integration of pharmacogenetic approaches to antipsoriatic drug discovery process.

Clearly, in the future more pathogenesis-based treatments should be expected from the translation of fundamental scientific discovery of relevant immune pathways into targeted therapies. Further insights into the aetiology of this disease and the availability of prognostic biomarkers could help identify the most appropriate treatments for complex psoriasis scenarios based on individual responsiveness of patients. The development of specific inhibitors with sufficient potency, pharmacokinetic and safety profiles to be considered suitable drugs for testing in psoriatic patients is also anticipated in the future.

More reliable *in vitro* and *in vivo* model systems are needed to dissect the interaction of molecular pathways in psoriatic skin, in order to identify possible therapeutic targets and their behaviour under new treatments. New models will also help to ascertain the role of psoriasis susceptibility genes on the deregulated immune responses of skin cells. The ability of different psoriatic models to predict clinical responses must be established to assess their real importance in antipsoriatic drug discovery. This can be accomplished by systematically comparing data from *in vitro*/animal model studies and clinical trials. Furthermore, a panel of diverse models should be available to provide answers to different questions during all stages of drug development.

Recent progress in tissue engineering techniques could represent a promise for the development of more relevant *in vitro* psoriatic models. Recently, our research group has developed and characterized an *in vitro* psoriatic skin model, completely free of exogenous material (Jean *et al.*, 2009). It was demonstrated that skin substitutes produced with psoriatic keratinocytes respond to retinoic acid treatment ( $10^{-6}$  M) by reducing the epidermal thickness compared with psoriatic substitutes receiving no treatment, whereas substitutes prepared with healthy keratinocytes did not respond (Jean *et al.*, 2011). Moreover, treatment with retinoic acid in psoriatic substitutes led to a restoration (intensity

and localization) of several proliferation and differentiation markers such as K10, involucrin, transglutaminase, loricrin, filagrin, K6 and K16 when compared with psoriatic substitutes without retinoic acid treatment (Jean *et al.*, 2011). These results demonstrated that psoriatic keratinocyte substitutes treated with retinoic acid can display a response similar to psoriatic skin *in vivo* by improving cell proliferation and differentiation (Dubertret, 2009; Trapasso *et al.*, 2009). This suggests that such model could be used for testing new therapies acting on keratinocyte differentiation/proliferation at early stages of drug development. Even if more work is still needed to develop more relevant *in vitro* models by incorporating other cell types present in native pathological skin, the use of tissue engineering approaches could be a key component for early screenings of novel antipsoriatic drugs before animal experimentation.

On the other hand, more investigations are still necessary to improve our understanding of molecular alterations in psoriatic models and how they connect to transcriptional alterations observed in psoriatic lesions through genome level expression analyzes (Lowe *et al.*, 2007). In this regard, pharmacogenomics could solve important questions related to the prediction of disease severity, disease progression or development of comorbidities (Lowe *et al.*, 2007). The identification of simple tests for predicting adverse events associated to new medications would also be highly desirable in order to enhance safety of novel therapeutic agents. Moreover, personalization of treatments based on pharmacogenomic approaches may lead to better and safer outcomes in patients.

A patient-centred vision in managing psoriasis should also be advocated. This would encourage patients to participate in the control of their treatments, taking into account their age, sex, health status and individual preferences within social contexts. Patient education and participation in medical decision-making could enhance their satisfaction and compliance with novel therapies and improve clinical outcomes.

Overall, new collaborations between patients, physicians, academic scientists, funding institutions, pharmaceutical industries and drug regulatory agencies must be expected in the future. They will be needed to hasten the impact of fundamental scientific discoveries related to psoriasis pathogenesis on new selective treatments able to significantly improve patient's quality of life.

## **Acknowledgements**

The authors gratefully thank Dr Dan Lacroix for revision of this review and Amélie Talbot for chemical structures drawing.

## References

- Babu, R. S., Wada, Y., Shen, J., Nguyen, W. (2011). Topical formulations for the treatment of psoriasis. US20110098267.
- Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., G, D. H., Carbonez, A., and Rutgeerts, P. (2003). Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med*, **348**(7), 601-608.
- Beckman, R., Johnson-Leger, C. (2011). Humanized antibodies against IL-22 RA. WO2011061119.
- Ben-Arye, E., Ziv, M., Frenkel, M., Lavi, I., and Rosenman, D. (2003). Complementary medicine and psoriasis: linking the patient's outlook with evidence-based medicine. *Dermatology*, **207**(3), 302-307.
- Bergstrom, K. G., Arambula, K., and Kimball, A. B. (2003). Medication formulation affects quality of life: a randomized single-blind study of clobetasol propionate foam 0.05% compared with a combined program of clobetasol cream 0.05% and solution 0.05% for the treatment of psoriasis. *Cutis*, **72**(5), 407-411.
- Beylot, C., Puissant, A., Bioulac, P., Saurat, J. H., Pringuet, R., and Doutre, M. S. (1979). Particular clinical features of psoriasis in infants and children. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, **87**, 95-97.
- Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. (2001). *Clin Pharmacol Ther*, **69**(3), 89-95.
- Black, L. E., Green, J. D., Rener, J., Dayan, A., Cavagnaro, J. A., Spindler, et al. (2000). Safety evaluation of immunomodulatory biopharmaceuticals: can we improve the predictive value of preclinical studies? *Hum Exp Toxicol*, **19**(4), 205-207.
- Blome, C., Simianer, S., Purwins, S., Laass, A., Rustenbach, S. J., Schaefer, I., Radtke, M., and Augustin, M. (2010). Time needed for treatment is the major predictor of quality of life in psoriasis. *Dermatology*, **221**(2), 154-159.
- Boehncke, W. H. (2005). The psoriasis SCID mouse model: a tool for drug discovery? *Ernst Schering Res Found Workshop*(50), 213-234.
- Boguniewicz, M., and Leung, D. Y. (2006). 10. Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, **117**(2 Suppl Mini-Primer), S475-480.
- Bongartz, T., Sutton, A. J., Sweeting, M. J., Buchan, I., Matteson, E. L., and Montori, V. (2006). Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *Jama*, **295**(19), 2275-2285.

- Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2005). Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature reviews. Immunology*, **5**(9), 699-711.
- Boyd, A. S., and Menter, A. (1989). Erythrodermic psoriasis. Precipitating factors, course, and prognosis in 50 patients. *J Am Acad Dermatol*, **21**(5 Pt 1), 985-991.
- Brown, R. A., Sethi, K. K., Gwanmesia, I., Raemdonck, D., Eastwood, M., and Mudera, V. (2002). Enhanced fibroblast contraction of 3D collagen lattices and integrin expression by TGF-beta1 and -beta3: mechanoregulatory growth factors? *Exp Cell Res*, **274**(2), 310-322.
- Buck, J., Levin, L., Zippin, J. (2010). Method to treat psoriasis and other hyperproliferative skin disorders. WO2010096830.
- Callen, J. P. (2007). Complications and adverse reactions in the use of newer biologic agents. *Semin Cutan Med Surg*, **26**(1), 6-14.
- Carey, W., Glazer, S., Gottlieb, A. B., Lebwohl, M., Leonardi, C., Menter, A., Papp, K., Rundle, A. C., and Toth, D. (2006). Relapse, rebound, and psoriasis adverse events: an advisory group report. *J Am Acad Dermatol*, **54**(4 Suppl 1), S171-181.
- Carrascosa, J. M., Pujol, R., Dauden, E., Hernanz-Hermosa, J. M., Bordas, X., Smandia, J. A., and Ferrandiz, C. (2006). A prospective evaluation of the cost of psoriasis in Spain (EPIDERMA project: phase II). *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **20**(7), 840-845.
- Cavagnaro, J. A. (2002). Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*, **1**(6), 469-475.
- Caviglia, R., Boskoski, I., and Cicala, M. (2008). Long-term treatment with infliximab in inflammatory bowel disease: safety and tolerability issues. *Expert Opin Drug Saf*, **7**(5), 617-632.
- Ciocon, D. H., Horn, E. J., and Kimball, A. B. (2008). Quality of life and treatment satisfaction among patients with psoriasis and psoriatic arthritis and patients with psoriasis only : results of the 2005 Spring US National Psoriasis Foundation Survey. *Am J Clin Dermatol*, **9**(2), 111-117.
- Chartash, E. K., Barchuk, W.T., Paulson, S.K., Valdes, J.M., Kimball, A.B. (2010). Methods of treating plaque psoriasis. US7776331.
- Chen, G., Webster, M., Li, J., Hu, K., Zhu, J., Liu, W. (2011). Anti-inflammatory and psoriasis treatment and protein kinase inhibition by hydroxystilbenes and novel stilbenes derivatives and analogues. US7868047.
- Christophers, E. (2001). Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*, **26**(4), 314-320.

- Christophers, E., Griffiths, C. E., Gaitanis, G., and van de Kerkhof, P. (2006). The unmet treatment need for moderate to severe psoriasis: results of a survey and chart review. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **20**(8), 921-925.
- Chu, K., Wang, Ch. (2011). Composition for treating psoriasis. US20110091472.
- Dam, T. N., Kang, S., Nickoloff, B. J., and Voorhees, J. J. (1999). 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol and cyclosporine suppress induction and promote resolution of psoriasis in human skin grafts transplanted on to SCID mice. *J Invest Dermatol*, **113**(6), 1082-1089.
- Dascalu, A. (2011). Triptans for the treatment of psoriasis. WO2011048496.
- de Arruda, L. H., and De Moraes, A. P. (2001). The impact of psoriasis on quality of life. *Br J Dermatol*, **144 Suppl 58**, 33-36.
- de Vlam, K., Gottlieb, A. B., and Fitzgerald, O. (2008). Biological biomarkers in psoriatic disease. A review. *J Rheumatol*, **35**(7), 1443-1448.
- Dejovin, J. A. (2011). Use of alpha 2 adrenergic receptor agonist for treating or preventing psoriasis. WO2011075267.
- DiBonaventura, M., Wagner, S., Waters, H., and Carter, C. (2010). Treatment patterns and perceptions of treatment attributes, satisfaction and effectiveness among patients with psoriasis. *J Drugs Dermatol*, **9**(8), 938-944.
- DiGiovanna, J. J., Sollitto, R. B., Abangan, D. L., Steinberg, S. M., and Reynolds, J. C. (1995). Osteoporosis is a toxic effect of long-term etretinate therapy. *Arch Dermatol*, **131**(11), 1263-1267.
- Dreiher, J., Weitzman, D., and Cohen, A. D. (2009). Psoriasis and osteoporosis: a sex-specific association? *J Invest Dermatol*, **129**(7), 1643-1649.
- Dreiher, J., Weitzman, D., Shapiro, J., Davidovici, B., and Cohen, A. D. (2008). Psoriasis and chronic obstructive pulmonary disease: a case-control study. *Br J Dermatol*, **159**(4), 956-960.
- Dubertret, L. (2009). Retinoids, methotrexate and cyclosporine. *Curr Probl Dermatol*, **38**, 79-94.
- Dubertret, L., Mrowietz, U., Ranki, A., van de Kerkhof, P. C., Chimenti, S., Lotti, T., Schafer, G., and Group, E. P. S. (2006). European patient perspectives on the impact of psoriasis: the EUROPSO patient membership survey. *Br J Dermatol*, **155**(4), 729-736.
- Farshidi, A., and Sadeghi, P. (2006). Successful treatment of severe refractory atopic dermatitis with efalizumab. *J Drugs Dermatol*, **5**(10), 994-998.

- Feldman, S. R., Fleischer, A. B., Jr., Reboussin, D. M., Rapp, S. R., Bradham, D. D., Exum, M. L., and Clark, A. R. (1997). The economic impact of psoriasis increases with psoriasis severity. *J Am Acad Dermatol*, **37**(4), 564-569.
- Finch, P. W., Murphy, F., Cardinale, I., and Krueger, J. G. (1997). Altered expression of keratinocyte growth factor and its receptor in psoriasis. *Am J Pathol*, **151**(6), 1619-1628.
- Finlay, A. Y., and Coles, E. C. (1995). The effect of severe psoriasis on the quality of life of 369 patients. *Br J Dermatol*, **132**(2), 236-244.
- Fishman, P. (2011). Pharmaceutical composition comprising A3 adenosine receptor agonist (IB-MECA/CF-101) for treatment of psoriasis. WO2011027348.
- Fluhr, J. W., Cavallotti, C., and Berardesca, E. (2008). Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis. *Clin Dermatol*, **26**(4), 380-386.
- Fouere, S., Adjadj, L., and Pawin, H. (2005). How patients experience psoriasis: results from a European survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **19 Suppl 3**, 2-6.
- Gardam, M. A., Keystone, E. C., Menzies, R., Manners, S., Skamene, E., Long, R., and Vinh, D. C. (2003). Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis*, **3**(3), 148-155.
- Gelfand, J. M., Neimann, A. L., Shin, D. B., Wang, X., Margolis, D. J., and Troxel, A. B. (2006). Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *Jama*, **296**(14), 1735-1741.
- Gelfand, J. M., Troxel, A. B., Lewis, J. D., Kurd, S. K., Shin, D. B., Wang, X., Margolis, D. J., and Strom, B. L. (2007). The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol*, **143**(12), 1493-1499.
- Gelfand, J. M., Weinstein, R., Porter, S. B., Neimann, A. L., Berlin, J. A., and Margolis, D. J. (2005). Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom: a population-based study. *Arch Dermatol*, **141**(12), 1537-1541.
- Glick, G. D. (2010). Benzodiazepine compositions for treating epidermal hyperplasia and related disorders. US 7683046.
- Glorgio, E. (2011). Endipalene formulations in the treatment of psoriasis. US20110105624.
- Gokdemir, G., Ari, S., and Koslu, A. (2008). Adherence to treatment in patients with psoriasis vulgaris: Turkish experience. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **22**(3), 330-335.
- Gollnick, H. P., and Dummer, U. (1997). Retinoids. *Clin Dermatol*, **15**(5), 799-810.



- Gordon, K. B., Feldman, S. R., Koo, J. Y., Menter, A., Rolstad, T., and Krueger, G. (2005). Definitions of measures of effect duration for psoriasis treatments. *Arch Dermatol*, **141**(1), 82-84.
- Gordon, K. B., Papp, K. A., Hamilton, T. K., Walicke, P. A., Dummer, W., Li, N., Bresnahan, B. W., and Menter, A. (2003). Efalizumab for patients with moderate to severe plaque psoriasis: a randomized controlled trial. *Jama*, **290**(23), 3073-3080.
- Gottlieb, A. B., Cooper, K. D., McCormick, T. S., Toichi, E., Everitt, D. E., Frederick, B., Zhu, Y., Pendley, C. E., Graham, M. A., and Mascelli, M. A. (2007). A phase 1, double-blind, placebo-controlled study evaluating single subcutaneous administrations of a human interleukin-12/23 monoclonal antibody in subjects with plaque psoriasis. *Curr Med Res Opin*, **23**(5), 1081-1092.
- Gottlieb, A. B., Chaudhari, U., Mulcahy, L. D., Li, S., Dooley, L. T., and Baker, D. G. (2003). Infliximab monotherapy provides rapid and sustained benefit for plaque-type psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, **48**(6), 829-835.
- Griffiths, C. E., Clark, C. M., Chalmers, R. J., Li Wan Po, A., and Williams, H. C. (2000). A systematic review of treatments for severe psoriasis. *Health Technol Assess*, **4**(40), 1-125.
- Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Dyson, M., Valdimarsson, H., and Elder, J. T. (2007). Mouse models of psoriasis. *J Invest Dermatol*, **127**(6), 1292-1308.
- Guideline on clinical investigation of medicinal products indicated for the treatment of psoriasis. Committee for medicinal products for human use. European Medicines Agency (2004).
- Gulliver, W. (2008). Long-term prognosis in patients with psoriasis. *Br J Dermatol*, **159** Suppl 2, 2-9.
- Gupta, A. K., Ellis, C. N., Siegel, M. T., Duell, E. A., Griffiths, C. E., Hamilton, T. A., Nickoloff, B. J., and Voorhees, J. J. (1990). Sulfasalazine improves psoriasis. A double-blind analysis. *Arch Dermatol*, **126**(4), 487-493.
- Gupta, M. A., and Gupta, A. K. (1997). Psoriasis and sex: a study of moderately to severely affected patients. *Int J Dermatol*, **36**(4), 259-262.
- Gupta, M. A., Schork, N. J., Gupta, A. K., Kirkby, S., and Ellis, C. N. (1993). Suicidal ideation in psoriasis. *Int J Dermatol*, **32**(3), 188-190.
- Guttman-Yassky, E., and Krueger, J. G. (2007). Psoriasis: evolution of pathogenic concepts and new therapies through phases of translational research. *Br J Dermatol*, **157**(6), 1103-1115.
- Haider, A. S., Lowes, M. A., Gardner, H., Bandaru, R., Darabi, K., Chamian, F., Kikuchi, T., Gilleaudeau, P., Whalen, M. S., Cardinale, I., Novitskaya, I., and Krueger, J. G.

- (2007). Novel insight into the agonistic mechanism of alefacept in vivo: differentially expressed genes may serve as biomarkers of response in psoriasis patients. *J Immunol*, **178**(11), 7442-7449.
- Herz, G., Blum, G., and Yawalkar, S. (1991). Halobetasol propionate cream by day and halobetasol propionate ointment at night for the treatment of pediatric patients with chronic, localized plaque psoriasis and atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*, **25**(6 Pt 2), 1166-1169.
- Honigsmann, H. (2001). Phototherapy for psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, **26**(4), 343-350.
- Horneff, G., Ebert, A., Fitter, S., Minden, K., Foeldvari, I., Kummerle-Deschner, J., Thon, A., Girschick, H. J., Weller, F., and Huppertz, H. I. (2009). Safety and efficacy of once weekly etanercept 0.8 mg/kg in a multicentre 12 week trial in active polyarticular course juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, **48**(8), 916-919.
- ICH guidance: S6 safety evaluation of biotechnology derived pharmaceuticals. Center for Biologics Evaluation and Research (1997).
- Iizuka, H., Takahashi, H., Honma, M., and Ishida-Yamamoto, A. (2004). Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *J Dermatol*, **31**(4), 271-276.
- Ishida-Yamamoto, A., and Iizuka, H. (1995). Differences in involucrin immunolabeling within cornified cell envelopes in normal and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, **104**(3), 391-395.
- Jean, J., Lapointe, M., Soucy, J., and Pouliot, R. (2009). Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci*, **53**(1), 19-25.
- Jean, J., Soucy, J., and Pouliot, R. Effects of retinoic Acid on keratinocyte proliferation and differentiation in a psoriatic skin model. *Tissue Eng Part A*, **17**(13-14), 1859-1868.
- Johansen, B., Anthonsen, M., Sjørusen, W., Holmeide, A.K., Skattebol, L. (2010). Use of polyunsaturated ketones for the treatment of psoriasis. US20100152293.
- Kamarashev, J., Lor, P., Forster, A., Heinzerling, L., Burg, G., and Nestle, F. O. (2002). Generalised pustular psoriasis induced by cyclosporin a withdrawal responding to the tumour necrosis factor alpha inhibitor etanercept. *Dermatology*, **205**(2), 213-216.
- Katare, O. P., Raza K, Singh B, Dogra S. (2010). Novel delivery system in topical treatment of psoriasis: rigors and vigors. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, **76**, 612-621.
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N., and Braun, M. M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab,

- a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine*, **345**(15), 1098-1104.
- Kemta Lekpa, F., Zahra, K., Pautas, C., Maury, S., Chevalier, X., and Claudepierre, P. (2009). Acute myeloid leukemia after infliximab: a case report. *Clin Exp Rheumatol*, **27**(6), 999-1000.
- Kimball, A. B., and Kupper, T. S. (2008). Future perspectives/quo vadis psoriasis treatment? Immunology, pharmacogenomics, and epidemiology. *Clin Dermatol*, **26**(5), 554-561.
- Kirby, B., and Griffiths, C. E. (2002). Novel immune-based therapies for psoriasis. *Br J Dermatol*, **146**(4), 546-551.
- Koike, T., Harigai, M., Inokuma, S., Inoue, K., Ishiguro, N., Ryu, J., Takeuchi, T., Tanaka, Y., Yamanaka, H., Fujii, K., Freundlich, B., and Suzukawa, M. (2009). Postmarketing surveillance of the safety and effectiveness of etanercept in Japan. *J Rheumatol*, **36**(5), 898-906.
- Kreilgaard, M. (2002). Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **54 Suppl 1**, S77-98.
- Krueger, G., Koo, J., Lebwohl, M., Menter, A., Stern, R. S., and Rolstad, T. (2001). The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. *Arch Dermatol*, **137**(3), 280-284.
- Krueger, G. G. (2002). Clinical features of psoriatic arthritis. *Am J Manag Care*, **8**(6 Suppl), S160-170.
- Kwon, H. J., Cote, T. R., Cuffe, M. S., Kramer, J. M., and Braun, M. M. (2003). Case reports of heart failure after therapy with a tumor necrosis factor antagonist. *Ann Intern Med*, **138**(10), 807-811.
- Lamba, S., and Lebwohl, M. (2001). Combination therapy with vitamin D analogues. *Br J Dermatol*, **144 Suppl 58**, 27-32.
- Lebwohl, M., and Ali, S. (2001a). Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **45**(4), 487-498; quiz 499-502.
- Lebwohl, M., and Ali, S. (2001b). Treatment of psoriasis. Part 2. Systemic therapies. *J Am Acad Dermatol*, **45**(5), 649-661; quiz 662-644.
- Leonardi, C. L., Powers, J. L., Matheson, R. T., Goffe, B. S., Zitnik, R., Wang, A., Gottlieb, A. B. (2003). Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *The New England journal of medicine*, **349**(21), 2014-2022.

- Lesko, L. J., and Atkinson, A. J., Jr. (2001). Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 347-366.
- Lowe, N. J., Wieder, J. M., Rosenbach, A., Johnson, K., Kunkel, R., Bainbridge, C., Bourget, T., Dimov, I., Simpson, K., Glass, E., and Grabie, M. T. (1996). Long-term low-dose cyclosporine therapy for severe psoriasis: effects on renal function and structure. *J Am Acad Dermatol*, **35**(5 Pt 1), 710-719.
- Lowes, M. A., Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, **445**(7130), 866-873.
- Mallbris, L., Akre, O., Granath, F., Yin, L., Lindelof, B., Ekbom, A., and Stahle-Backdahl, M. (2004). Increased risk for cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients. *Eur J Epidemiol*, **19**(3), 225-230.
- Marcoux, D., and Prost, Y. (2002). Pediatric psoriasis revisited. *J Cutan Med Surg*, **6**(3 Suppl), 22-28.
- Marrakchi S, Guigue P, Renshaw BR, Puel A, Pei XY, Fraitag S, *et al.* (2011). Interleukin-36- receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *N Engl J Med* **365**, 620-8
- McKay, I. A., and Leigh, I. M. (1995). Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis. *Clin Dermatol*, **13**(2), 105-114.
- Menter, M. A., See, J. A., Amend, W. J., Ellis, C. N., Krueger, G. G., Lebwohl, M., Morison, W. L., Prystowsky, J. H., Roenigk, H. H., Jr., Shupack, J. L., Silverman, A. K., Weinstein, G. D., Yocum, D. E., and Zanolli, M. D. (1996). Proceedings of the Psoriasis Combination and Rotation Therapy Conference. Deer Valley, Utah, Oct. 7-9, 1994. *J Am Acad Dermatol*, **34**(2 Pt 1), 315-321.
- Mestas, J., and Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, **172**(5), 2731-2738.
- Miketin, B. (2007). Method for treatment of skin disorders. US7195781.
- Mizutani, H., Yamanaka, K., Konishi, H., and Murakami, T. (2003). Animal models of psoriasis and pustular psoriasis. *Arch Dermatol Res*, **295** Suppl 1, S67-68.
- Moady, M. (2006). Antipsoriatic compositions comprising an asphodelus extract, methods of making and method of using. US RE39199.
- Mohan, N., Edwards, E. T., Cupps, T. R., Oliverio, P. J., Sandberg, G., Crayton, H., Richert, J. R., and Siegel, J. N. (2001). Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*, **44**(12), 2862-2869.

- Mrowietz, U., Christophers, E., and Altmeyer, P. (1999). Treatment of severe psoriasis with fumaric acid esters: scientific background and guidelines for therapeutic use. The German Fumaric Acid Ester Consensus Conference. *Br J Dermatol*, **141**(3), 424-429.
- Müller, K., Wolfgang, W., Gürster, D., Peters, S., Née, P. (2000). 10-substituted 1,8-dihydroxy-9(10H) anthracenone pharmaceuticals. US6127426.
- Naldi, L., and Griffiths, C. E. (2005). Traditional therapies in the management of moderate to severe chronic plaque psoriasis: an assessment of the benefits and risks. *The British journal of dermatology*, **152**(4), 597-615.
- Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y. J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*, **202**(1), 135-143.
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H., and Barker, J. (2009). Psoriasis. *N Engl J Med*, **361**(5), 496-509.
- Nijsten, T., and Wakkee, M. (2009). Complexity of the association between psoriasis and comorbidities. *J Invest Dermatol*, **129**(7), 1601-1603.
- Nijsten, T. E., and Stern, R. S. (2003). The increased risk of skin cancer is persistent after discontinuation of psoralen+ultraviolet A: a cohort study. *J Invest Dermatol*, **121**(2), 252-258.
- Opmeer, B. C., Heydendael, V. M., deBorgie, C. A., Spuls, P. I., Bossuyt, P. M., Bos, J. D., and de Rie, M. A. (2007). Patients with moderate-to-severe plaque psoriasis preferred oral therapies to phototherapies: a preference assessment based on clinical scenarios with trade-off questions. *J Clin Epidemiol*, **60**(7), 696-703.
- Oranje, A. P., Marcoux, D., Svensson, A., Prendiville, J., Krafchik, B., Toole, J., Rosenthal, D., de Waard-van der Spek, F. B., Molin, L., and Axelsen, M. (1997). Topical calcipotriol in childhood psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, **36**(2 Pt 1), 203-208.
- Ortonne, J. P. (2003). Clinical response to alefacept: results of a phase 3 study of intramuscular administration of alefacept in patients with chronic plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **17 Suppl 2**, 12-16.
- Papp, K. A. (2006). The long-term efficacy and safety of new biological therapies for psoriasis. *Archives of dermatological research*, **298**(1), 7-15.
- Pearce, D. J., Singh, S., Balkrishnan, R., Kulkarni, A., Fleischer, A. B., and Feldman, S. R. (2006). The negative impact of psoriasis on the workplace. *J Dermatolog Treat*, **17**(1), 24-28.
- Pelliccia, M. T., Gianella, A., Gianella, J. (2001). Resveratrol for the treatment of exfoliative eczema, acne or psoriasis. EP1138323.

- Petersen, T. K. (2006). In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **99**(2), 104-115.
- Poulin, Y., Papp, K. A., Wasel, N. R., Andrew, R., Fraquelli, E., Bernstein, G., and Chan, D.A. (2010) Canadian online survey to evaluate awareness and treatment satisfaction in individuals with moderate to severe plaque psoriasis. *Int J Dermatol*, **49**(12), 1368-1375.
- Pouliot, Y., Gauthier, S., Lamiot, E., Aattouri, N., Juneau, C. (2006). Composition for treating psoriasis. US 20060127493 .
- Pugashetti, R., and Koo, J. (2009). Efalizumab discontinuation: a practical strategy. *J Dermatolog Treat*, **20**(3), 132-136.
- Puig, L., Roe, E., Garcia-Navarro, X., Corella, F., and Alomar, A. (2009). Efalizumab treatment of psoriasis vulgaris: a cohort study in outpatient clinical practice. *Clin Exp Dermatol*, **34**(4), 469-475.
- Rapp, S. R., Feldman, S. R., Exum, M. L., Fleischer, A. B., Jr., and Reboussin, D. M. (1999). Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*, **41**(3 Pt 1), 401-407.
- Rashmi, R., Rao, K. S., and Basavaraj, K. H. (2009). A comprehensive review of biomarkers in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, **34**(6), 658-663.
- Reid, D. C., and Kimball, A. B. (2005). Clobetasol propionate foam in the treatment of psoriasis. *Expert Opin Pharmacother*, **6**(10), 1735-1740.
- Richards, H. L., Fortune, D. G., O'Sullivan, T. M., Main, C. J., and Griffiths, C. E. (1999). Patients with psoriasis and their compliance with medication. *J Am Acad Dermatol*, **41**(4), 581-583.
- Rodewald, E. J., Housman, T. S., Mellen, B. G., and Feldman, S. R. (2002). Follow-up survey of 308-nm laser treatment of psoriasis. *Lasers Surg Med*, **31**(3), 202-206.
- Rogalski, C., Meyer-Hoffert, U., Proksch, E., and Wiedow, O. (2002). Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*, **118**(1), 49-54.
- Sampogna, F., Gisondi, P., Melchi, C. F., Amerio, P., Girolomoni, G., and Abeni, D. (2004). Prevalence of symptoms experienced by patients with different clinical types of psoriasis. *Br J Dermatol*, **151**(3), 594-599.
- Schafer, P. H., Muller, G.W., Rohane, P.E.W. (2009). Methods for the treatment of psoriasis or psoriatic arthritis using cyclopropyl-N-(2-[(1S)-1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl) ethyl]-3-oxoisindoline-4-yl) carboxamide. US20090239926.

- Schon, M. P. (2008). Animal models of psoriasis: a critical appraisal. *Exp Dermatol*, **17**(8), 703-712.
- Serabian, M. A., and Pilaro, A. M. (1999). Safety assessment of biotechnology-derived pharmaceuticals: ICH and beyond. *Toxicol Pathol*, **27**(1), 27-31.
- Seston, E. M., Ashcroft, D. M., and Griffiths, C. E. (2007). Balancing the benefits and risks of drug treatment: a stated-preference, discrete choice experiment with patients with psoriasis. *Arch Dermatol*, **143**(9), 1175-1179.
- Shaish, A., Dror, H., Shoshana, G. (2011). Methods for treating psoriasis. WO2011070568.
- Sims, J. (2001). Assessment of biotechnology products for therapeutic use. *Toxicol Lett*, **120**(1-3), 59-66.
- Smith, K. C., and Lebwohl, M. (2000). Topical antipsoriatics. *Skin Therapy Lett*, **5**(2), 1-2.
- Stern, R. S., and Lange, R. (1988). Non-melanoma skin cancer occurring in patients treated with PUVA five to ten years after first treatment. *J Invest Dermatol*, **91**(2), 120-124.
- Stern, R. S., Nijsten, T., Feldman, S. R., Margolis, D. J., and Rolstad, T. (2004). Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **9**(2), 136-139.
- Sterry, W., Barker, J., Boehncke, W. H., Bos, J. D., Chimenti, S., Christophers, E., De La Brassinne, M., et al. (2004). Biological therapies in the systemic management of psoriasis: International Consensus Conference. *Br J Dermatol*, **151 Suppl 69**, 3-17.
- Strober, B., Berger, E., Cather, J., Cohen, D., Crowley, J. J., Gordon, K. B., Gottlieb, A., et al. (2009). A series of critically challenging case scenarios in moderate to severe psoriasis: a Delphi consensus approach. *J Am Acad Dermatol*, **61**(1 Suppl 1), S1-S46.
- Su, Y. H., and Fang, J. Y. (2008). Drug delivery and formulations for the topical treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Deliv*, **5**(2), 235-249.
- Tan, J. H. (2004). Psoriasis treatment. US20040071791.
- Tanaka, S., Sakata, Y., Morimoto, K., Tambe, Y., Watanabe, Y., Honda, G., Tabata, M., et al. (2001). Influence of natural and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1. *Planta Med*, **67**(2), 108-113.
- Tas, S., Oktay, A. (2009a). Pharmaceutical composition comprising a corticosteroid and a specific inhibitor of hedgehog/ smoothed signaling. US7629352.
- Tas, S., Oktay, A. (2009b). Use of cyclopamine in the treatment of psoriasis. US7605167.

- Tonel, G., and Conrad, C. (2009). Interplay between keratinocytes and immune cells-- recent insights into psoriasis pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**(5), 963-968.
- Trapasso, E., Cosco, D., Celia, C., Fresta, M., and Paolino, D. (2009). Retinoids: new use by innovative drug-delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, **6**(5), 465-483.
- van de Kerkhof, P. C. (2006). How to position antipsoriatic treatments? *J Dermatolog Treat*, **17**(6), 325-326.
- van de Kerkhof, P. C. (2007). The evolution of the psoriatic lesion. *Br J Dermatol*, **157**(1), 4-15.
- van de Kerkhof, P. C. (2008). Options for the treatment of psoriasis: a multifactorial approach. *Clin Dermatol*, **26**(5), 419-423.
- Van Voorhees, A. S., and Fried, R. (2009). Depression and quality of life in psoriasis. *Postgrad Med*, **121**(4), 154-161.
- Villadsen, L. S., Schuurman, J., Beurskens, F., Dam, T. N., Dagnaes-Hansen, F., Skov, L., Rygaard, J., et al. (2003). Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J Clin Invest*, **112**(10), 1571-1580.
- Wang, L., Liu, X.M., Mo, L., Mencher, S.K, McCarron, JP. (2009). Methods of treating an inflammatory related disease. US7582670.
- Warren, R. B., Smith, R. L., Campalani, E., Eyre, S., Smith, C. H., Barker, J. N., Worthington, J., and Griffiths, C. E. (2009). Outcomes of methotrexate therapy for psoriasis and relationship to genetic polymorphisms. *Br J Dermatol*, **160**(2), 438-441.
- Watanabe, H., Kawaguchi, M., Fujishima, S., Ogura, M., Matsukura, S., Takeuchi, H., Ohba, M., Sueki, H., Kokubu, F., Hizawa, N., Adachi, M., Huang, S. K., and Iijima, M. (2009). Functional characterization of IL-17F as a selective neutrophil attractant in psoriasis. *J Invest Dermatol*, **129**(3), 650-656.
- Weinstein, G. D., Koo, J. Y., Krueger, G. G., Lebwohl, M. G., Lowe, N. J., Menter, M. A., Lew-Kaya, D. A., Sefton, J., Gibson, J. R., and Walker, P. S. (2003). Tazarotene cream in the treatment of psoriasis: Two multicenter, double-blind, randomized, vehicle-controlled studies of the safety and efficacy of tazarotene creams 0.05% and 0.1% applied once daily for 12 weeks. *J Am Acad Dermatol*, **48**(5), 760-767.
- Weinstein, G. D., Krueger, G. G., Lowe, N. J., Duvic, M., Friedman, D. J., Jegasothy, B. V., Jorizzo, J. L., Shmunes, E., et al. (1997). Tazarotene gel, a new retinoid, for topical therapy of psoriasis: vehicle-controlled study of safety, efficacy, and duration of therapeutic effect. *J Am Acad Dermatol*, **37**(1), 85-92.
- Williams, C. H., Hong CC. (2011). Multi-step usage of in vivo models during rational drug desing and discovery. *Int J Mol Sci*, **12**, 2262-2274.



- Wylie, G., Evans, C. D., and Gupta, G. (2009). Reduced libido and erectile dysfunction: rarely reported side-effects of methotrexate. *Clin Exp Dermatol*, **34**(7), e234.
- Yamauchi, P. S., Rizk, D., Kormeili, T., Patnaik, R., and Lowe, N. J. (2003). Current systemic therapies for psoriasis: where are we now? *J Am Acad Dermatol*, **49**(2 Suppl), S66-77.
- Yu, A. P., Tang, J., Xie, J., Wu, E. Q., Gupta, S. R., Bao, Y., and Mulani, P. M. (2009). Economic burden of psoriasis compared to the general population and stratified by disease severity. *Curr Med Res Opin*, **25**(10), 2429-2438.
- Zarmanian, I., Rogan-Grgas, J. (2004). Pharmaceutical compositions for treating psoriasis. US6693100.
- Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, **445**(7128), 648-651.

## **Annexe 2. Psoriasis : causes, traitements et modèles pathologiques**

## **Avant-propos**

Cette annexe fait l'objet d'un livre intitulé *Psoriasis: causes, treatments and pathological models* publié par Nova Sciences Publisher, Inc. Dermatology-Laboratory and Clinical Research. **ISBN:** 978-1-61209-691-9, 2011

Jessica Jean a rédigé la préface et les parties concernant les caractéristiques histologiques du psoriasis, l'hyperprolifération et la différenciation anormale des kératinocytes, les traitements, les modèles pathologiques et les conclusions. J'ai rédigé les sections concernant l'histoire, la prévalence, les degrés de sévérité du psoriasis, le stress oxydant dans le psoriasis et les avancements des concepts liés à la pathogenèse du psoriasis. Simon Guérad a rédigé les parties reliées aux types de psoriasis, l'immunologie du psoriasis et la génétique du psoriasis. La rédaction de ce livre a été réalisée sous la supervision de la Dre Roxane Pouliot.

## Résumé

Le psoriasis est une maladie cutanée inflammatoire caractérisée entre autres par l'hyperprolifération et la différenciation anormale des kératinocytes. Il affecte environ 2% de la population mondiale, autant les hommes que les femmes, et ce, fondamentalement entre les 15 et les 30 ans. Le psoriasis est généralement reconnu par la présence de plaques rouges bien délimitées, qui touchent la plupart des surfaces du corps, avec une prédilection par les genoux, les coudes et le cuir chevelu. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une maladie mortelle, il peut altérer gravement la qualité de vie des patients. De nos jours, il existe une grande variété d'options thérapeutiques pouvant être utilisées pour traiter le psoriasis y compris les traitements topiques, systémiques et biologiques. Toutefois, dans la plupart des cas, ceux-ci permettent de contrôler les symptômes, sans offrir une guérison totale de la maladie. Au cours de la dernière décennie, de nombreux modèles pathologiques ont été développés pour mieux comprendre le psoriasis. Parmi ceux-ci, les modèles *in vitro* offrent une alternative intéressante comparativement aux modèles animaux. En effet, leur développement représente un élément clé dans la lutte contre le psoriasis. Cette révision complète sur le psoriasis inclut les caractéristiques les plus représentatives de cette pathologie, ses possibles causes, les traitements existants (en incluant leurs mécanismes d'action et leurs effets secondaires) aussi bien que l'état actuel de la recherche sur les modèles pathologiques développés dans le but de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie.

## **Psoriasis: causes, treatments and pathological models**

Jessica Jean<sup>1</sup>, Martha-Estrella García-Pérez<sup>1</sup>, Simon Guérad<sup>1</sup>, Roxane Pouliot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre LOEX de l'Université Laval, Génie tissulaire et régénération: LOEX - Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec, Aile-R, 1401 18<sup>e</sup> rue, Québec, Québec, Canada, G1J 1Z4 and Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, G1V 0A6, Canada

### **Preface**

Psoriasis is a common, inflammatory, multisystemic skin disease characterized by hyperproliferation and abnormal differentiation of epidermis. It affects approximately 2 % of the world's population, both men and women, aged between 15 and 30 years. Psoriasis is typically recognized with sharply demarcated red scaly dermatological plaques affecting most body surfaces, but especially knees, elbows and scalp. Generally, psoriasis is not a fatal disease but the presence of physical and psychological pains can severely affect patients' quality of life. There is a wide variety of therapeutic options to treat psoriasis including topical, phototherapy, systemic and biological therapies. These treatments can control or prevent symptoms; however there is still no cure available. During the past decade, many pathological models have been developed to better understand psoriasis. Among them, *in vitro* models offer an interesting alternative to animal ones. Their development represents a key component in the fight against psoriasis. This complete review of psoriasis presents the characteristics of this pathology, the suggested causes, the treatments (side effects and mechanisms of action) and the current state of research on pathological models to better understand mechanisms of psoriasis.

## **Psoriasis**

### **History**

Psoriasis is probably one of the longest known human illnesses but, even today; this pathology is not well understood. Psoriasis was described throughout history as a kind of leprosy. In the late 18<sup>th</sup> century, it became known as Willan's lepra when English dermatologists Robert Willan and Thomas Bateman differentiated it from other skin diseases (Meenan, 1955). However, Willan also wrote about another skin condition, which he called psoriasis. In 1841, this skin disorder was finally named "psoriasis" by the dermatologist Ferdinand von Hebra. The name was derived from the greek word *psora* which means "to itch" (Glickman, 1986).

### **Prevalence**

The prevalence of psoriasis is estimated to be around 2% (Christophers, 2001). It varies depending on the geographic region and the population groups studied. Thus, in a study of twin pairs in Australia, it was demonstrated that psoriasis occurred more frequently in southern states than in the warmer northern states (Duffy *et al.*, 1993). Similarly, a study in Norway noted that higher prevalence rates of psoriasis are observed in the northern and cooler parts of the country and lower rates in the southern regions (Braathen *et al.*, 1989). Additionally, several studies have indicated that ethnic factors such as genetic and behavioral factors may influence the prevalence of psoriasis (Neimann, 2006). For instance, the frequency ranges are 0% in the Samoan population to nearly 12.0% in Arctic Kazach'ye (Farber and Nall 1998). In the United States, the prevalence of psoriasis in white American population is estimated to 2.5%, whereas in African Americans it is only 1.3% (Gelfand *et al.*, 2005a). Data for prevalence in Europe including the United Kingdom, Norway and Croatia shows small variations. Thus, it ranges from 1.6% (United Kingdom), 1.4% (Norway) and 1.6% (Croatia) (Christophers, 2001). In East Africa, the prevalence of psoriasis is 0.7% while in the Henan district of China it is only 0.4% (Farber and Nall, 1998).

Most studies also suggest that psoriasis is slightly more prevalent among men than women (Naldi, 2004). Effectively, a systematic survey conducted in Denmark showed that the prevalence of psoriasis for men was of 4.2% while the prevalence for women was of 3.3% (Brandrup and Green, 1981). However, in patients under 20 years old, the prevalence of psoriasis was greater in women than in men, suggesting an earlier onset age of psoriasis in women (Gelfand *et al.*, 2005b; Henseler and Christophers, 1985). Moreover, prevalence data of psoriasis reveals that the frequency of psoriasis decreases in older individuals (Ferrandiz *et al.*, 2001; Gelfand *et al.*, 2005b). This decrease has not been elucidated. However, Neimann *et al.* have proposed three possible explanations: first, remission could be observed in older individuals; second, they do not come to medical attention and consequently, are not captured by medical approaches measuring prevalence and finally, a higher mortality rate from associated comorbidities and risky behaviors could explain the decrease (Neimann, 2006).

### **Types of psoriasis**

Distinct types of psoriasis exist and they are regrouped within the general term “psoriasis”. The classification proposed is based solely on the phenotype and is intended to be used both in clinic and research (American Academy of Dermatology, 2008; Canadian Dermatology Association, 2009; Griffiths *et al.*, 2007). Although phenotype-based, those different types of psoriasis can also differ in their pathogenesis and therefore, treatments options.

#### *Plaque psoriasis*

Plaque psoriasis is by far the most common type (about 90%) (Griffiths and Barker, 2007). In fact, plaque psoriasis is sometimes referred as simply “psoriasis”. Phenotypically, it is characterized by red, scaly plaques with a diameter of at least 0.5 cm. Also, the distinction between plaques and normal skin is usually very clear. These plaques are sometimes more active at the edge which can lead to an annular shape with normal skin in the middle and affected skin on the border. Plaques are often symmetrically distributed over the body. This distribution is variable between patients but some areas are more likely to be affected (e.g., elbows, knees and scalp) than some others (e.g., face). In fact, a sub-classification

following the region affected exists (flexural psoriasis, nail psoriasis, scalp psoriasis, palmoplantar psoriasis and seborrheic dermatitis). This sub-classification is clinically very important to guide clinicians in the treatment.

#### *Guttate psoriasis*

Guttate psoriasis is an acute form of psoriasis in which small papules erupt on the trunk, the limbs or the face. It often appears following a streptococcal infection.

#### *Pustular psoriasis*

Pustular psoriasis, as its name implies, is the apparition of small pustules appearing either at the edge or in the middle of an existing inflammatory plaque.

#### *Erythrodermic psoriasis*

Erythrodermic psoriasis is characterized by the acute apparition of a diffusely red, inflammatory patch covering almost the entire body surface (90% or more). In comparison to plaque psoriasis flares, where large and very thick plaques appear, patients suffering from erythrodermic psoriasis will have fewer plaques and those will not be as thick.

### **Severity of psoriasis**

Severity of psoriasis is assessed by how much body surface area the disease covers and is frequently classified as mild, moderate and severe. The gold standard for the assessment of extensive psoriasis is the Psoriasis Area and Severity Index (PASI), which was developed in 1978 by Fredricksson and Pettersson for use in a clinical trial (Fredriksson and Pettersson, 1978). The PASI is a measure of average redness, thickness and scaliness of the lesions (graded on a 0-4 scale) and considers the area of involvement, thereby resulting in a single score for psoriasis severity (Feldman and Krueger, 2005). Recently, the pharmaceutical companies and the US Food and Drug Administration have considered a reduction from baseline PASI score of  $\geq 75\%$  (PASI 75), as a primary endpoint in clinical trials in order to assess the effectiveness of anti-psoriatic treatments (Ellis and Krueger, 2001; Mease *et al.*, 2000). In fact, patients reaching PASI 75 show important improvements in psoriasis severity and in their quality of life (Carlin *et al.*, 2004). Even if PASI is the



most commonly used measure of psoriasis severity in clinical trials, it does have a number of limitations (Feldman and Krueger, 2005). For instance, PASI is rarely used by dermatologists in clinical practice (Carlin *et al.*, 2004). Moreover, PASI has a poor sensitivity to change for relatively small areas of involvement. Thus, in studies involving treatment for small plaques, target lesion assessments are generally preferred (Feldman and Krueger, 2005).

### **Histological Features**

The histology of psoriatic skin reveals numerous hallmarks of the pathology including, (1) hyperplasia of the epidermis, (2) accumulation of inflammatory cells in the skin and (3) increased angiogenesis (Griffiths and Barker, 2007).

First, a pronounced thickening of the epidermis is observed in psoriatic skin, illustrating the hyperproliferation of keratinocytes (Lowes *et al.*, 2007). Also, there is an elongation of the epidermal *rete* at the dermo-epidermal junction. On the other hand, the altered maturation of keratinocytes is reflected by the shivering or the absence of the granular layer, in which keratinocytes would normally enter terminal differentiation. This incomplete terminal differentiation leads to the presence of nucleated cells in the SC, a specific hallmark of psoriasis (Schon and Boehncke, 2005) (Figure 46). Those alterations in the epidermis result in an immature skin which has an increased permeability.

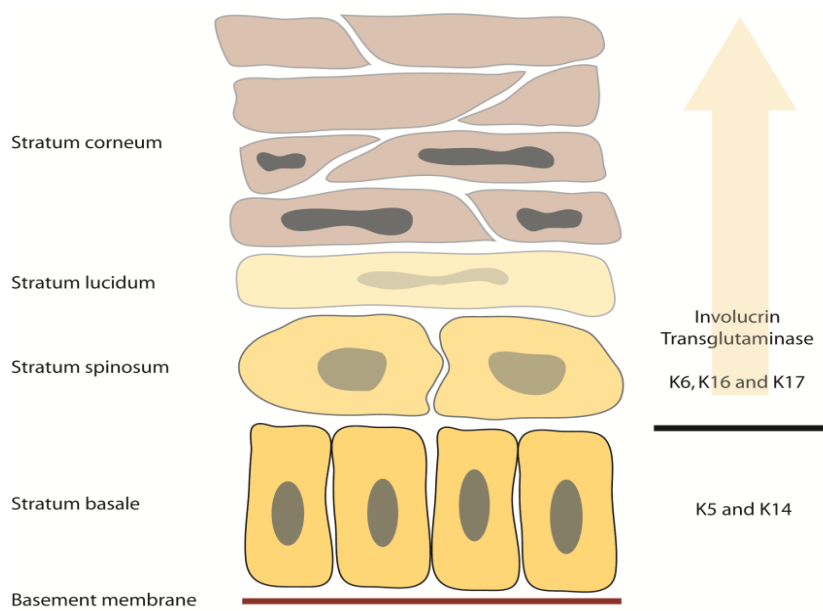


Figure 46 Schematic representation of the histological aspect of hyperproliferative psoriatic epidermis

Second, an important accumulation of inflammatory cells in both the dermis and the epidermis demonstrates the inflammatory nature of psoriasis itself. A wide variety of inflammatory cells can be found, including both polymorphonuclear (neutrophils) and mononuclear leukocytes (T lymphocytes, monocytes and dendritic cells) (Barker *et al.*, 1992; Lowes *et al.*, 2007). Accumulation of neutrophils in the SC is known as Munro's microabscesses and is specific to psoriasis (van de Kerkhof and Lammers, 1987). These inflammatory cells have an increased adherence in psoriatic skin and are believed to have a crucial part in the disease's pathogenesis (Barker *et al.*, 1992).

Finally, blood vessels in psoriatic plaques are abnormal. Their size and their number are significantly increased (Creamer *et al.*, 2002; Heidenreich *et al.*, 2009). This dilatation of blood vessels would be responsible for the redness of the psoriatic plaques. When plaques are removed, punctuated bleeding can occur. This is called the Auspitz sign and it can be explained by the infiltration of large blood vessels in the elongated *rete* ridge. Increased angiogenesis is also important in the disease's pathogenesis and is closely linked with the inflammation and leukocytes accumulation within the skin (Creamer *et al.*, 2002; Heidenreich *et al.*, 2009).

## **Causes of psoriasis**

Psoriasis is an inflammatory, multisystemic skin disease characterized by hyperproliferation and abnormal differentiation of epidermis (Bowcock 2005; Krueger and Bowcock 2005; Lowes *et al.*, 2007; Schon and Boehncke, 2005). Even if progress had been achieved in our comprehension of the pathogenesis of psoriasis, the exact cause is still unknown (Sullivan-Whalen and Gilleaudeau, 2007). Today, four potential factors are suggested to be involved in the etiology of psoriasis: hyperproliferation and abnormal differentiation of the epidermis, oxidative stress, immune cells and genetics.

### **Hyperproliferation and abnormal differentiation of psoriatic keratinocytes**

As previously mentioned, psoriasis is a hyperproliferative disease (Capon *et al.*, 2003; Hwu *et al.*, 2005). This hyperproliferation implies that psoriatic keratinocytes have a faster renewal than normal epidermis. In fact, psoriatic keratinocytes achieve the surface of the skin in 7 to 10 days while, in the normal skin, the turn over process is about 28 to 50 days (Lapteva and Nikulin, 2005). Pathological keratinocytes undergo the differentiation process more rapidly than normal keratinocytes and when they reach the surface of the skin, their maturation is incomplete (Detmar *et al.*, 1990).

The abnormal differentiation process brings many changes in the expression of cell differentiation markers; especially for the keratins. Effectively, the basal keratins 5 and 14 are overexpressed in psoriasis (Mils *et al.*, 1994). However, other keratins such as the suprabasal keratins 1 and 10, are underexpressed in psoriatic epidermis (Paramio *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002). In psoriasis, these keratins are partially replaced by hyperproliferation ones: keratins 6, 16 and 17, well-known in the literature to be expressed in hyperproliferative tissues such as psoriatic skins but absent in normal skins (Bhawan *et al.*, 2004; Leigh *et al.*, 1995; Presland *et al.*, 2004). Enzymes and proteins involved in the formation of the *stratum corneum* (SC) are precociously expressed (Table 22; Figure 46). It is the case of transglutaminase and involucrin. Psoriatic skins also demonstrate a low expression of loricrin and filaggrin, which are normally expressed in the granular layer (Hohl, 1993). An exhaustive list of the differentiation markers and their expression in normal and psoriatic skins can be seen in Table 22

Table 22 Expression of differentiation markers in normal and psoriatic skin

Markers	Expression in normal skin	Expression in psoriatic skin	References
<b><i>Epidermal</i></b>			
Keratins 5 and 14	<i>Stratum basale</i>	Augmentation	(Stoler <i>et al.</i> , 1988)
Keratins 1 and 10	<i>Stratum suprabasale</i>	Reduction	(McKay and Leigh, 1995)
Keratins 6, 16 and 17	<i>Stratum suprabasale</i>	Not expressed	(Bhawan <i>et al.</i> , 2004; Leigh <i>et al.</i> , 1995)
Transglutaminase	<i>Stratum spinosum</i>	Augmentation and/or more precocious	(Schroeder <i>et al.</i> , 1992)
Involucrin	<i>Stratum spinosum</i>	Augmentation and/or more precocious	(Ishida-Yamamoto <i>et al.</i> , 1996)
Loricrin	<i>Stratum granulosum</i>	Totally or partially absent	(Ishida-Yamamoto <i>et al.</i> , 1996)
Filaggrin	<i>Stratum granulosum</i>	Totally or partially absent	(Mils <i>et al.</i> , 1994)
<b><i>Dermo-epidermal</i></b>			
Laminin	Basement membrane	Discontinued	(Vaccaro <i>et al.</i> , 2002)
Collagen VII	Basement membrane	Discontinued	(Vaccaro <i>et al.</i> , 2002)
<b><i>Dermal</i></b>			
Chondroitin sulfate	Upper dermis	Diffused	(Smetsers <i>et al.</i> , 2004)
Collagen I	Dermis	Dermis	(Black <i>et al.</i> , 2005)
Fibronectin	Dermis	Dermis	(Hynes, 1990)

## **Oxidative Stress in Psoriasis**

A significant increase of scientific information supports the view that the skin's redox state is involved in skin disorders pathogenesis (Briganti and Picardo, 2003; Fuchs *et al.*, 2001). Skin functions as an interface between the body and the environment; it is chronically exposed to both endogenous and environmental oxidant agents, leading to generation of reactive oxygen species (ROS). Overproduction or an inadequate removal of ROS result in oxidative stress, leading to dysregulated signal transduction and pathological changes in cell and tissue functions (Trouba *et al.*, 2002).

In normal skin, keratinocytes are the major source of ROS, whereas in psoriatic skin, ROS are generated by both keratinocytes and activated neutrophils (Ginsburg and Kohen, 1995; Pelle *et al.*, 2005). Psoriatic keratinocytes have a higher exposition to endogenous oxidants than those in normal skin. Additionally, psoriatic skin shows a defect in epidermal barrier function, which is a major pathophysiological factor (Lee *et al.*, 2006). Alterations in ceramide content and abnormal lipid organization of psoriatic *stratum corneum* are primarily involved in this reduced barrier function (Motta *et al.*, 1994). These alterations could be closely linked to lower skin defensive functions against external pro-oxidant agents, which is a critical factor driving a major skin exposition to environmental risk (Elias and Feingold, 2001). Altogether, these factors make psoriatic skin a tissue with abnormally high oxidative stress.

Studies on the implication of oxidative stress in psoriasis etiology mainly focused on establishing a correlation between antioxidant imbalance and oxidative damage. The results suggest a deficient antioxidant system, which could be a factor involved in the pathogenesis of psoriasis (Kural *et al.*, 2003; Shilov and Sergienko, 2000).

### *Psoriatic Blood Samples*

Analyses of blood samples generally reveal lower concentration of low-molecular-weight antioxidants and antioxidant enzyme activities when compared with blood from normal donors (Fairris *et al.*, 1989; Kokcam and Naziroglu, 1999) (Table 23). Erythrocytes'

membranes from psoriatic patients have less vitamin E, selenium and glutathione (Rocha-Pereira *et al.*, 2004b). Similarly, glutathione, selenium and  $\beta$ -carotene levels are reduced in psoriatic plasma (Fairris *et al.*, 1989; Kokcam and Naziroglu, 1999).

Some studies show that psoriatic erythrocytes present no significant differences in catalase (CAT) activity (Rocha-Pereira *et al.*, 2004a; Therond *et al.*, 1996), whereas most of reports show lower CAT activity as compared with normal erythrocytes (Drewa *et al.*, 2002; Karaman *et al.*, 2008; Kural *et al.*, 2003). Higher glutathione peroxidase (GPx) activity in psoriatic erythrocytes has been determined by some studies (Karaman *et al.*, 2008; Therond *et al.*, 1996) whereas a majority of reports shows lower GPx activity when compared with healthy controls (Kural *et al.*, 2003; Utas *et al.*, 2002; Yildirim *et al.*, 2003). As regards to superoxide dismutase (SOD) activity, the majority of reports shows that it is lower in psoriatic erythrocytes (Drewa *et al.*, 2002; Karaman *et al.*, 2008; Kural *et al.*, 2003) whereas others describe either no significant differences (Rocha-Pereira *et al.*, 2004a) or a higher SOD activity (Therond *et al.*, 1996). Lower and higher SOD activities have been reported in psoriatic plasma (Baz *et al.*, 2003; Kural *et al.*, 2003).

Experimental evidence demonstrates that psoriatic blood samples display increased malondialdehyde levels, suggesting that psoriasis is associated with a lipid peroxidation status (Utas *et al.*, 2002; Yildirim *et al.*, 2003). Lipid peroxidation products such as lipid hydroperoxide and autoantibodies against oxidized modified low-density lipoprotein have been found to be increased in psoriatic plasma (Kural *et al.*, 2003). Low-density lipoprotein oxidation and disturbances of oxidant-antioxidant balance have been associated with an increased risk for atherosclerosis in psoriatic patients (Kural *et al.*, 2003). In addition, increased nitric oxide (NO) levels from serum and plasma have been reported for psoriatic patients as compared with normal individuals (Gokhale *et al.*, 2005; Zalewska *et al.*, 2007).

Oxidative stress in blood samples seems to be linked with neutrophils activation and with psoriasis worsening (Rocha-Pereira *et al.*, 2004b). Lactoferrin released by specific neutrophil granules promotes neutrophil-endothelial cell adhesion and, as a source of iron, the Fenton reaction, contributing to hydroxyl radical generation (Rocha-Pereira *et al.*, 2004b). There is a positive correlation between neutrophils count in psoriatic blood with lipid peroxidation levels in plasma which has been further correlated with lipid

peroxidation in erythrocyte membranes (Rocha-Pereira *et al.*, 2004a). Increase of erythrocyte lipid peroxidation correlates with decrease of membrane fluidity in these cells (Gornicki and Gutsze, 2001). Plasma and erythrocyte oxidative damage have been further connected with psoriasis aggravation (Rocha-Pereira *et al.*, 2004a).

### *Psoriatic Skin*

Skin proteins are vulnerable to oxidant damage. Consequently, protein carbonyl moieties are formed by both protein oxidative cleavage and amino acids direct oxidation. Levels of protein carbonylation in psoriatic fibroblasts and in biopsies of involved and uninvolved psoriatic skin are higher than in healthy controls (Table 23) (Dimon-Gadal *et al.*, 2000). In psoriatic skin, the activity of xanthine oxidase is higher (Kizaki *et al.*, 1977) and the action of cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) can also contribute to ROS production (Young *et al.*, 2008).

Antioxidant enzymes activities in psoriatic skin are often different as compared with psoriatic blood samples (Table 23). According to Therond *et al.*, CAT activity was slightly enhanced in psoriatic fibroblasts from involved and uninvolved psoriatic skin, but GPx activity of involved and normal fibroblasts was not significantly different (Therond *et al.*, 1996). However, in tissues homogenates from psoriatic skin, GPx activity was found to be lower compared with those from normal skin (Utas *et al.*, 2002). Staining of frozen sections from normal and psoriatic skin with monoclonal antibodies against human CuZn-SOD and Mn-SOD showed that in psoriatic epidermis, Mn-SOD levels were considerably decreased (Kobayashi *et al.*, 1991). In psoriatic tissue homogenates, SOD activity was also found to be lower as compared to those from normal skin (Utas *et al.*, 2002). However, significantly elevated CuZn-SOD activity in involved and uninvolved psoriatic skin and higher Mn-SOD activity in psoriatic fibroblasts have also been described (Therond *et al.*, 1996). MnSOD mRNA has also been reported to be markedly expressed in psoriatic skin lesions as compared with uninvolved psoriatic skin and normal controls (Lontz *et al.*, 1995). Under normal conditions, Mn-SOD overexpression represents a protective cellular response evoked by both ROS and cytokines released interleukin (IL)-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  from inflammatory cells (Lontz *et al.*, 1995). However, high or long-term SOD expression can also result in inappropriate production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in intra- and

extracellular compartments (Midorikawa and Kawanishi, 2001) contributing to inflammation and tissue damage at the site of psoriatic skin lesions (Trouba *et al.*, 2002).

In the context of psoriasis dermal vascular dilatation, NO role deserves special attention since it appears to be important for keratinocyte proliferation and angiogenesis (Ormerod *et al.*, 1998). Biopsies from involved and uninvolved psoriatic and normal skin were studied by immunochemistry in order to detect the presence of endothelial (eNOS), neuronal (nNOS) and inducible (iNOS) isoforms of nitric oxide synthase (Ormerod *et al.*, 1998). Endothelial nitric oxide synthase was not significantly expressed in psoriasis. However, iNOS was absent in normal skin but was significantly upregulated in involved psoriatic skin, mainly in keratinocytes and, to a lesser extent, in clinically uninvolved psoriatic skin [80]. Indeed, iNOS staining was greatest in the more severe lesions and correlated with the lymphoid infiltrate (CD3-positive cells) and also with keratinocyte proliferation. Measurement of NO production from the skin surface revealed a tenfold increase in the lesions of psoriatic patients compared with their uninvolved skin (Ormerod *et al.*, 1998). However, lack of significantly increased of NO production by involved psoriatic fibroblasts as compared with healthy ones has also been reported (Zalewska *et al.*, 2007).

Table 23 Antioxidants and oxidative markers in psoriasis

Markers	Erythrocyte	Serum	Plasma	Fibroblasts	Dermis	Skin biopsies	References
Iron					↑		(Leveque <i>et al.</i> , 2004)
Nitric oxide (NO <sup>*</sup> )		↑	↑	↓		↑	(Gokhale <i>et al.</i> , 2005) (Ormerod <i>et al.</i> , 1998) (Pujari V, 2010) (Zalewska <i>et al.</i> , 2007)
Malondialdehyde (MAD)	↑	↔	↑	↔		↑	(Kokcam and Naziroglu, 1999) (Drewa <i>et al.</i> , 2002) (Relhan <i>et al.</i> , 2002) (Yildirim <i>et al.</i> , 2003) (Utas <i>et al.</i> , 2002) (Baz <i>et al.</i> , 2003)
<b>PROTEIN</b>							



Carbonyl moieties					(Dimon-Gadal <i>et al.</i> , 2000)
<b>ANTIOXIDANT/OXIDANT ENZYME ACTIVITIES</b>					
Superoxide dismutase (SOD)	↔ ↓↑		↑	↑	↓↑
					(Karaman <i>et al.</i> , 2008) (Yildirim <i>et al.</i> , 2003) (Utas <i>et al.</i> , 2002) (Kural <i>et al.</i> , 2003) (Therond <i>et al.</i> , 1996) (Rocha-Pereira <i>et al.</i> , 2004a) (Drewa <i>et al.</i> , 2002) (Baz <i>et al.</i> , 2003) (Lontz <i>et al.</i> , 1995) (Gerbaud <i>et al.</i> , 2005)
Catalase (CAT)	↔ ↓	↑		↑	
					(Therond <i>et al.</i> , 1996) (Karaman <i>et al.</i> , 2008) (Rocha-Pereira <i>et al.</i> , 2004a) (Drewa <i>et al.</i> , 2002) (Yildirim <i>et al.</i> , 2003) (Kural <i>et al.</i> , 2003)
Glutathione peroxidase (GPx)	↑↓		↓	↑	↓
					(Therond <i>et al.</i> , 1996) (Karaman <i>et al.</i> , 2008) (Yildirim <i>et al.</i> , 2003) (Utas <i>et al.</i> , 2002) (Kokcam and Naziroglu, 1999) (Kural <i>et al.</i> , 2003)
Xanthine oxidase (XO)					↑
					(Kizaki <i>et al.</i> , 1977)
<b>LOW-MOLECULAR-WEIGHT ANTIOXIDANTS</b>					
Alpha-tocopherol	↓				
					(Rocha-Pereira <i>et al.</i> , 2004a)
Glutathione	↓		↓	↔	
					(Rocha-Pereira <i>et al.</i> , 2004a) (Kokcam and Naziroglu, 1999) (Therond <i>et al.</i> , 1996)
β-carotene		↓	↓		
					(Kokcam and Naziroglu, 1999) (Majewski <i>et al.</i> , 1989)

Ascorbic acid		↓	(Leveque <i>et al.</i> , 2004)
Selenium	↓	↓	(Rocha-Pereira <i>et al.</i> , 2004a) (Fairris <i>et al.</i> , 1989)

(↔) No differences observed when compared with normal samples.

## Immunology of psoriasis

The predominant role of immune cells in the pathogenesis of psoriasis is now well recognized (Bowcock and Krueger, 2005; Lowes *et al.*, 2007; Nestle *et al.*, 2009b; Sabat *et al.*, 2007). The importance of an abnormal T cells activity in psoriasis is illustrated through both genetic predisposition and the mechanisms of action for a number of treatments. A complex interplay between keratinocytes, on one hand, and the cells of the innate and adaptive immune system along with a vast network of cytokines, on the other hand, produce an activation loop which leads to T cell activation, chronic inflammation within the skin and eventually the formation of psoriatic plaques. Immune cells included in this process, and found within active psoriatic plaques, are T cells (both CD4 and CD8+), neutrophils, mast cells and dendritic cells (Lowes *et al.*, 2007). Each has its own role and importance and will be further discussed through this section.

### *T Cells*

T cells and the cytokines that they secrete are the cornerstone of the immunological theory in psoriasis. The large amount of scientific information published provides a good understanding for the cascade of events leading to their activity in psoriatic plaques, including their initial activation and their migration in the skin.

### *Th1/Th2/Th17 Balance*

For a long period of time, psoriasis was believed to be a Th1-driven disease (Lew *et al.*, 2004). Th1 secrete interferon (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , both of which have been found in high concentration within psoriatic plaques and are known to have an important repercussion on keratinocytes. Indeed, they promote the expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and human leukocyte antigen class II (HLA-DR) on keratinocytes surface

(Albanesi et al., 1998; Dustin et al., 1988; Giustizieri et al., 2001). ICAM-1 interacts and increases leukocyte adherence within the skin, whereas the expression of HLA-DR allows keratinocytes to present antigens to both CD4<sup>+</sup> in addition to CD8<sup>+</sup> T cells through MHC class I (Albanesi, et al., 1998; Dustin, et al., 1988; Giustizieri, et al., 2001). Thus, the Th1 pathway is important in the pathogenesis of the disease since it affects leukocytes recruitment and alters keratinocytes growth. However, recent investigations also demonstrated the importance of the Th17 pathway. Th17 are recently discovered CD4<sup>+</sup> T cells which have also been associated to other inflammatory diseases such as asthma and Crohn's disease (Bettelli *et al.*, 2007; Di Cesare *et al.*; Lowes *et al.*, 2008). Th17 cells produce IL-17, a cytokine promoting production of IL-6, IL-8, GM-CSF, and ICAM-1 by keratinocytes, synergizing with the IFN- $\gamma$  effect (Di Cesare *et al.*, 2009). Such molecules will attract even more leukocytes within the skin. Also, these cells produce IL-22, a cytokine known to delay keratinocyte differentiation (Nogralles *et al.*, 2008). This new information is very important since it points to specific mechanisms.

The deviation of naive T cells into Th2 instead of Th1 or Th17 has proven to be an effective way to treat the disease, demonstrating the importance of the Th1/Th2/Th17 balance and the underlying mechanisms controlling this differentiation process. Induction of the Th1 pathway relies on IL-12, whereas the Th17 pathway relies on IL-6 and IL-23. The US Food and Drug Administration recently approved ustekinumab in the treatment of plaque psoriasis. This human monoclonal antibody targets IL-12p40, the common subunit of IL-12 and IL-23, hence reducing differentiation into Th17 (Griffiths *et al.*, 2010; Nestle *et al.*, 2009b).

Even more recently, so-called Th22 were identified and linked to psoriasis (Eyerich *et al.*, 2009; Kagami *et al.*, 2010). This sub-set of Th cells were found to secrete a unique pattern of cytokines including IL-22 and TNF- $\alpha$ , similarly to Th17; while they do not secrete IFN- $\gamma$ , IL-4 or IL-17, as opposed to Th1, Th2 and Th17 (Eyerich *et al.*, 2009). IL-22 is known, as mentioned above, to affect keratinocytes by promoting proliferation and inhibiting differentiation (Eyerich *et al.*, 2009). Thus, IL-22 seems to amplify TNF- $\alpha$ 's effect in psoriatic plaques (Eyerich *et al.*, 2009).

Although very important, T cells activation is dependent of other cell types, such as dendritic cells. To understand the immunopathogenesis of psoriasis, the interaction of T cells with these other cell types is important because T cells are part of a complex pathological network.

#### *Natural Killer T Cells*

The role of natural killer T cells in psoriasis is not totally understood yet. This unique subpopulation of T cells expresses natural killer receptors (e.g., CD94 and CD161) and T cell receptors (e.g., CD4) on its surface, therefore combining proprieties of both lineages. They are considered to be an important part of the innate immunity, but they could also play an intermediary role between innate and adaptive immunity (Balato *et al.*, 2009). Natural killer T cells are another potential source of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in psoriasis and can secrete cytokines implicated in the Th1 and Th2 balance (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) (Peternel and Kastelan, 2009). Psoriatic keratinocytes express CD1d and can interact with CD161 of natural killer T cells (Gilhar *et al.*, 2002). This molecular interaction could be a critical event triggering the apparition of lesions in psoriasis, as CD1d is present in uninvolved skin of patients (Peternel and Kastelan, 2009). Also, the amount of CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> cells found in the skin is increased in psoriatic plaques and uninvolved skin as compared to normal subjects. Finally, various treatments were found to reduce the amount of CD94<sup>+</sup> and CD161<sup>+</sup> cells within the skin, including betamethasone dipropionate, calcipotriol and alefacept, suggesting an association between this decrease and clinical improvement (Bovenschen *et al.*, 2007; Vissers *et al.*, 2004).

#### *Dendritic Cells*

As mentioned earlier, a key event in T cells activation is the presentation of antigens on the major histocompatibility complex (MHC) class II by antigens presenting cells such as dendritic cells (Nestle *et al.*, 2009a; Nickoloff *et al.*, 2007a). Those cells also possess co-stimulatory molecules required by T cells to be activated. Such cells with the ability to present antigens and transmit co-stimulatory signals are known as professional antigens presenting cells and are fundamental in the activation loop of T cells. The most important

co-stimulatory signals occur between CD28-CD80/CD86 and between CD40-CD154 [107] and could therefore be of interest as potential pharmacological targets (Jariwala, 2007).

In physiological conditions, dendritic cells will process antigens and then migrate to the lymph node where they can interact directly with T cell. Afterward, T cells activated by this antigen will proliferate within the lymph node, enter the systemic blood circulation, reach the tissue where the antigen was originally found and then exit the blood vessels. Local increases in the concentration of specific chemokines will guide T cells through most of the process. It has been proposed that in chronic psoriatic plaques, T cells and dendritic cells can form a lymphoid-type tissue in which the cellular interaction could happen directly within the skin, without going through the process of migration to the node and back to the inflammation site (Chamian and Krueger, 2004; Jariwala, 2007; Lew *et al.*, 2004). Finally, dendritic cells secrete cytokines, such as IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 and IFN- $\gamma$ . Those cytokines promote Th1 and Th17 proliferation and are thus most likely involved in the Th1/Th2/Th17 balance (Lew *et al.*, 2004).

### *Neutrophils*

The role of neutrophils in psoriasis pathogenesis is not totally understood yet; its importance is therefore controversial. However, several facts suggest it could be essential in the early development of lesions (Terui *et al.*, 2000). For instance, a case report described rapid improvement of psoriasis lesions following an agranulocytosis induced by ticlopidine (Toichi *et al.*, 2000). This report is particularly interesting because neutrophils blood count correlated with a 24 hour delay, and symptoms reappeared in the days following blood count return to normal. The authors suggested a minimal number of neutrophils might be necessary in the early onset and the maintenance of psoriatic plaques (Toichi *et al.*, 2000). Cytokines produced by T cells in psoriatic lesions induce the expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) on the surface of keratinocytes (Rahmoun *et al.*, 2009). This protein is able to increase the lifespan of neutrophils and can therefore be responsible for the accumulation of neutrophils in the epidermis of psoriatic plaques, a histological hallmark known as microabscesses of Munro

(Rahmoun, et al., 2009). Also, the high concentration of IL-8 and GM-CSF found within psoriatic lesions can activate and increase neutrophils' lifespan within the skin. For their role in the pathogenesis of psoriasis, neutrophils seem to be effector cells dependent on T cell cytokines but, at the same time contribute to T cell activation through the expression of HLA-DR (Keller *et al.*, 2005; Schaerli *et al.*, 2004). This activation loop could play an important role in the acute phase of psoriasis plaque's formation (Terui *et al.*, 2000). Neutrophils themselves could be partly responsible for tissue damage through oxidative stress caused by the release of ROS.

Finally, a decrease in the activity of glutathione peroxidase in neutrophils isolated from psoriatic patients indicates it could also be, in part, responsible for the increased secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) by keratinocytes, since H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is known to induce VEGF secretion, and could thus indirectly promote angiogenesis (Seifert *et al.*, 2007).

#### *Mast cells*

Mast cells have long been known to play an essential role in allergic reaction through IgE binding. However, their role in other mechanisms of innate and adaptive immunity through the secretion of multiple soluble factors has only been discovered in the last decade (Harvima *et al.*, 2008). In psoriatic plaques, there is an accumulation of mast cells (Jiang *et al.*, 2001). It was demonstrated that interactions between mast cells and T cells result in the activation of different T cells subsets. This phenomenon could be important in the pathogenesis of psoriasis because of a preferential activation of the Th1/Th17 pathway rather than Th2 (Mekori and Metcalfe, 1999). Mast cells also express MHC class II allowing antigens presentation to CD4<sup>+</sup> T cells. They were also shown to express CD80 and CD86 on their membrane, two co-stimulatory signals necessary for T cells activation (Harvima *et al.*, 2008). Finally, mast cells can rapidly secrete large amounts of cytokines that will attract a wide variety of immune cells seen in psoriasis such as T cells and neutrophils (Harvima *et al.*, 2008).

### *Cytokines*

Throughout this section, a variety of cytokines and their respective roles toward specific immune cells were discussed. The vast pathological network of cytokines found in psoriasis links most cells in its complex pathogenesis (Kunz and Ibrahim, 2009).

Cytokines affect both the immune system activity while also interacting directly with skin cells such as keratinocytes to alter their proliferation, differentiation and their own secretion pattern (Nickoloff, 2007; Nickoloff *et al.*, 2007b; Tonel and Conrad, 2009). A Th1/Th17 pattern is observed, in which both downstream (e.g., increased in TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-17) and upstream products (e.g., increased in IL-12 and IL-23, decreased in IL-4 and IL-10) related to them are present in high concentrations within psoriatic plaques. Several chemokines, which attract leukocytes within the skin, are also found in high concentrations (e.g., MCP-1, RANTES, TARC, IL-8, IP-10) (Nickoloff *et al.*, 2007b).

### **Genetics of Psoriasis**

Psoriasis has long been known to have a strong inherited component; population studies demonstrated the increased incidence among relatives of psoriatic patients compared to the general population (Farber and Nall, 1974). Those findings demonstrated the importance of heredity and the highly probable existence of susceptibility genes. However psoriasis does not follow a simple monogenic mutation model. Major progress in the field of genetics in the past decades has allowed genome-wide mapping leading to several large scale studies made in an attempt to understand the complex role of genetics in the disease (Nestle *et al.*, 2009b). Those studies were able to identify several susceptibility loci and therefore gave new insight on the disease itself. Genes identified from those loci mostly encode for immune system proteins such as MHC or for proteins found in the skin. This further confirms the complexity surrounding the etiology of the disease and the potential duality in its origins.

### *PSORS1*

Of all susceptibility loci, the PSORS1 locus on 6p21 is by far the most important. It was identified in multiple large scale genomewide studies of a broad variety of populations (Elder, 2006; Elder, 2009; Fan *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2006; Nestle *et al.*, 2009b; Stuart *et al.*, 2010; Tomfohrde *et al.*, 1994). In contrast with other susceptibility loci for which contradictory results were often found in literature, PSORS1 is always identified as the most important. This can be explained by the much higher odds ratio conferred by this susceptibility locus compared to all others. This locus is therefore well established within the scientific community. It is estimated to account for 35 to 50% of the heritability of psoriasis (Fan *et al.*, 2008). Fine-mapping studies revealed a 300-kb region with at least 11 genes (including HLA-C, MICA, CDSN, HCR, PSORS1C3) (Fan *et al.*, 2008). Although several of these genes are biologically plausible candidates, many studies have identified HLA-Cw6 as the gene most likely responsible for the susceptibility in this region of the chromosome. This protein of the MHC I can trigger an immune response in psoriasis-like skin disorders, whereas only 55-60% of patients with psoriasis have this variant and about 10-15% of individuals without psoriasis carry it (Duffin and Krueger, 2009).

This could be explained either by the other PSORS discovered, or by the complexity of PSORS1 itself. The difficulty in identifying the susceptibility gene in this locus is due to the extensive linkage disequilibrium observed within the MHC and the number of biological plausible candidates. For instance, some studies pointed out CDSN as another possible but less likely candidate gene of PSORS1 (Fan *et al.*, 2008). This gene encodes for corneodesmosin, a protein responsible for the cohesion of keratinocytes in the epidermis. This clearly demonstrated once again the complexity of the disease itself and the possible duality surrounding the primary defect leading to psoriasis. It is also very interesting to note that this locus is strongly associated to early onset psoriasis and to guttate psoriasis, which also usually occurs at a younger age (Asumalahti *et al.*, 2003). On the other hand, late-onset of plaque psoriasis in patients over 50 years old does not seem to be associated with this locus (Allen *et al.*, 2005).

Those variations in susceptibility genes could eventually lead to a new classification or new types of psoriasis based on etiology instead of phenotype only. This is important because it could affect recommended treatment since it could be adapted more specifically to the



disease. This hypothetical situation in which genetic variants guide clinicians is known as pharmacogenomics, a growing discipline, which aims to personalize treatment based on genotypes instead of arbitrary recommendation.

#### *PSORS2*

Located at 17q25, contradictory results with this susceptibility locus have been published (Helms *et al.*, 2003; Huffmeier *et al.*, 2005; Morar *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006). Most studies concentrated on the gene RAPTOR and the Runt-related transcription factor (RUNX)1 binding site between genes NAT9 and SLC9A3R1. SLC9A3R1 has a putative role in the formation of immune synapse (Nestle *et al.*, 2009b). It is also found in epidermis within the granular layer of normal skin (Morar *et al.*, 2006). Therefore, SLC9A3R is a biologically plausible candidate that could once again affect the immune system and the skin directly. However, as mentioned above, contradictory results were obtained by single nucleotide polymorphism (SNP) mapping between NAT9 and SCL9A3R1 genes and altering a RUNX1 binding site (Helms *et al.*, 2003; Huffmeier *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 2006). This susceptibility locus was also associated with atopic dermatitis but a SNP mapping study suggested psoriasis-related genes were not responsible for the association of this locus with atopic dermatitis (Morar *et al.*, 2006).

#### *PSORS 4*

This susceptibility locus is particularly interesting because it is located within the region of the epidermal differentiation complex on chromosome 1q21 (Capon *et al.*, 2001). Genes in this complex encode for proteins involved in the terminal differentiation of keratinocytes, a process deeply affected in psoriasis. Those proteins, such as filaggrin and loricrin, are essential in the cornification process. This susceptibility locus is therefore unique because, as opposed to most others, it could cause a defect directly within the skin differentiation process without affecting the immune system. Treatment effectiveness might be affected and those patients might benefit from therapies that differ from the usual ones. Further research was able to identify that a deletion in genes of the late cornified envelope (LCE) 3B and 3C was responsible for this locus (de Cid *et al.*, 2009; Huffmeier *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Although the mechanistic role of LCE in psoriasis remains to

be understood, those proteins are important in the formation of the skin barrier and also its repair, two phenomena altered in psoriasis. Overlapping between atopic dermatitis and psoriasis was shown with the susceptibility locus in 1q21, however it has been demonstrated that the genes within this locus do not display the same levels of influence for those two pathologies (Bergboer *et al.*, 2010).

### *IL-12B*

Along with IL-23R, they are the non-MHC susceptibility genes with the strongest association to psoriasis. IL-12B encodes for interleukin-12 beta sub-unit p40, which is also a sub-unit of IL-23. Many genome-wide studies revealed this susceptibility locus located in 5q31 (Capon *et al.*, 2007; Cargill *et al.*, 2007; Elder *et al.*, 2010; Filer *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2008; Tsunemi *et al.*, 2002). Most studies reporting IL-12B as a susceptibility gene also found a strong association with IL-23R. This information is crucial since it identifies IL-23 and not IL-12 as an important cytokine in psoriasis. IL-23 promotes T cells differentiation into Th17, a pathological pathway recently discovered and now believed to be of importance in the pathogenesis of psoriasis (Di Cesare *et al.*, 2009). Ustekinumab, a recently approved biological treatment, is a human monoclonal anti-p40 antibody, which therefore aims to stop this preferential differentiation of T cells into Th17 (Nestle *et al.*, 2009b; Segal *et al.*, 2008). This proof of concept on the importance of IL-23 and the Th17 pathway also stresses the importance of genetic studies in psoriasis since it provides crucial information on core mechanisms behind the disease. Finally, this gene has also been associated with Crohn's disease, suggesting a possible common pathological pathway of inflammation shared in both pathologies (Capon *et al.*, 2007; Duerr *et al.*, 2006). An association with atopic dermatitis has also been published, suggesting this IL-23 pathway could link many auto-immune diseases (Tsunemi *et al.*, 2002).

### *IL-23R*

Located on chromosome 6p21, the identification of IL-23R as a risk factor of psoriasis supports the importance of the Th17 pathway mentioned above (Capon *et al.*, 2007; Cargill *et al.*, 2007; Elder *et al.*, 2010; Filer *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2009; Tsunemi *et al.*, 2002).

The concept of Th17 is relatively recent but its role in auto-immune disease is now well-established.

#### *IL-4 and IL-13*

The identification of the susceptibility locus on chromosome 5q31 in the cytokine gene cluster encoding for IL-4 and IL-13 also gave important information regarding the inflammatory pathway in psoriasis (Chang *et al.*, 2008; Duffin *et al.*, 2010; Elder *et al.*, 2010; Nair *et al.*, 2009). As mentioned earlier, T cell differentiation is very important in the pathogenesis of psoriasis. The complex balance between Th1-Th2-Th17 is regulated by many cytokines, including IL-4 and IL-13. Those cytokines promote T cells differentiation into Th2 and inhibit the differentiation of naïve T cells into Th1 and Th17 (Newcomb *et al.*, 2009). Low levels of both cytokines could therefore be responsible for an abnormal increase in Th1 and Th17 populations observed in psoriasis and other Th17 driven inflammatory disease. In fact, this gene cluster has also been associated with Crohn's disease however the variants are distinct for the two diseases (Li *et al.*, 2008).

#### *Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 22 (PTPN22)*

The PTPN22 gene encodes for the protein lymphoid tyrosine phosphatase, a molecule involved in T cell intracellular signaling (Vang *et al.*, 2007). This protein binds to CsK, a kinase that inhibits the Src family kinases. Therefore, PTPN22 exerts an inhibitory effect on T cells receptor signalization. Susceptibility with this gene has been demonstrated by various research groups, but the association with psoriasis is not as strong as with other autoimmune diseases (Huffmeier *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2008).

Indeed, polymorphism in PTPN22 has been clearly associated with many other autoimmune diseases, including Type 1 diabetes mellitus, juvenile idiopathic arthritis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and autoimmune thyroid disease (Nestle *et al.*, 2009b; Vang *et al.*, 2007). However, the R620W polymorphism usually associated with those diseases is not a risk factor for psoriasis (Smith *et al.*, 2008). It is hypothesized that the mechanism underlying this very general susceptibility to auto-immunity associated with this gene is caused by an alteration in the positive selection of T cells in the thymus.

### *ZNF313*

A 47 kb susceptibility locus located on chromosome 20q13 was discovered and associated to psoriasis (Capon *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2009). It was further demonstrated that the susceptibility gene was ZNF313 also known as RNF114. This protein is a member of RING domain E3 ubiquitin ligases (Capon *et al.*, 2008). Expressed by skin cells, T cells and dendritic cells, ZNF313 is a positive regulator of T cell activation. Protein ubiquitinylation regulates the immune response by modifying activity or promoting degradation of certain molecular signals and could therefore have an impact on T cells activation within psoriatic plaques (Liu *et al.*, 2005). Members of this family have already been associated to other auto-immune diseases (Vinuesa *et al.*, 2005).

### *CDKALI*

The biological function of this gene is unknown but the transcript was shown to be almost absent from skin keratinocytes and abundant in CD4<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocytes (Quaranta *et al.*, 2009). Therefore, it is difficult to discuss the significance of this susceptibility gene. However, it was shown to also give susceptibility to Crohn's disease (Li *et al.*, 2009; Quaranta *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2008). This gene is also associated with type II diabetes; however this association is independent of the susceptibility observed for psoriasis and Crohn's disease (Quaranta *et al.*, 2009). It is interesting to note that this gene and others mentioned above confer susceptibility to Crohn's disease, which could partially explain the increased incidence of psoriasis observed in patients suffering from this disease. Those common susceptibility genes are all related to T cells, which once again demonstrate the cornerstone role played by these cells in the pathogenesis of psoriasis.

### **Treatments of psoriasis**

Generally, psoriasis is not a fatal disease but the presence of physical and psychological pains can severely affect patients' quality of life (Mease and Menter, 2006). There is a wide variety of therapeutic options to treat psoriasis including topical, phototherapy, systemic and biological therapies (Table 24) (Fitzpatrick and Wolff, 2008). These treatments can

control or prevent symptoms; however there is still no cure available (Bagel, 2009; Fadzil *et al.*, 2009). Some treatments will be discussed in this section.

Table 24 Complete list of actual or future therapies for psoriasis

Topical	Phototherapy	Systemic	Biological
Corticosteroids	Broadband UVB	Methotrexate	Infliximab
Vitamin D analogues	Narrowband UVB	Acitretin	Etanercept
Tazarotene	Excimer Laser	Cyclosporine A	Adalimumab
Salicylic acid	Psoralen UVA	Fumaric acid esters	Efalizumab
Calcineurin inhibitors		Sulfasalazine	Alefacept
		Hydroxyurea	Ustekinumab
		Mycophenolate mofetil	Briakinumab

### Topical Treatments

Topical treatments are principally used to treat benign or moderate psoriasis. However, they can also be used to treat severe psoriasis if they are combined to systemic therapy (Bessis *et al.*, 2005; Camisa, 2004). Topical treatments can act on psoriasis in different ways: by reducing the local inflammation and/or the hyperproliferation of keratinocytes, by regulating the cell differentiation and finally, by re-establishing the integrity of the *stratum corneum* (Thielen and Laffitte, 2009).

#### *Corticosteroids*

In 1952, hydrocortisone acetate, the first topical glucocorticoid developed for the treatment of inflammatory diseases, appeared on the market (Del Rosso and Friedlander, 2005). Since then, many corticosteroids had been developed to treat psoriasis. Today, topical corticosteroids are grouped according to their potency (Raymond and Houle, 2007; Thielen and Laffitte, 2009). They are the most widely prescribed topical treatment to treat psoriasis (Kamili and Menter, 2009). Their efficacy can be attributed to multiple mechanisms of action, including their anti-inflammatory, immunosuppressive and antiproliferative effects (Norris, 2005). Corticosteroids bind to specific receptor proteins and this complex interacts with specific DNA sequences, the glucocorticoid response elements, to regulate the expression of corticosteroid-responsive genes. This leads to a myriad of effects, including altered cytokine expression and T cells inhibition (Kamili and Menter, 2009). Corticosteroids are also known to inhibit the transcription of pro-inflammatory cytokines genes involved in psoriasis such as the interleukins 1, 2 and 6 while they can stimulate the expression of anti-inflammatory cytokines genes such as interleukin 10 (Norris, 2005). Corticosteroids are quite effective to treat psoriasis. However, their combination with some substances can boost their potency (Bessis et al., 2005). For example, the combination of corticosteroids with salicylic acid, which possesses keratolytic properties, enhances penetration of the treatment (Lebwohl, 1999). The use of corticosteroids is safe, but the prolonged use is limited by tachyphylaxis and various side effects (Fitzpatrick and Wolff, 2008; Kamili and Menter, 2009).

#### *Vitamin D Analogues*

Many vitamin D analogues have been developed for the treatment of psoriasis. Calcipotriol and calcitriol are the only vitamin D analogues approved in the United States (Gold, 2009; Tanghetti, 2009); tacalcitolis is only available in Europe (Tanghetti, 2009). They are of interest in the treatment of psoriasis because they can regulate the hyperproliferation and the abnormal differentiation of psoriatic keratinocytes (Thielen and Laffitte, 2009). Vitamin D analogues bind the vitamin D receptor, which binds to vitamin D response elements. This interaction leads to the alteration in the transcription of vitamin D responsive genes, resulting in the inhibition of keratinocyte proliferation and the stimulation of keratinocyte differentiation. Topical calcitriol also decreases intercellular adhesion molecule ICAM-1

expression on keratinocytes and T cells infiltration (Kamili and Menter, 2009). Calcitriol is very efficient with minimal side effects, but the results are only apparent after a long period of use.

### *Tazarotene*

Tazarotene is an acetylate retinoid derived from the synthesis of vitamin A (Thielen and Laffitte, 2009), which is rapidly metabolized to its active metabolite: tazarotenic acid (Kamili and Menter, 2009). It is recognized for its role as a regulator of cell proliferation and differentiation via an interaction with the RAR- $\gamma$  receptor (Tremblay, 2002). Three genes seem to be affected by the tazarotenic acid, namely TIG1, TIG2 and TIG3. Tazarotene modulates the pathogenesis of psoriasis through three mechanisms: (1) reduction in keratinocyte proliferation, (2) normalization of keratinocyte differentiation and (3) a decrease in the expression of inflammatory mediators (Kamili and Menter, 2009; Norris, 2005). In an indirect way, tazarotenic acid seems to form a complex with the RAR- $\gamma$  receptor, which would reduce the quantity of AP-1, a protein present in hyperproliferative skin disorders such as psoriasis (Norris, 2005). However, this mechanism is not well-known. Tazarotene also regulates many markers of cell differentiation, which are overexpressed (transglutaminase, keratins 6 and 16 and involucrin) or underexpressed (keratin 10 and filaggrin) in psoriasis (Attar *et al.*, 2005). Because this treatment has an important inflammatory potential, it is more effective when it is combined with topical corticosteroids (Bessis *et al.*, 2005; Lebwohl *et al.*, 2005). Tazarotene is the only topical retinoid used to treat psoriasis (Bessis *et al.*, 2005; Camisa, 2004). Some local side effects can be observed after the treatment, such as cutaneous irritation, burning sensations, itch and erythema (Kamili and Menter, 2009). That could explain the lack of use of this treatment in inverse psoriasis.

### *Salicylic Acid*

The salicylic acid structure was first identified in 1838. It is the most ancient substance, which possesses a keratolytic effect (Lebwohl, 1999). Salicylic acid is generally combined with topical corticosteroids to enhance penetration (Kamili and Menter, 2009). This substance acts by increasing the permeability of the epidermis. Salicylic acid reduces the

cohesion of the *stratum corneum*, by dissolving intercellular lipids, and by reducing its pH thereby increasing the hydration of the skin (Kamili and Menter, 2009; Thielen and Laffitte, 2009). Salicylic acid used alone helps decrease the quantity of plaques. In psoriasis, this substance is usually prescribed in combination with other treatments such as corticosteroids. It allows to make them penetrate more quickly through the skin and to accelerate their action and their efficiency. Moreover, a study on the penetration of topical corticosteroids in the presence of salicylic acid showed that the active molecules had penetrated between two and three times more quickly (Lebwohl, 1999). However, because of the irritating character of salicylic acid, it is better to avoid its combination with vitamin D analogues (Bessis *et al.*, 2005). Although salicylic acid is considered a secure treatment, side effects can be observed. For example, there is a risk of toxicity if the application takes place on more than 20% of the body, with symptoms such as nausea and hyperventilation (Lemay, 2006; Thielen and Laffitte, 2009). It is also important to note that salicylic acid can degrade some corticosteroids and make them inactive (Lemay, 2006).

### *Tar*

For many years, tar preparations have been used in the treatment of psoriasis for their antipsoriatic effects (Paghdal and Schwartz, 2009). Tar is normally used in the form of shampoos and bath oils. However, the unpleasant smell makes it an unpopular treatment (Tremblay, 2002). The mechanism is not completely characterized, but it includes antiproliferative, antipruritic, and antibacterial effects (Kamili and Menter, 2009; Nicolas and Thivolet, 1997).

### **Phototherapy**

There are two types of phototherapy: the phototherapy UVB (broadband, narrowband and excimer laser) and the PUVA-therapy (oral or local). Mechanisms of action of both UVA and UVB phototherapy differed, but they achieve similar efficacy (Grundmann-Kollmann *et al.*, 2004). The main effects of UV irradiation on keratinocytes are the induction of apoptosis, inhibition of antigen presentation and the expression of immunosuppressive cytokines (Grundmann and Beissert, 2009). Phototherapy is often used when psoriasis can not be controlled by topical treatments (Nguyen *et al.*, 2009).



### *Phototherapy UVB*

In broadband-UVB phototherapy, the skin is exposed to ultraviolet light from 290 to 320 nm (Lee and Kalb, 2008). Narrowband-UVB emits distinct narrow band of high-intensity light from 311 to 313 nm. Narrowband-UVB shows a superior efficacy, compared to broadband-UVB, with fewer side effects. This helps eliminate high-energy shorter wavelengths responsible for burning, premature aging and increased incidence of skin cancer (Nguyen *et al.*, 2009). Because of its efficacy and its short-term tolerance, it tends to replace conventional phototherapy (Bessis *et al.*, 2005). The principle of UVB phototherapy is based on the use of solar-type radiation to induce DNA damage and inactivate various proteins, resulting in antimitotic, anti-inflammatory and immunosuppressive effects. After a UVB phototherapy treatment, there is a reduction of IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF levels in psoriatic patients (Ghoreschi *et al.*, 2003).

### *Excimer Laser*

The 308 nm excimer laser has documented clinical results that appear superior to broadband- and narrowband-UVB phototherapy with low accumulation of UVB doses (Zakarian *et al.*, 2007). However, laser treatment can only be used on small areas, because of the localized action of the laser itself. The exact mechanism of action is not completely known. However, it is suggested that the excimer laser penetrates the epidermis and the dermis to cause T cell apoptosis whereas traditional UVB appears to induce T cell apoptosis only in the epidermis (Zakarian, *et al.*, 2007). Laser therapy may be useful for the treatment of more resistant psoriatic lesions (Bessis *et al.*, 2005). Furthermore, side effects that include erythema, burns and hyperpigmentation are limited to localized areas in contrast to larger areas seen with full-body treatments using traditional phototherapy (Nguyen *et al.*, 2009).

### *Phototherapy UVA*

PUVA-therapy consists of using a photosensitizing medication taken orally or absorbed topically in combination with UVA phototherapy (320-400 nm) (Nguyen *et al.*, 2009). The administration of psoralen by oral route, before the irradiation, allows the absorption of

UVA radiations and the appearance of an antipsoriatic effect (Grundmann-Kollmann, et al., 2004; Nicolas and Thivolet, 1997). Once the psoralen is activated by light, it binds to DNA, prevents the replication of keratinocytes, and leads to the apoptosis of T cells in the skin (Dubertret, 2004). Due to its cumulative toxicity, the PUVA-therapy is used as a first-line treatment in combination with other treatments such as tazarotene and acitretin (Tremblay, 2002). Numerous side effects can be noted including nausea, vomiting, itching and cancer (Lemay, 2006) but remission can be observed in 80% of cases (Dubertret, 2004). To encounter the unwanted effects caused by the oral administration, baths of psoralen, consisting of immersing parts of the body in a bath containing psoralen and exposing the patient to UVA, can be used (Deng *et al.*, 2004). Nevertheless, the PUVA-therapy tends to be replaced by the phototherapy UVB because of its numerous severe side effects (Bessis *et al.*, 2005; Nicolas and Thivolet, 1997).

## **Systemic treatments**

### *Methotrexate*

Methotrexate has been used to treat psoriasis for more than 40 years (Dubertret, 2009). At the beginning, studies suggested that methotrexate acted directly against the keratinocyte hyperproliferation (Heenen et al., 1998), however, the ineffectiveness of locally administrated methotrexate as well as the effectiveness of immunosuppressive therapy strongly suggest that the anti-proliferative effect of this treatment was not responsible of the anti-psoriatic effect (Johnston et al., 2005). In 2005, Johnston *et al.* reported that effectiveness of methotrexate in psoriasis was due to anti-inflammatory mechanisms (suppression of T cells activation and T cells adhesion molecules expression mediated by adenosine or polyglutamated methotrexate) rather than apoptosis. Furthermore, methotrexate is also known to be a competitive inhibitor of the dihydrofolate reductase enzyme, which is essential for the DNA synthesis, thus leading to a decreased cell proliferation in psoriatic keratinocytes (Lee and Kalb, 2008). Although methotrexate treatment is efficient, many severe side effects can be observed such as hepatic toxicity, pneumonia and teratogenicity (Camisa, 2004).

### *Retinoids*

Retinoids are derived from vitamin A and are widely used for the treatment of skin disease. Acitretin, is an oral aromatic retinoid approved for the treatment of psoriasis (Carlin *et al.*, 2003). It acts as an anti-proliferative and anti-inflammatory agent on psoriatic keratinocytes (Dubertret, 2009). Although the complete mechanism is still unknown, it has been demonstrated that acitretin acts by activating the three retinoic acid receptors which bind to nuclear response elements in genes controlling cell proliferation and differentiation, anti-inflammation, anti-keratinization and inhibition of neutrophil chemotaxis (Pang *et al.*, 2008). In this case, the use of combination therapy, rather than monotherapy, can be beneficial in increasing efficacy while reducing toxicity (Nicolas and Thivolet, 1997). Acitretin is not well tolerated in high doses and several side effects such as hepatic toxicity, teratogenicity and hyperlipidemia can be observed (Lee and Kalb, 2008).

### *Cyclosporine*

Cyclosporine is an anti-inflammatory agent which allows the disappearance of psoriatic plaques (Ghoreschi *et al.*, 2003). Its mechanism of action implies the inhibition of calcineurin phosphatase, which prevents the transcription of genes involved in T lymphocyte activation and those regulating cytokines such as IL-2 and IL-4 (Ghoreschi *et al.*, 2003; Lee and Kalb, 2008). Furthermore, cyclosporine also blocks proliferating keratinocytes in their G1 phase (Karashima *et al.*, 1996). The important side effects associated with a cyclosporine treatment (renal toxicity and high blood pressure) restrict its use over a prolonged period of time (Dubertret, 2009; Lee and Kalb, 2008). Effectively, cyclosporine is rather used as first-line treatment to remove plaques and is then replaced by a maintenance treatment with fewer side effects (Dubertret, 2009).

### **Biological treatments**

Biological therapies provide immunologically directed intervention when systemic treatments fail (Weinberg, 2003). Biological agents are defined as fusion (or recombinant) proteins or monoclonal antibodies that possess pharmacological activity (Singri *et al.*, 2002). They can act by (1) reducing pathogenic T cells, (2) inhibiting T cell activation, (3) leading to an immune deviation or (4) blocking the activity of inflammatory cytokines involved in psoriasis (Weinberg, 2003).

### *Infliximab*

Infliximab is an anti-TNF- $\alpha$  monoclonal IgG1 antibody (Tzu et al., 2008) which acts in psoriasis by blocking TNF- $\alpha$  and by inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, the infiltration of inflammatory cells and the proliferation of keratinocytes (Weinberg, 2003). Infliximab is associated with rapid and significant improvement of psoriatic lesions, but also with severe potential adverse effects. For example, infliximab treatment can cause anaphylactic shocks, cardiac insufficiencies, fungal infections and neurological problems (Kormeili *et al.*, 2004; Lemay, 2006).

### *Etanercept*

Etanercept is a TNF-receptor fusion protein produced by the fusion of two TNF receptors and the Fc fragment of human immunoglobulin (IgG1) (Thielen and Marazza, 2008). Etanercept binds to TNF- $\alpha$  with a greater affinity than natural monomeric receptors (Weinberg, 2003). TNF- $\alpha$  which is bound by etanercept is biologically inactive, resulting in reduced inflammation (Thielen and Marazza, 2008). Etanercept has fewer side effects than other anti-TNF- $\alpha$  agents (Altomare *et al.*, 2008). Among these side effects: flu-like symptoms and cardiac insufficiency (Lemay, 2006).

### *Adalimumab*

Adalimumab, another TNF- $\alpha$  blocker, is a completely humanized monoclonal IgG1 antibody against TNF- $\alpha$ . Similar to infliximab, adalimumab binds strongly to soluble and transmembrane TNF- $\alpha$ , thereby preventing them from binding with their receptors. Adalimumab brings many side effects such as reactions to the injection site, increased risk of contracting a severe infection, immunosuppression of the bone marrow and increased incidence of tumors (Papoutsaki *et al.*, 2008).

### *Efalizumab*

Efalizumab is a recombinant humanized IgG1 monoclonal that binds and blocks CD11a (Thielen and Marazza, 2008). This molecule, as well as CD18, is a subunit of the lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) which is an important surface molecule

for T cells activation, their migration inside the skin and their cytotoxic function. The binding of efalizumab to CD11a blocks the interaction between LFA-1 and ICAM-1 (Papp, 2008). In June 2009, after the appearance of severe bacteriological, viral and fungal infections of some patients, Genentech decided to remove its product from the market.

### *Alefacept*

Alefacept is a human fusion protein that consist of the extracellular CD2-binding portion of the human leukocyte functioning antigen 3 (LFA-3) linked to the Fc (hinge, CH2 and CH3 domains) fragment of human IgG1. It selectively blocks the LFA-3:CD2 costimulatory pathway, which is important in the reactivation of memory effector T cells. (Heffernan and Leonardi, 2010). Alefacept also binds to CD2 on memory-effector T cells and prevents the generation of signal 2 (Lev-Tov and Hadi, 2006; Tzu *et al.*, 2008). This connection triggers apoptosis in lymphocytes T of type CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> which are highly expressed in psoriatic plaques (Papp, 2009; Weinberg, 2003). The side effects can include flu-like symptoms, reactions to the site of injection, tumors and infections (Fitzpatrick and Wolff, 2008).

### *Ustekinumab and briakinumab*

New biological treatments recently appeared on the market: ustekinumab and briakinumab (ABT-874). Comprehension of the mechanisms of action is still incomplete, but it is known that the antibody decreased the biological activity of interleukins 12 and 13 and reduced the inflammation (Lima *et al.*, 2009).

Ustekinumab was approved in Europe and in Canada in 2008, but not in the United States. Briakinumab is still undergoing Phase III trials, but preliminary results are interesting (Lima *et al.*, 2009). The main side effects are the presence of reactions to the site of injection and an increased incidence for some infections (Lima *et al.*, 2009; Tzu *et al.*, 2008)

## **Pathological models of psoriasis**

For the past decade, many pathological models have been developed to have a better understanding of psoriasis and to find out its exact cause (Gudjonsson *et al.*, 2007; Tjabringa *et al.*, 2008). The development of these models represents a key component for the fight against psoriasis. Applying research upon further development of these models represents key artillery for the battle against psoriasis disease.

### **In vivo models**

#### *Spontaneous Mutations*

Psoriasis is a typical human skin disease. Instead, literature shows many cases of spontaneous mutations demonstrating psoriasis-like phenotype in mice (Sundberg *et al.*, 1990). Some of which were studied for their psoriasis-like characteristics, such as skin thickening and plaques formation (Mizutani *et al.*, 2003). However, the resulting rodent mutants do not mimic the human disease closely enough to be considered good models of psoriasis. These mutants must rather be used to compare local pathogenic events such as hyperkeratosis (Mizutani *et al.*, 2003; Schon, 2008; Zheng *et al.*, 1999). Among hundreds of listed mutations, three models were preferred. First, the *asebia* mouse mutation ( $Scd1^{ab}/Scd1^{ab}$ ) characterized by an acanthosis, increased dermal vascularization, and dermal infiltrate comprising macrophages and mast cells, although neither T cells nor neutrophils were reported to be found (Schon, 2008; Zheng *et al.*, 1999). This model is poorly representative of the human pathology in a way that it possesses no other characteristic of the disease, besides showing alterations of the cutaneous lipid metabolism, which seem to be different from what is usually observed on actual human psoriatic skin. The two other models are the spontaneous chronic proliferative dermatitis and the flaky skin mice ( $Ttc^{fsn}/Ttc^{fsn}$ ). They show characteristics found in psoriasis such as hyperproliferative skin, infiltration of inflammatory cells in the skin, and dilation of blood vessels in the dermis. However, the absence of reaction after an immunosuppressive therapy suggests that these models are still incomplete; therefore, it appears uncertain to use such animal models for testing of potentially new therapeutic compounds (Jean and Pouliot, 2010; Schon, 1999).

#### *Xenotransplantation*

Xenotransplantation consists of transplanting on a genetically modified mouse a piece of psoriatic skin coming from a patient or, alternatively, a skin equivalent produced in laboratory. Many models based on immunodeficient mice have been developed in laboratories to study psoriasis disease. Among these models we indicate the use of athymic nude mice (Fraki *et al.*, 1983; Krueger *et al.*, 1981), severe combined immunodeficient mice (SCID) (Raychaudhuri *et al.*, 2001) and the spontaneous AGR129 model (Boyman *et al.*, 2004).

The main difference between each model is the immunological potential of the immune system. Indeed, athymic nude mice have no thymus and therefore no T cells (Raychaudhuri, *et al.*, 2001), while the severe combined immunodeficient mouse model lacks both T and B cells, yet displays functional neutrophil and mature natural killer (NK) cells with normal activity (Gudjonsson *et al.*, 2007). Finally, the AGR129 mice also lack both T and B cells but, unlike of the severe combined immunodeficient mice, they still have immature NK cells which are less cytotoxic than mature NK cells (Boyman *et al.*, 2004).

A weaker immune system is potent to dwell skin transplants for a longer time on a compromised mouse upon rejection. Thus, the amount of transplant rejection is reduced in the AGR129 model compared to the others. Boyman *et al.* demonstrated that human uninvolved psoriatic skin grafted onto AGR129 mice spontaneously developed psoriatic plaques without the injection of any activated immune cells or any other exogenous factor. In fact, skin grafts developed a psoriatic phenotype in 28 out of 31 (90%) grafted mice (Gudjonsson *et al.*, 2007). These results suggest that uninvolved psoriatic skin is not exactly comparable to normal skin from a healthy patient (Jean and Pouliot, 2010).

#### *Genetically Engineered Models*

The development of transgenic and knockout models for rats and for mice was an important step forward in the field of *in vivo* models. These genetically modified animals allow the overexpression or underexpression of a particular cytokine or enzyme creating rodents with psoriasis-like characteristics (Bullard *et al.*, 1996; Danilenko, 2008; Keith *et al.*, 2005). Currently, transgenic animal models only allow to study a single gene at a time. Since psoriasis is a multifactorial disease, models involving transgenic rodents are thus

incomplete and do not allow the complete understanding of all of the histological and physiological characteristics of psoriasis. Genetically engineered mice represent the largest category of *in vivo* psoriasis models. The complete list of these *in vivo* models of psoriasis is presented in Table 25.

Table 25 Genetically engineered *in vivo* models of psoriasis. Modified from Jean *et al.*, 2010

Model	Epidermal thickness	Abnormal differentiation	Increased vascularization	Epidermal T cell infiltration	References
<b>Targeting the immune system</b>					
HLA-B27/ $\beta$ 2 microglobulin rat	+	+	+	+	(Breban et al., 1996) (Keith et al., 2005)
Hypomorphic CD18	+	+	+	+	(Bullard, et al., 1996) (Kess et al., 2003)
$\alpha$ E (CD103)	+	+	?	+	(Schon et al., 2000)
K14/p40	+	?	?	+	(Kopp et al., 2001)
<b>Targeting vascular endothelium</b>					
pTek- <i>tTA</i> /Tie2	+	+	+	+	(Voskas et al., 2005)
K14/VEGF	+	+	+	+	(Xia et al., 2003)
<b>Targeting epidermal proteins</b>					
K5/Stat3C	+	+	+	+	(Sano et al., 2005)
IKK2	+	+	?	-	(Pasparakis et al., 2002)
c-Jun/JunB	+	+	+	+	(Zenz et al., 2005)
K14/KGF	+	+	+	-	(Guo et al., 1993)
K14/TGF- $\alpha$	+	+	?	Some animals	(Vassar and Fuchs, 1991)
K14/IL-20	+	+	-	-	(Blumberg et al., 2001)
K14/amphiregulin	+	+	+	+	(Cook et al., 1997)
K14/IL-1 $\alpha$	+	+	-	?	(Groves et al., 1995)



K14/IL-6	+	-	-	-	(Turksen et al., 1992)
K10/BMP-6	+	+	+	+	(Blessing et al., 1996)
Involucrin/integrins	+	+	+	+	(Carroll et al., 1995)
Involucrin/MEK1	+	+	?	+	(Hobbs et al., 2004)
Involucrin/amphiregulin	+	+	+	+	(Cook et al., 2004)
Involucrin/IFN- $\gamma$	+	+	+	-	(Carroll et al., 1997)
Chymotryptic enzyme	+	+	?	+	(Hansson et al., 2002)

### **In vitro models**

*In vitro* models offer an interesting alternative to animal models. Although inflammatory cells can be introduced in many *in vitro* skin models, they generally lack this element. Since inflammatory cells have been described to play a role in the pathogenesis of psoriasis (Bowcock, 2005; Krueger and Bowcock, 2005; Lowes *et al.*, 2007; Schon and Boehncke, 2005), the pertinence of these models has been questioned. However, recent studies using animal models, including the IKK2 (Pasparakis *et al.*, 2002) and c-Jun/JunB transgenic mice (Zenz *et al.*, 2005) are challenging the immunological theory of psoriasis (Jean and Pouliot, 2010).

#### *Monolayer*

The use of monolayer models has many advantages. First, the harvesting of a small biopsy of pathological skin (6 mm) allows the obtainment of a sufficient number of cells to conduct hundreds of experiments. Second, the monolayer offers the advantage of isolating each different cell type to better understand their specific roles and to dissect step by step the pathological mechanisms. On the other hand, because of the absence of interaction between dermis and epidermis or the frequent absence of inflammatory cells, these models are often considered as “incomplete”. However, regardless of those limitations, studies using monolayer models have brought important advances in the current understanding of psoriasis (Jean and Pouliot, 2010).

#### *Collagen Gel*

### **Organ culture**

A way to rapidly obtain a three dimensional model of psoriasis refers to the organ culture techniques, which consists of putting a small biopsy of pathological skin on a collagen gel equivalent (Saiag *et al.*, 1985). In this model, cell proliferation can be estimated by measuring the total surface area covered by the keratinocytes over a precise period of time. In 1985, Saiag *et al.* showed that higher keratinocyte proliferation rates were observed in the presence of psoriatic fibroblasts compared to keratinocytes cultured with normal fibroblasts (Saiag *et al.*, 1985). They also demonstrated that normal fibroblasts are unable to suppress the hyperproliferation of psoriatic keratinocytes (Jean and Pouliot, 2010; Saiag *et al.*, 1985).

### **Models using many cellular types**

In order to obtain a more suitable model for studies about interactions between fibroblasts and keratinocytes, models using many cell types have been developed. In these models, fibroblasts, extracted from a normal or a psoriatic biopsy, are embedded in a collagen gel to form a dermis whereas keratinocytes are seeded on the top of this dermal equivalent to generate the epidermis. In 1996, Konstantinova *et al.* developed a psoriatic skin model on a collagen gel, which highlighted many characteristics of psoriasis (Konstantinova *et al.*, 1996). Their work yielded a number of interesting observations, such as the occurrence of a higher concentration rate in the secretion of IL-8 from uninvolved and involved psoriatic fibroblasts compared to normal fibroblasts (Konstantinova *et al.*, 1996). In 2004, Barker *et al.* developed another psoriatic model on collagen gel. Their model maintained many characteristics of *in vivo* psoriatic skin such as hyperproliferation, overexpression of chemokine receptor CXCR2, pro-inflammatory genes (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and IL-8) and increased levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 (Barker *et al.*, 2004). Like IKK2 (Pasparakis *et al.*, 2002) and c-Jun/JunB transgenic mice models (Zenz *et al.*, 2005), this model suggested that, even in the absence of T cells, pathological individuals possess an inherent predisposition of developing psoriasis characteristics (Barker *et al.*, 2004). The Konstantinova and Barker models are produced with different cell types, which allow different kinds of observation of interactions between dermal and epidermal cells; however, the presence of exogenous material still remains. Even if collagen gel can be quite useful for rapid production of three-dimensional models (Bell *et al.*, 1981a; Bell *et al.*, 1981b;

Bell *et al.*, 1979), the presence of an exogenous scaffold can be disadvantageous for mechanical studies of the extracellular matrix as well as for surface area studies which could be reduced by retraction following collagen contraction of dermal substitutes (Auger *et al.*, 1998; Germain and Auger, 1995; Jean and Pouliot, 2010).

### *Self-Assembly Model*

The self-assembly method allows the observation of interactions between fibroblasts and keratinocytes without any exogenous scaffold. Within this method, normal or pathological fibroblasts are cultured over a period of 28 days with ascorbic acid. Meanwhile, fibroblasts proliferate and secrete their own extracellular matrix to form dermal sheets in the flasks. After the 28 days period, two manipulatable sheets are superimposed and incubated for 7 days to generate the dermal component. One week later, keratinocytes are seeded on top of the dermis to form a new epidermis. After another 7 days of culture, the substitutes are lifted to the air–liquid interface to facilitate epidermal cell differentiation (Figure 47) (Michel *et al.*, 1999; Pouliot *et al.*, 2002).

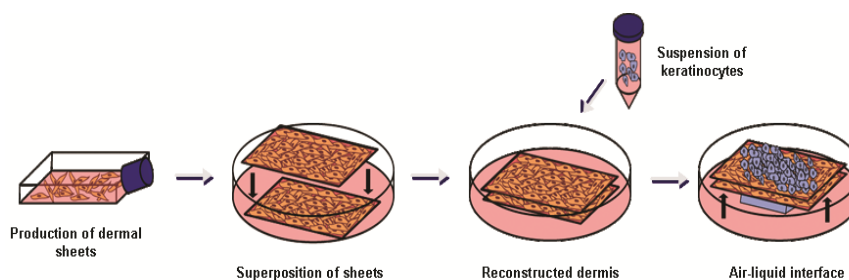


Figure 47 Self-assembly method. Modified from Jean *et al.*, 2010

In 2009, Jean *et al.* demonstrated that this model keeps many characteristics observed in psoriatic skins *in vitro* such as thickening of epidermis, the absence of a granular layer, hyperproliferation and abnormal differentiation of keratinocytes (Jean *et al.*, 2009). Furthermore, Bernard *et al.* demonstrated a disorganization of SC lipids such as those observed in psoriatic skin *in vivo* (Bernard *et al.*, 2007). These results suggest that the self-assembly method allows the production of *in vitro* psoriatic skin models which maintains a large number of psoriatic characteristics without any exogenous material or even T cells.

### **Advances of concepts on the pathogenesis of psoriasis**

The progress of concepts on the pathogenesis of psoriasis has been linked to the translation of clinical observations to basic scientific investigation. At the same time, the pathogenesis of this disease has been studied in laboratory models and subsequently translated to clinical experience in humans (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). Given the absence of an accepted model to study psoriasis; many rounds of bidirectional translation (from clinical experience to laboratory investigation and *vice versa*) have taken place in order to better define its pathogenesis and find new treatments (Guttman-Yassky and Krueger, 2007).

Many hypotheses have been proposed to explain the pathogenesis of psoriasis, such as an abnormal function of keratinocytes, dermal fibroblasts, vascular growth and immune cells (Braverman and Fonferko, 1982; de Mare *et al.*, 1990; Mansbridge and Knapp, 1984). In 1925, Goeckerman introduced phototherapy in combination with crude coal tar for psoriasis treatment (Honigsmann, 2001). Interestingly, this highly effective therapy for psoriasis was developed without any understanding of its pharmacological mechanism (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). In 1951, Gubner described a series of psoriatic patients who were treated with aminopterin, a therapeutic approach based on the property of this agent to target hypermetabolic epithelial tissues like psoriatic epidermis (Gubner, 1951). Subsequently, methotrexate, an inhibitor of the enzyme dihydrofolate reductase and related to aminopterin, was used as an antagonist of keratinocyte hyperplasia with the idea it would target the proliferation of involved psoriatic keratinocytes (Stewart *et al.*, 1972). The successful therapeutic use of methotrexate inspired a flurry of clinical and laboratory research on aberrant psoriatic keratinocyte growth and differentiation (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). Thus, rapid cell cycling and maturation of psoriatic keratinocytes as compared with normal keratinocytes were established as hallmarks of this skin disease (Weinstein *et al.*, 1984). In addition, the aberrant differentiation in psoriasis was described to be similar to regenerative maturation in skin wounds (Mansbridge and Knapp, 1987). In 1982, Braverman and Sibley demonstrated that vascular proliferation was associated to epidermal hyperplasia in psoriasis (Braverman and Sibley, 1982).

In 1983, Bos and colleagues applied monoclonal antibodies to the detection of leukocyte subsets in psoriatic lesions (Bos *et al.*, 1983). Thus, they were the first to propose a

potential role of the cellular immune system in the pathogenesis of psoriasis (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). T cell differentiation was later found to be strongly polarized towards the type 1 pathway, with production of the cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (Krueger, 2002). During the 1980's, two hypotheses were proposed for psoriasis pathogenesis, one related to keratinocyte activation as a primary defect and another to the primary role of cellular immunity (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). As activated keratinocytes were shown to produce many immune-activating cytokines (Nickoloff *et al.*, 1988), the cellular immune infiltration/activation was explained from the keratinocytes defect. However, a strong argument for psoriasis as a T cell-mediated autoimmune disease came from the treatment with cyclosporine, since it caused a significant improvement in the appearance of psoriatic lesions (Baker *et al.*, 1987). The T cell hypothesis for psoriasis pathogenesis was further supported by two approaches: in one, uninvolved psoriatic skin was grafted to SCID mice and shown to maintain a normal appearance. Further injection of activated mononuclear leucocytes into the grafts caused conversion to active psoriatic plaques (Wrone-Smith and Nickoloff, 1996). Secondly, therapy with targeted immune antagonists such as a fusion protein with specific cellular toxicity to cells expressing functional IL-2 receptors confirmed the direct link between T lymphocytes and psoriasis. Thus, patients treated with deneleukin difitox, which did not specifically affect keratinocytes, exhibited clinical resolution of psoriasis with histological reversal of epidermal hyperplasia (Gottlieb *et al.*, 1995). The utilization of the CTLA4-Ig fusion protein reduced the infiltration of activated T cells and dendritic cells (DCs) in psoriatic plaques, thereby resulting in clinical and pathological disease reversal in psoriatic patients (Abrams *et al.*, 2000; Abrams *et al.*, 1999). The reduction of DCs infiltration following this treatment was very important since it conferred an important role for proteins expressed on activated DCs as potential targets in psoriasis (Krueger, 2002).

The logical extension of immune targeting of psoriasis led to the development of new biological therapies (Guttman-Yassky and Krueger, 2007). Biological agents target specific molecules implied in psoriasis pathogenesis. So far, these fall into two main groups, targeting either specific inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$  or T cells (Lowe *et al.*, 2007). The response of psoriasis to TNF- $\alpha$  inhibitors, suggested that this cytokine had a key role in psoriasis pathogenesis. TNF- $\alpha$  has complex interactions to support inflammation

as well as regulate T cells and DCs interactions in the skin (Gottlieb, 2005). In addition, TNF- $\alpha$  shows effects on tissue remodeling, cell motility, cell cycle, and apoptosis (Gottlieb *et al.*, 2003a; Gugasyan *et al.*, 2004). Although biological treatments targeting TNF- $\alpha$  cytokine are highly effective in psoriasis, the elimination of TNF<sup>+</sup> leucocytes could suppress normal immune reactions that are not strictly TNF-dependent, thereby affecting protective immune responses during a lifetime of the treatment (Lowes *et al.*, 2007).

Overall, rapid advances in our understanding of psoriasis have occurred over recent years, thereby changing the concepts of psoriasis pathogenesis. Thus, psoriasis is now viewed as a process driven by an orchestrated interplay between activated T cells, antigen-presenting cells, and keratinocytes (Krueger, 2002; Lowes *et al.*, 2007), which leads to the release of numerous cytokines and chemokines that signal keratinocytes to hyperproliferate and undergo abnormal differentiation (Gottlieb *et al.*, 2003b).

## **Conclusion**

The prevalence of psoriasis in the world is not negligible and even if psoriasis is generally not a fatal disease, the consequences of this pathology, on patients' quality of life are important. The development of new treatments has reduced many of the symptoms, allowing to control psoriasis and to ameliorate the quality of life of psoriatic patients; however, there is still no cure for this disease. The apparition of pathological skin models has facilitated the evolution of concepts, resulting in a better comprehension of this complex skin disease and in the development of more specific treatments with fewer side effects.

**Acknowledgements**

The authors gratefully thank Dr Dan Lacroix and Jean-François Côté for the revision of the book.

## References

- Abrams, J. R., Kelley, S. L., Hayes, E., Kikuchi, T., Brown, M. J., Kang, S., et al. (2000). Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med*, **192**, 681-94.
- Abrams, J. R., Lebwohl, M. G., Guzzo, C. A., Jegasothy, B. V., Goldfarb, M. T., Goffe, B. et al. (1999). CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest*, **103**, 1243-52.
- Albanesi, C., Cavani, A., and Girolomoni, G. (1998). Interferon-gamma-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *J Invest Dermatol* **110**, 138-42.
- Allen, M. H., Ameen, H., Veal, C., Evans, J., Ramrakha-Jones, V. S., Marsland, A. M., Burden, A. D., Griffiths, C. E., Trembath, R. C., and Barker, J. N. (2005). The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol*, **124**, 103-6.
- Altomare, G., Ayala, F., Berardesca, E., Chimenti, S., Giannetti, A., Girolomoni, G., Lotti, T., Martini, P., Peserico, A., Guerra, A. P., and Vena, G. A. (2008). Etanercept provides a more physiological approach in the treatment of psoriasis. *Dermatol Ther*, **21 Suppl 2**, S1-14.
- American Academy of Dermatology. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Am Acad Dermatol*, **58**, 826-50.
- Asumalahti, K., Ameen, M., Suomela, S., Hagforsen, E., Michaelsson, G., Evans, J., et al. (2003). Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol*, **120**, 627-32.
- Attar, M., Yu, D., Ni, J., Yu, Z., Ling, K. H., and Tang-Liu, D. D. (2005). Disposition and biotransformation of the acetylenic retinoid tazarotene in humans. *J Pharm Sci* **94**, 2246-55.
- Auger, F. A., Rouabhia, M., Goulet, F., Berthod, F., Moulin, V., and Germain, L. (1998). Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med Biol Eng Comput*, **36**, 801-12.
- Bagel, J. (2009). Topical therapies for the treatment of plaque psoriasis. *Cutis* **84**, 3-13.
- Baker, B. S., Griffiths, C. E., Lambert, S., Powles, A. V., Leonard, J. N., Valdimarsson, H., and Fry, L. (1987). The effects of cyclosporin A on T lymphocyte and dendritic cell sub-populations in psoriasis. *Br J Dermatol*, **116**, 503-10.



- Balato, A., Unutmaz, D., and Gaspari, A. A. (2009). Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol*, **129**, 1628-42.
- Barker, C. L., McHale, M. T., Gillies, A. K., Waller, J., Pearce, D. M., Osborne, J., Hutchinson, P. E., Smith, G. M., and Pringle, J. H. (2004). The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *J Invest Dermatol*, **123**, 892-901.
- Barker, J. N., Groves, R. W., Allen, M. H., and MacDonald, D. M. (1992). Preferential adherence of T lymphocytes and neutrophils to psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* **127**, 205-11.
- Baz, K., Cimen, M. Y. B., Kokturk, A., Yazici, A. C., Eskandari, G., Ikizoglu, G., Api, H., and Atik, U. (2003). Oxidant/antioxidant status in patients with psoriasis. *Yonsei Medical Journal* **44**, 987-990.
- Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J., and Nakatsuji, T. (1981a). Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, **211**, 1052-4.
- Bell, E., Ehrlich, H. P., Sher, S., Merrill, C., Sarber, R., Hull, B., Nakatsuji, T., Church, D., and Buttle, D. J. (1981b). Development and use of a living skin equivalent. *Plast Reconstr Surg*, **67**, 386-92.
- Bell, E., Ivarsson, B., and Merrill, C. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1274-8.
- Bergboer, J. G., Zeeuwen, P. L., Irvine, A. D., Weidinger, S., Giardina, E., Novelli, G., et al. (2010). Deletion of Late Cornified Envelope 3B and 3C genes is not associated with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **130**, 2057-61.
- Bernard, G., Auger, M., Soucy, J., and Pouliot, R. (2007). Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. *Biochim Biophys Acta*, **1770**, 1317-23.
- Bessis, D., Brun, P., Guilhou, J.-J., Le Maître, M., Ortonne, J.-P., and Samuelson, M. (2005). *Le psoriasis en médecine générale*. Edition Rueil-Malmaison.
- Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2007). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 345-50.
- Bhawan, J., Bansal, C., Whren, K., and Schwertschlag, U. (2004). K16 expression in uninvolved psoriatic skin: a possible marker of pre-clinical psoriasis. *J Cutan Pathol* **31**, 471-6.
- Black, A. F., Bouez, C., Perrier, E., Schlotmann, K., Chapuis, F., and Damour, O. Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent. (2005). *Tissue Eng* **11**, 723-33.

- Blessing, M., Schirmacher, P., and Kaiser, S. (1996). Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions. *J Cell Biol*, **135**, 227-39.
- Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W. F., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., *et al* (2001). Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, **104**, 9-19.
- Bos, J. D., Hulsebosch, H. J., Krieg, S. R., Bakker, P. M., and Cormane, R. H. (1983). Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res*, **275**, 181-9.
- Bovenschen, H. J., Gerritsen, W. J., van Rens, D. W., Seyger, M. M., de Jong, E. M., and van de Kerkhof, P. C. (2007). Explorative immunohistochemical study to evaluate the addition of a topical corticosteroid in the early phase of alefacept treatment for psoriasis. *Arch Dermatol Res*, **298**, 457-63.
- Bowcock, A. M. (2005). The genetics of psoriasis and autoimmunity. *Annu Rev Genomics, Hum Genet* **6**, 93-122.
- Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2005). Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* **5**, 699-711.
- Boyman, O., Hefti, H. P., Conrad, C., Nickoloff, B. J., Suter, M., and Nestle, F. O. (2004). Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med*, **199**, 731-6.
- Braathen, L. R., Botten, G., and Bjerkedal, T. (1989). Prevalence of psoriasis in Norway. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, **142**, 5-8.
- Brandrup, F., and Green, A. (1981). The prevalence of psoriasis in Denmark. *Acta Derm Venereol*, **61**, 344-6.
- Braverman, I. M., and Fonferko, E. (1982). Studies in cutaneous aging: II. The microvasculature. *J Invest Dermatol*, **78**, 444-448.
- Braverman, I. M., and Sibley, J. (1982). Role of the microcirculation in the treatment and pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*, **78**, 12-7.
- Breban, M., Fernandez-Sueiro, J. L., Richardson, J. A., Hadavand, R. R., Maika, S. D., Hammer, R. E., and Taurog, J. D. (1996). T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol*, **156**, 794-803.
- Briganti, S., and Picardo, M. (2003). Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **17**, 663-669.

- Bullard, D. C., Scharffetter-Kochanek, K., McArthur, M. J., Chosay, J. G., McBride, M. E., Montgomery, C. A., and Beaudet, A. L. (1996). A polygenic mouse model of psoriasisiform skin disease in CD18-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2116-21.
- Camisa, C. (2004). Handbook of psoriasis. Second edition. Oxford: Publishing, B
- Canadian Dermatology Association. (2009). Canadian Guidelines for the Management of Plaque Psoriasis. Waterloo.
- Capon, F., Bijlmakers, M. J., Wolf, N., Quaranta, M., Huffmeier, U., Allen, M., et al. (2008). Identification of ZNF313/RNF114 as a novel psoriasis susceptibility gene. *Hum Mol Genet*, **17**, 1938-45.
- Capon, F., Di Meglio, P., Szaub, J., Prescott, N. J., Dunster, C., Baumber, L., et al. (2007). Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet* **122**, 201-6.
- Capon, F., Semprini, S., Chimenti, S., Fabrizi, G., Zambruno, G., Murgia, S., Carcassi, C., Fazio, M., Mingarelli, R., Dallapiccola, B., and Novelli, G. (2001). Fine mapping of the PSORS4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* **116**, 728-30.
- Capon, F., Toal, I. K., Evans, J. C., Allen, M. H., Patel, S., Tillman, D., et al. (2003). Haplotype analysis of distantly related populations implicates corneodesmosin in psoriasis susceptibility. *J Med Genet* **40**, 447-52.
- Cargill, M., Schrodi, S. J., Chang, M., Garcia, V. E., Brandon, R., Callis, K. P., et al. (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* **80**, 273-90.
- Carlin, C. S., Callis, K. P., and Krueger, G. G. (2003). Efficacy of acitretin and commercial tanning bed therapy for psoriasis. *Arch Dermatol* **139**, 436-42.
- Carlin, C. S., Feldman, S. R., Krueger, J. G., Menter, A., and Krueger, G. G. (2004). A 50% reduction in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI 50) is a clinically significant endpoint in the assessment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, **50**, 859-66.
- Carroll, J. M., Crompton, T., Seery, J. P., and Watt, F. M. (1997). Transgenic mice expressing IFN-gamma in the epidermis have eczema, hair hypopigmentation, and hair loss. *J Invest Dermatol*, **108**, 412-22.
- Carroll, J. M., Romero, M. R., and Watt, F. M. (1995). Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell*, **83**, 957-68.

- Chamian, F., and Krueger, J. G. (2004). Psoriasis vulgaris: interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* **16**, 331-7.
- Chang, M., Li, Y., Yan, C., Callis-Duffin, K. P., Matsunami, N., Garcia, V. E., Cargill, M., et al. (2008). Variants in the 5q31 cytokine gene cluster are associated with psoriasis. *Genes Immun*, **9**, 176-81.
- Christophers, E. (2001). Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*, **26**, 314-20.
- Cook, P. W., Brown, J. R., Cornell, K. A., and Pittelkow, M. R. (2004). Suprabasal expression of human amphiregulin in the epidermis of transgenic mice induces a severe, early-onset, psoriasis-like skin pathology: expression of amphiregulin in the basal epidermis is also associated with synovitis. *Exp Dermatol* **13**, 347-56.
- Cook, P. W., Piepkorn, M., Clegg, C. H., Plowman, G. D., DeMay, J. M., Brown, J. R., and Pittelkow, M. R. (1997). Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest*, **100**, 2286-94.
- Creamer, D., Sullivan, D., Bicknell, R., and Barker, J. (2002). Angiogenesis in psoriasis. *Angiogenesis*, **5**, 231-6.
- Danilenko, D. M. (2008). Review paper: preclinical models of psoriasis. *Vet Pathol*, **45**, 563-75.
- de Cid, R., Riveira-Munoz, E., Zeeuwen, P. L., Robarge, J., Liao, W., Dannhauser, E. N., et al. (2009). Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat Genet*, **41**, 211-5.
- de Mare, S., de Jong, E., Van Erp, P. E., and Van de Kerkhof, P. C. (1990). Markers for proliferation and keratinization in the margin of the active psoriatic lesion. *Br J Dermatol*, **122**, 469-75.
- Del Rosso, J., and Friedlander, S. F. (2005). Corticosteroids: options in the era of steroid-sparing therapy. *J Am Acad Dermatol* **53**, S50-8.
- Deng, H., Yan, C. L., Hu, Y., Xu, Y., and Liao, K. H. (2004). Photochemotherapy inhibits angiogenesis and induces apoptosis of endothelial cells in vitro. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **20**, 191-9.
- Detmar, M., Mayer-da-Silva, A., Stadler, R., and Orfanos, C. E. (1990). Initial hyperproliferation and incomplete terminal differentiation of cultured human keratinocytes from lesional and uninvolved psoriatic skin. *Acta Derm Venereol* **70**, 295-9.
- Di Cesare, A., Di Meglio, P., and Nestle, F. O. (2009). The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* **129**, 1339-50.

- Dimon-Gadal, S., Gerbaud, P., Therond, P., Guibourdenche, J., Anderson, W. B., Evain-Brion, D., and Raynaud, F. (2000). Increased oxidative damage to fibroblasts in skin with and without lesions in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* **114**, 984-989.
- Drewa, G., Krzyzyska-Malinowska, E., Wozniak, A., Protas-Drozd, F., Mila-Kierzenkowska, C., et al. (2002). Activity of superoxide dismutase and catalase and the level of lipid peroxidation products reactive with TBA in patients with psoriasis. *Med Sci Monit* **8**, BR338-43.
- Dubertret, L. (2004). Le psoriasis: de la clinique à la thérapeutique. Edition. *MED'COM*
- Dubertret, L. (2009). Retinoids, methotrexate and cyclosporine. *Curr Probl Dermatol* **38**, 79-94.
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., et al. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461-3.
- Duffin, K. C., and Krueger, G. G. (2009). Genetic variations in cytokines and cytokine receptors associated with psoriasis found by genome-wide association. *J Invest Dermatol* **129**, 827-33.
- Duffin, K. C., Woodcock, J., and Krueger, G. G. (2010). Genetic variations associated with psoriasis and psoriatic arthritis found by genome-wide association. *Dermatol Ther* **23**, 101-13.
- Duffy, D. L., Spelman, L. S., and Martin, N. G. (1993). Psoriasis in Australian twins. *J Am Acad Dermatol* **29**, 428-34.
- Dustin, M. L., Singer, K. H., Tuck, D. T., and Springer, T. A. (1988). Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Exp Med* **167**, 1323-40.
- Elder, J. T. (2006). PSORS1: linking genetics and immunology. *J Invest Dermatol*, **126**, 1205-6.
- Elder, J. T. (2009). Genome-wide association scan yields new insights into the immunopathogenesis of psoriasis. *Genes Immun*, **10**, 201-9.
- Elder, J. T., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Stuart, P. E., Tejasvi, T., et al. (2010). Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol*, **130**, 1213-26.
- Elias, P. M., and Feingold, K. R. (2001). Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications. *Archives of Dermatology* **137**, 1079-1081.

- Ellis, C. N., and Krueger, G. G. (2001). Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med*, **345**, 248-55.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*, **119**, 3573-85.
- Fadzil, M. H., Ihtatho, D., Affandi, A. M., and Hussein, S. H. (2009). Area assessment of psoriasis lesions for PASI scoring. *J Med Eng Technol*, **33**, 426-36.
- Fairris, G. M., Lloyd, B., Hinks, L., Perkins, P. J., and Clayton, B. E. (1989). The effect of supplementation with selenium and vitamin-E in psoriasis. *Annals of Clinical Biochemistry* **26**, 83-88.
- Fan, X., Yang, S., Huang, W., Wang, Z. M., Sun, L. D., Liang, Y. H., Gao, M., et al. (2008). Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 supports HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population. *PLoS Genet* **4**, e1000038.
- Farber, E.M., and Nall, M.L. (1998). *Psoriasis Epidemiology: Natural history and genetics*. In *Psoriasis*, pp. 107-158. Marcel Dekker, New York.
- Farber, E. M., and Nall, M. L. (1974). The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica* **148**, 1-18.
- Feldman, S. R., and Krueger, G. G. (2005). Psoriasis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis* **64 Suppl 2**, ii65-8; discussion ii69-73.
- Ferrandiz, C., Bordas, X., Garcia-Patos, V., Puig, S., Pujol, R., and Smandia, A. (2001). Prevalence of psoriasis in Spain (Epiderma Project: phase I). *J Eur Acad Dermatol Venereol* **15**, 20-3.
- Filer, C. E., Ho, P., Bruce, I. N., Worthington, J., and Barton, A. (2009). Investigation of association of genes NAT9, SLC9A3R1 and RAPTOR on chromosome 17q25 with psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* **68**, 292-3.
- Fitzpatrick, T. B., and Wolff, K. (2008). "Fitzpatrick's dermatology in general medicine." New York. : Medical, M-H.
- Fraki, J. E., Briggaman, R. A., and Lazarus, G. S. (1983). Transplantation of psoriatic skin onto nude mice. *J Invest Dermatol*, **80 Suppl**, 31s-35s.
- Fredriksson, T., and Pettersson, U. (1978). Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* **157**, 238-44.
- Fuchs, J., Zollner, T. M., Kaufmann, R., and Podda, M. (2001). Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radical Biology and Medicine* **30**, 337-353.

- Gelfand, J. M., Stern, R. S., Nijsten, T., Feldman, S. R., Thomas, J., Kist, J., Rolstad, T., and Margolis, D. J. (2005a). The prevalence of psoriasis in African Americans: results from a population-based study. *J Am Acad Dermatol*, **52**, 23-6.
- Gelfand, J. M., Weinstein, R., Porter, S. B., Neimann, A. L., Berlin, J. A., and Margolis, D. J. (2005b). Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom: a population-based study. *Arch Dermatol*, **141**, 1537-41.
- Gerbaud, P., Petzold, L., Therond, P., Anderson, W. B., Evain-Brion, D., and Raynaud, F. (2005). Differential regulation of Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutases by retinoic acid in normal and psoriatic human fibroblasts. *Journal of Autoimmunity* **24**, 69-78.
- Germain, L., and Auger, F. A. (1995). Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering Part B: Applications: Tissue engineered biomaterials: biological and mechanical characteristics. (D. L. Wise, D. J. Trantolo, D. E. Altobelli, M. J. Yaszemski, J. D. Gresser, and E. R. Schwartz, eds.), Vol. 1, pp. 699-734. Marcel Dekker Inc., New York.
- Ghoreschi, K., Mrowietz, U., and Rocken, M. (2003). A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *J Mol Med* **81**, 471-80.
- Gilhar, A., Ullmann, Y., Kerner, H., Assy, B., Shalaginov, R., Serafimovich, S., and Kalish, R. S. (2002). Psoriasis is mediated by a cutaneous defect triggered by activated immunocytes: induction of psoriasis by cells with natural killer receptors. *J Invest Dermatol* **119**, 384-91.
- Ginsburg, I., and Kohen, R. (1995). Cell-damage in inflammatory and infectious sites might involve a coordinated cross-talk among oxidants, microbial hemolysins and amphiphiles, cationic proteins, phospholipases, fatty-acids, proteinases and cytokines (an overview). *Free Radical Research* **22**, 489-517.
- Giustizieri, M. L., Mascia, F., Frezzolini, A., De Pita, O., Chinni, L. M., Giannetti, A., Girolomoni, G., and Pastore, S. (2001). Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* **107**, 871-7.
- Glickman, F. S. (1986). Lepra, psora, psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, **14**, 863-6.
- Gokhale, N. R., Belgaumkar, V. A., Pandit, D. P., Deshpande, S., and Damle, D. K. (2005). A study of serum nitric oxide levels in psoriasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **71**, 175-8.
- Gold, L. F. (2009). Calcitriol ointment: optimizing psoriasis therapy. *J Drugs Dermatol* **8 Suppl 8**, 23-7.

- Gornicki, A., and Gutsze, A. (2001). Erythrocyte membrane fluidity changes in psoriasis: an EPR study. *J Dermatol Sci* **27**, 27-30.
- Gottlieb, A. B. (2005). Psoriasis: emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 19-34.
- Gottlieb, A. B., Chaudhari, U., Mulcahy, L. D., Li, S., Dooley, L. T., and Baker, D. G. (2003a). Infliximab monotherapy provides rapid and sustained benefit for plaque-type psoriasis. *J Am Acad Dermatol* **48**, 829-835.
- Gottlieb, A. B., Masud, S., Ramamurthi, R., Abdulghani, A., Romano, P., Chaudhari, U., Dooley, L. T., Fasanmade, A. A., and Wagner, C. L. (2003b). Pharmacodynamic and pharmacokinetic response to anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody (infliximab) treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, **48**, 68-75.
- Gottlieb, S. L., Gilleaudeau, P., Johnson, R., Estes, L., Woodworth, T. G., Gottlieb, A. B., and Krueger, J. G. (1995). Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med* **1**, 442-7.
- Griffiths, C. E., and Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*, **370**, 263-71.
- Griffiths, C. E., Christophers, E., Barker, J. N., Chalmers, R. J., Chimenti, S., Krueger, G. G., et al. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol* **156**, 258-62.
- Griffiths, C. E., Strober, B. E., van de Kerkhof, P., Ho, V., Fidelus-Gort, R., Yeilding, N., Guzzo, C., Xia, Y., Zhou, B., Li, S., Dooley, L. T., Goldstein, N. H., and Menter, A. (2010). Comparison of ustekinumab and etanercept for moderate-to-severe psoriasis. *N Engl J Med*, **362**, 118-28.
- Groves, R. W., Mizutani, H., Kieffer, J. D., and Kupper, T. S. (1995). Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 alpha in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11874-8.
- Grundmann-Kollmann, M., Ludwig, R., Zollner, T. M., Ochsendorf, F., Thaci, D., Boehncke, W. H., Krutmann, J., Kaufmann, R., and Podda, M. (2004). Narrowband UVB and cream psoralen-UVA combination therapy for plaque-type psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, **50**, 734-9.
- Grundmann, S. A., and Beissert, S. (2009). Regulation of cellular immunity by Photo(chemo)therapy. *Front Biosci* **14**, 4326-36.
- Gubner, R. (1951). Effect of aminopterin on epithelial tissues. *AMA Arch Derm Syphilol*, **64**.



- Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Dyson, M., Valdimarsson, H., and Elder, J. T. (2007). Mouse models of psoriasis. *J Invest Dermatol*, **127**, 1292-308.
- Gugasyan, R., Voss, A., Varigos, G., Thomas, T., Grumont, R. J., Kaur, P., Grigoriadis, G., and Gerondakis, S. (2004). The transcription factors c-rel and RelA control epidermal development and homeostasis in embryonic and adult skin via distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, **24**, 5733-45.
- Guo, L., Yu, Q. C., and Fuchs, E. (1993). Targeting expression of keratinocyte growth factor to keratinocytes elicits striking changes in epithelial differentiation in transgenic mice. *Embo J*, **12**, 973-86.
- Guttman-Yassky, E., and Krueger, J. G. (2007). Psoriasis: evolution of pathogenic concepts and new therapies through phases of translational research. *Br J Dermatol*, **157**, 1103-15.
- Hansson, L., Backman, A., Ny, A., Edlund, M., Ekholm, E., Ekstrand Hammarstrom, B., Tornell, J., Wallbrandt, P., Wennbo, H., and Egelrud, T. (2002). Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *J Invest Dermatol*, **118**, 444-9.
- Harvima, I. T., Nilsson, G., Suttle, M. M., and Naukkarinen, A. (2008). Is there a role for mast cells in psoriasis? *Arch Dermatol Res*, **300**, 461-78.
- Heenen, M., Laporte, M., Noel, J. C., and de Graef, C. (1998). Methotrexate induces apoptotic cell death in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **290**, 240-5.
- Heffernan, M. P., and Leonardi, C. L. (2010). Alefacept for psoriasis. *Semin Cutan Med Surg*, **29**, 53-5.
- Heidenreich, R., Rocken, M., and Ghoreschi, K. (2009). Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int J Exp Pathol* **90**, 232-48.
- Helms, C., Cao, L., Krueger, J. G., Wijsman, E. M., Chamian, F., Gordon, D., et al. (2003). A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet* **35**, 349-56.
- Henseler, T., and Christophers, E. (1985). Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* **13**, 450-6.
- Hobbs, R. M., Silva-Vargas, V., Groves, R., and Watt, F. M. (2004). Expression of activated MEK1 in differentiating epidermal cells is sufficient to generate hyperproliferative and inflammatory skin lesions. *J Invest Dermatol*, **123**, 503-15.
- Hohl, D. (1993). Expression patterns of loricrin in dermatological disorders. *Am J Dermatopathol* **15**, 20-7.
- Honigsmann, H. (2001). Phototherapy for psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, **26**, 343-50.

- Huffmeier, U., Bergboer, J. G., Becker, T., Armour, J. A., Traupe, H., Estivill, X., Riveira-Munoz, E., et al. (2010). Replication of LCE3C-LCE3B CNV as a risk factor for psoriasis and analysis of interaction with other genetic risk factors. *J Invest Dermatol*, **130**, 979-84.
- Huffmeier, U., Steffens, M., Burkhardt, H., Lascorz, J., Schurmeier-Horst, F., Stander, M., et al. (2006). Evidence for susceptibility determinant(s) to psoriasis vulgaris in or near PTPN22 in German patients. *J Med Genet*, **43**, 517-22.
- Huffmeier, U., Traupe, H., Burkhardt, H., Schurmeier-Horst, F., Lascorz, J., Bohm, B., et al. (2005). Lack of evidence for genetic association to RUNX1 binding site at PSORS2 in different German psoriasis cohorts. *J Invest Dermatol*, **124**, 107-10.
- Hwu, W. L., Yang, C. F., Fann, C. S., Chen, C. L., Tsai, T. F., Chien, Y. H., et al. (2005). Mapping of psoriasis to 17q terminus. *J Med Genet*, **42**, 152-8.
- Hynes, R. O. (1990). "Fibronectins." Edition. New York: Springer-Verlag
- Ishida-Yamamoto, A., Eady, R. A., Watt, F. M., Roop, D. R., Hohl, D., and Iizuka, H. (1996). Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelope formation in normal and psoriatic epidermis. *J Histochem Cytochem* **44**, 167-75.
- Jariwala, S. P. (2007). The role of dendritic cells in the immunopathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res* **299**, 359-66.
- Jean, J., Lapointe, M., Soucy, J., and Pouliot, R. (2009). Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci* **53**, 19-25.
- Jean, J., and Pouliot, R. (2010). Tissue engineering: In vivo and in vitro models of psoriasis. In *Tissue engineering* (D. Eberli, ed.), pp. 524. Intech.
- Jiang, W. Y., Chattedee, A. D., Raychaudhuri, S. P., Raychaudhuri, S. K., and Farber, E. M. (2001). Mast cell density and IL-8 expression in nonlesional and lesional psoriatic skin. *Int J Dermatol*, **40**, 699-703.
- Johnston, A., Gudjonsson, J. E., Sigmundsdottir, H., Ludviksson, B. R., and Valdimarsson, H. (2005). The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol* **114**, 154-63.
- Kagami, S., Rizzo, H. L., Lee, J. J., Koguchi, Y., and Blauvelt, A. (2010). Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*, **130**, 1373-83.
- Kamili, Q. U., and Menter, A. (2009). Topical treatment of psoriasis. *Curr Probl Dermatol* **38**, 37-58.

- Karaman, A., Aliagaoglu, C., and Pirim, I. (2008). Sister chromatid exchange analysis in patients with psoriasis. *Experimental Dermatology* **17**, 524-529.
- Karashima, T., Hachisuka, H., and Sasai, Y. (1996). FK506 and cyclosporin A inhibit growth factor-stimulated human keratinocyte proliferation by blocking cells in the G0/G1 phases of the cell cycle. *J Dermatol Sci*, **12**, 246-54.
- Keith, J. C., Jr., Sainz, I. M., Isordia-Salas, I., Pixley, R. A., Leathurby, Y., Albert, L. M., and Colman, R. W. (2005). A monoclonal antibody against kininogen reduces inflammation in the HLA-B27 transgenic rat. *Arthritis Res Ther*, **7**, R769-76.
- Keller, M., Spanou, Z., Schaerli, P., Britschgi, M., Yawalkar, N., Seitz, M., Villiger, P. M., and Pichler, W. J. (2005). T cell-regulated neutrophilic inflammation in autoinflammatory diseases. *J Immunol*, **175**, 7678-86.
- Kess, D., Peters, T., Zamek, J., Wickenhauser, C., Tawadros, S., Loser, K., Varga, G., et al. (2003). CD4+ T cell-associated pathophysiology critically depends on CD18 gene dose effects in a murine model of psoriasis. *J Immunol*, **171**, 5697-706.
- Kizaki, H., Matsuo, I., and Sakurada, T. (1977). Xanthine oxidase and guanase activities in normal and psoriatic epidermis. *Clin Chim Acta* **75**, 1-4.
- Kobayashi, T., Matsumoto, M., Iizuka, H., Suzuki, K., and Taniguchi, N. (1991). Superoxide dismutase in psoriasis, squamous cell carcinoma and basal cell epithelioma: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol* **124**, 555-9.
- Kokcam, I., and Naziroglu, M. (1999). Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with psoriasis. *Clin Chim Acta* **289**, 23-31.
- Konstantinova, N. V., Duong, D. M., Remenyik, E., Hazarika, P., Chuang, A., and Duvic, M. (1996). Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts. *J Invest Dermatol*, **107**, 615-21.
- Kopp, T., Kieffer, J. D., Rot, A., Strommer, S., Stingl, G., and Kupper, T. S. (2001). Inflammatory skin disease in K14/p40 transgenic mice: evidence for interleukin-12-like activities of p40. *J Invest Dermatol*, **117**, 618-26.
- Kormeili, T., Lowe, N. J., and Yamauchi, P. S. (2004). Psoriasis: immunopathogenesis and evolving immunomodulators and systemic therapies; U.S. experiences. *Br J Dermatol* **151**, 3-15.
- Krueger, G. G., Chambers, D. A., and Shelby, J. (1981). Involved and uninvolved skin from psoriatic subjects: are they equally diseased? Assessment by skin transplanted to congenitally athymic (nude) mice. *J Clin Invest*, **68**, 1548-57.
- Krueger, J. G. (2002). The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* **46**, 1-23; quiz 23-26.

- Krueger, J. G., and Bowcock, A. (2005). Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis*, **64 Suppl 2**, ii30-ii36.
- Kunz, M., and Ibrahim, S. M. (2009). Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. *Mediators Inflamm* **2009**, 979258.
- Kural, B. V., Orem, A., Cimsit, G., Yandi, Y. E., and Calapoglu, M. (2003). Evaluation of the atherogenic tendency of lipids and lipoprotein content and their relationships with oxidant-antioxidantsystem in patients with psoriasis. *Clinica Chimica Acta* **328**, 71-82.
- Laptev, M. V., and Nikulin, N. K. (2005). Synchronization of oscillations of proliferation of keratinocytes in psoriatic skin by external periodic force: a mathematical model. *J Theor Biol* **235**, 485-94.
- Lebwohl, M. (1999). The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. *Int J Dermatol* **38**, 16-24.
- Lebwohl, M., Ting, P. T., and Koo, J. Y. (2005). Psoriasis treatment: traditional therapy. *Ann Rheum Dis*, **64 Suppl 2**, ii83-6.
- Lee, M., and Kalb, R. E. (2008). Systemic therapy for psoriasis. *Dermatol Nurs*, **20**, 105-11; quiz 112.
- Lee, S. H., Jeong, S. K., and Ahn, S. K. (2006). An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Medical Journal* **47**, 293-306.
- Leigh, I. M., Navsaria, H., Purkis, P. E., McKay, I. A., Bowden, P. E., and Riddle, P. N. (1995). Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *Br J Dermatol*, **133**, 501-11.
- Lemay, R. (2006). Pharmacothérapie du psoriasis. *Québec Pharmacie* **53**, 141-50.
- Lev-Tov, H., and Hadi, S. (2006). Alefacept- a drug review. *Rev Recent Clin Trials*, **1**, 163-4.
- Leveque, N., Robin, S., Muret, P., Mac-Mary, S., Makki, S., Berthelot, A., Kantelip, J. P., and Humbert, P. (2004). In vivo assessment of iron and ascorbic acid in psoriatic dermis. *Acta Derm Venereol* **84**, 2-5.
- Lew, W., Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2004). Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and "Type 1" inflammatory gene expression. *Trends Immunol* **25**, 295-305.
- Li, Y., Chang, M., Schrodi, S. J., Callis-Duffin, K. P., Matsunami, N., Civello, D., Bui, N., Catanese, J. J., Leppert, M. F., Krueger, G. G., and Begovich, A. B. (2008). The

- 5q31 variants associated with psoriasis and Crohn's disease are distinct. *Hum Mol Genet*, **17**, 2978-85.
- Li, Y., Liao, W., Chang, M., Schrodi, S. J., Bui, N., Catanese, J. J., et al. (2009). Further genetic evidence for three psoriasis-risk genes: ADAM33, CDKAL1, and PTPN22. *J Invest Dermatol*, **129**, 629-34.
- Lima, X. T., Abuabara, K., Kimball, A. B., and Lima, H. C. (2009). Briakinumab. *Expert Opin Biol Ther* **9**, 1107-13.
- Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L. C., Duan, S., Gardner, J., et al. (2008). A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet* **4**, e1000041.
- Liu, Y. C., Penninger, J., and Karin, M. (2005). Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol*, **5**, 941-52.
- Lontz, W., Sirsjo, A., Liu, W., Lindberg, M., Rollman, O., and Torma, H. (1995). Increased messenger-RNA expression of manganese superoxide-dismutase in psoriasis skin-lesions and in cultured human keratinocytes exposed to IL-1 beta and TNF-alpha. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, 349-355.
- Lowes, M. A., Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, **445**, 866-73.
- Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., Bowman, E. P., and Krueger, J. G. (2008). Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* **128**, 1207-11.
- Majewski, S., Janik, P., Langner, A., Glinska-Ferenz, M., Swietochowska, B., and Sawicki, I. (1989). Decreased levels of vitamin A in serum of patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res* **280**, 499-501.
- Mansbridge, J. N., and Knapp, A. M. (1984). The binding of Helix pomatia and Ulex europeus agglutinins to normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, **82**, 170-5.
- Mansbridge, J. N., and Knapp, A. M. (1987). Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol*, **89**, 253-63.
- McKay, I. A., and Leigh, I. M. (1995). Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis. *Clin Dermatol*, **13**, 105-14.
- Mease, P. J., Goffe, B. S., Metz, J., VanderStoep, A., Finck, B., and Burge, D. J. (2000). Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet* **356**, 385-90.

- Mease, P. J., and Menter, M. A. (2006). Quality-of-life issues in psoriasis and psoriatic arthritis: outcome measures and therapies from a dermatological perspective. *J Am Acad Dermatol*, **54**, 685-704.
- Meenan, F. O. (1955). A note on the history of psoriasis. *Ir J Med Sci* **6**, 141-2.
- Mekori, Y. A., and Metcalfe, D. D. (1999). Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 517-23.
- Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. A., and Germain, L. (1999). Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **35**, 318-26.
- Midorikawa, K., and Kawanishi, S. (2001). Superoxide dismutases enhance H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and alter its site specificity. *FEBS Letters* **495**, 187-190.
- Mils, V., Basset-Seguin, N., Moles, J. P., Tesniere, A., Leigh, I., and Guilhou, J. J. (1994). Comparative analysis of normal and psoriatic skin both in vivo and in vitro. *Differentiation* **58**, 77-86.
- Mizutani, H., Yamanaka, K., Konishi, H., and Murakami, T. (2003). Animal models of psoriasis and pustular psoriasis. *Arch Dermatol Res* **295 Suppl 1**, S67-8.
- Morar, N., Bowcock, A. M., Harper, J. I., Cookson, W. O., and Moffatt, M. F. (2006). Investigation of the chromosome 17q25 PSORS2 locus in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, **126**, 603-6.
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Mellesi, L., Ghidoni, R., and Caputo, R. (1994). Abnormality of water barrier function in psoriasis - role of ceramide fractions. *Archives of Dermatology*, **130**, 452-456.
- Nair, R. P., Duffin, K. C., Helms, C., Ding, J., Stuart, P. E., Goldgar, D., Gudjonsson, J. E., et al (2009). Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet* **41**, 199-204.
- Nair, R. P., Ruether, A., Stuart, P. E., Jenisch, S., Tejasvi, T., Hiremagalore, R., Schreiber, et al. (2008). Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* **128**, 1653-61.
- Nair, R. P., Stuart, P. E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V., Jenisch, S., Weichenthal, M., et al. (2006). Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet* **78**, 827-51.
- Naldi, L. (2004). Epidemiology of psoriasis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **3**, 121-8.
- Neimann, A. L. P., SB; Gelfand, JM. (2006). The epidemiology of psoriasis. *Expert Rev.Dermatol*, **1**, 63-75.

- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., and Nickoloff, B. J. (2009a). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*, **9**, 679-91.
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H., and Barker, J. (2009b). Psoriasis. *N Engl J Med* **361**, 496-509.
- Newcomb, D. C., Zhou, W., Moore, M. L., Goleniewska, K., Hershey, G. K., Kolls, J. K., and Peebles, R. S., Jr. (2009). A functional IL-13 receptor is expressed on polarized murine CD4<sup>+</sup> Th17 cells and IL-13 signaling attenuates Th17 cytokine production. *J Immunol* **182**, 5317-21.
- Nguyen, T., Gattu, S., Pugashetti, R., and Koo, J. (2009). Practice of phototherapy in the treatment of moderate-to-severe psoriasis. *Curr Probl Dermatol*, **38**, 59-78.
- Nickoloff, B. J. (2007). Cracking the cytokine code in psoriasis. *Nat Med* **13**, 242-4.
- Nickoloff, B. J., Mitra, R. S., Riser, B. L., Dixit, V. M., and Varani, J. (1988). Modulation of keratinocyte motility. Correlation with production of extracellular matrix molecules in response to growth promoting and antiproliferative factors. *Am J Pathol* **132**, 543-51.
- Nickoloff, B. J., Qin, J. Z., and Nestle, F. O. (2007a). Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol* **33**, 45-56.
- Nickoloff, B. J., Xin, H., Nestle, F. O., and Qin, J. Z. (2007b). The cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clin Dermatol* **25**, 568-73.
- Nicolas, J.-F., and Thivolet, J. (1997). Psoriasis : de la clinique à la thérapeutique. Edition. Paris: Eurotext, JL.
- Nogralles, K. E., Zaba, L. C., Guttman-Yassky, E., Fuentes-Duculan, J., Suarez-Farinas, M., Cardinale, I., et al. (2008). Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* **159**, 1092-102.
- Norris, D. A. (2005). Mechanisms of action of topical therapies and the rationale for combination therapy. *J Am Acad Dermatol* **53**, S17-25.
- Ormerod, A. D., Weller, R., Copeland, P., Benjamin, N., Ralston, S. H., Grabowksi, P., and Herriot, R. (1998). Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch Dermatol Res* **290**, 3-8.
- Paghdal, K. V., and Schwartz, R. A. (2009). Topical tar: back to the future. *J Am Acad Dermatol*, **61**, 294-302.
- Pang, M. L., Murase, J. E., and Koo, J. (2008). An updated review of acitretin--a systemic retinoid for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 953-64.

- Papoutsaki, M., Costanzo, A., Chimenti, M. S., and Chimenti, S. (2008). Adalimumab for the treatment of severe psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Opin Biol Ther*, **8**, 363-70.
- Papp, K. A. (2008). Monitoring biologics for the treatment of psoriasis. *Clin Dermatol* **26**, 515-21.
- Papp, K. A. (2009). Monitoring patients treated with efalizumab or alefacept. *Curr Probl Dermatol*, **38**, 95-106.
- Paramio, J. M., Casanova, M. L., Segrelles, C., Mitnacht, S., Lane, E. B., and Jorcano, J. L. (1999). Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* **19**, 3086-94.
- Pasparakis, M., Courtois, G., Hafner, M., Schmidt-Supprian, M., Nenci, A., Toksoy, A., Krampert, M., Goebeler, M., Gillitzer, R., Israel, A., Krieg, T., Rajewsky, K., and Haase, I. (2002). TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature*, **417**, 861-6.
- Pelle, E., Mammone, T., Maes, D., and Frenkel, K. (2005). *Journal of Investigative Dermatology* **124**, 793-797.
- Peternel, S., and Kastelan, M. (2009). Immunopathogenesis of psoriasis: focus on natural killer T cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **23**, 1123-7.
- Pouliot, R., Larouche, D., Auger, F. A., Juhasz, J., Xu, W., Li, H., and Germain, L. (2002). Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation* **73**, 1751-7.
- Presland, R. B., Coulombe, P. A., Eckert, R. L., Mao-Qiang, M., Feingold, K. R., and Elias, P. M. (2004). Barrier function in transgenic mice overexpressing K16, involucrin, and filaggrin in the suprabasal epidermis. *J Invest Dermatol* **123**, 603-6.
- Pujari V, S. A., Ireddy S.(2010). Oxidant and antioxidant status in psoriatic patients. *Biomedical research* **21**, 221-223.
- Quaranta, M., Burden, A. D., Griffiths, C. E., Worthington, J., Barker, J. N., Trembath, R. C., and Capon, F. (2009). Differential contribution of CDKAL1 variants to psoriasis, Crohn's disease and type II diabetes. *Genes Immun*, **10**, 654-8.
- Rahmoun, M., Moles, J. P., Pedretti, N., Mathieu, M., Fremaux, I., Raison-Peyron, N., Lecron, J. C., Yssel, H., and Pene, J. (2009). Cytokine-induced CEACAM1 expression on keratinocytes is characteristic for psoriatic skin and contributes to a prolonged lifespan of neutrophils. *J Invest Dermatol*, **129**, 671-81.
- Raychaudhuri, S. P., Dutt, S., Raychaudhuri, S. K., Sanyal, M., and Farber, E. M. (2001). Severe combined immunodeficiency mouse-human skin chimeras: a unique animal



- model for the study of psoriasis and cutaneous inflammation. *Br J Dermatol* **144**, 931-9.
- Raymond, G. P., and Houle, M.-C. (2007). Présentation des corticostéroïdes pour le traitement du psoriasis. *Skin Pharmacies* **2**.
- Relhan, V., Gupta, S. K., Dayal, S., Pandey, R., and Lal, H. (2002). Blood thiols and malondialdehyde levels in psoriasis. *J Dermatol* **29**, 399-403.
- Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueiredo, A., Quintanilha, A., and Teixeira, F. (2004a). Erythrocyte damage in mild and severe psoriasis. *British Journal of Dermatology* **150**, 232-244.
- Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueiredo, A., Quintanilha, A., and Teixeira, F. (2004b). The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br J Dermatol*, **150**, 917-28.
- Sabat, R., Philipp, S., Hoflich, C., Kreutzer, S., Wallace, E., Asadullah, K., Volk, H. D., Sterry, W., and Wolk, K. (2007). Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol* **16**, 779-98.
- Saiag, P., Coulomb, B., Lebreton, C., Bell, E., and Dubertret, L. (1985). Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science*, **230**, 669-72.
- Sano, S., Chan, K. S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., Itami, S., Nickoloff, B. J., and DiGiovanni, J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*, **11**, 43-9.
- Santos, M., Paramio, J. M., Bravo, A., Ramirez, A., and Jorcano, J. L. (2002). The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem* **277**, 19122-30.
- Schaerli, P., Britschgi, M., Keller, M., Steiner, U. C., Steinmann, L. S., Moser, B., and Pichler, W. J. (2004). Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. *J Immunol*, **173**, 2151-8.
- Schon, M. P. (1999). Animal models of psoriasis - what can we learn from them? *J Invest Dermatol*, **112**, 405-10.
- Schon, M. P. (2008). Animal models of psoriasis: a critical appraisal. *Exp Dermatol* **17**, 703-12.
- Schon, M. P., and Boehncke, W. H. (2005). Psoriasis. *N Engl J Med*, **352**, 1899-912.

- Schon, M. P., Schon, M., Warren, H. B., Donohue, J. P., and Parker, C. M. (2000). Cutaneous inflammatory disorder in integrin alphaE (CD103)-deficient mice. *J Immunol*, **165**, 6583-9.
- Schroeder, W. T., Thacher, S. M., Stewart-Galetka, S., Annarella, M., Chema, D., Siciliano, M. J., et al. (1992). Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. *J Invest Dermatol* **99**, 27-34.
- Segal, B. M., Constantinescu, C. S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., and Kasper, L. H. (2008). Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol* **7**, 796-804.
- Seifert, O., Holmberg, J., and Linnarsson, B. M. (2007). Decreased activity of neutrophil glutathione peroxidase in chronic plaque-type psoriasis. *J Am Acad Dermatol* **57**, 528-9.
- Shilov, V. N., and Sergienko, V. I. (2000). Oxidative stress in keratinocytes as an etiopathogenetic factor of psoriasis. *Bull Exp Biol Med* **129**, 309-13.
- Singri, P., West, D. P., and Gordon, K. B. (2002). Biologic therapy for psoriasis: the new therapeutic frontier. *Arch Dermatol*, **138**, 657-63.
- Smetsers, T. F., van de Westerlo, E. M., ten Dam, G. B., Overes, I. M., Schalkwijk, J., van Muijen, G. N., and van Kuppevelt, T. H. (2004). Human single-chain antibodies reactive with native chondroitin sulfate detect chondroitin sulfate alterations in melanoma and psoriasis. *J Invest Dermatol* **122**, 707-16.
- Smith, R. L., Warren, R. B., Eyre, S., Ke, X., Young, H. S., Allen, M., Strachan, D., McArdle, W., Gittins, M. P., Barker, J. N., Griffiths, C. E., and Worthington, J. (2008). Polymorphisms in the PTPN22 region are associated with psoriasis of early onset. *Br J Dermatol*, **158**, 962-8.
- Stewart, W. D., Wallace, S. M., and Runikis, J. O. (1972). Absorption and local action of methotrexate in human and mouse skin. *Arch Dermatol*, **106**, 357-61.
- Stoler, A., Kopan, R., Duvic, M., and Fuchs, E. (1988). Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *J Cell Biol*, **107**, 427-46.
- Stuart, P., Nair, R. P., Abecasis, G. R., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V., et al. (2006). Analysis of RUNX1 binding site and RAPTOR polymorphisms in psoriasis: no evidence for association despite adequate power and evidence for linkage. *J Med Genet*, **43**, 12-7.
- Stuart, P. E., Nair, R. P., Hiremagalore, R., Kullavanijaya, P., Tejasvi, T., Lim, H. W., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (2010). Comparison of MHC class I risk haplotypes

in Thai and Caucasian psoriatics shows locus heterogeneity at PSORS1. *Tissue Antigens*.

- Sullivan-Whalen, M., and Gilleaudeau, P. (2007). Psoriasis: hope for the future. *Nurs Clin North Am*, **42**, 467-84, vii.
- Sundberg, J. P., Beamer, W. G., Shultz, L. D., and Dunstan, R. W. (1990). Inherited mouse mutations as models of human adnexal, cornification, and papulosquamous dermatoses. *J Invest Dermatol*, **95**, 62S-63S.
- Tanghetti, E. A. (2009). The role of topical vitamin D modulators in psoriasis therapy. *J Drugs Dermatol* **8 Suppl 8**, 4-8.
- Terui, T., Ozawa, M., and Tagami, H. (2000). Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. *Exp Dermatol*, **9**, 1-10.
- Therond, P., Gerbaud, P., Dimon, S., Anderson, W. B., EvainBrion, D., and Raynaud, F. (1996). Antioxidant enzymes in psoriatic fibroblasts and erythrocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **106**, 1325-1328.
- Thielen, A. M., and Laffitte, E. (2009). Topical treatments for psoriasis in 2009. *Rev Med Suisse* **5**, 876, 878-81.
- Thielen, A. M., and Marazza, G. (2008). The biological treatments for moderate to severe plaque psoriasis. *Rev Med Suisse*, **4**, 1089-90, 1092-4.
- Tjabringa, G., Bergers, M., van Rens, D., de Boer, R., Lamme, E., and Schalkwijk, J. (2008). Development and validation of human psoriatic skin equivalents. *Am J Pathol*, **173**, 815-23.
- Toichi, E., Tachibana, T., and Furukawa, F. (2000). Rapid improvement of psoriasis vulgaris during drug-induced agranulocytosis. *J Am Acad Dermatol*, **43**, 391-5.
- Tomfohrde, J., Silverman, A., Barnes, R., Fernandez-Vina, M. A., Young, M., Lory, D., et al. (1994). Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* **264**, 1141-5.
- Tonel, G., and Conrad, C. (2009). Interplay between keratinocytes and immune cells-- recent insights into psoriasis pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 963-8.
- Tremblay, J.-F., R. Bissonnette. (2002). Topical Agent for the Treatment of Psoriasis, Past, Present and Future. *J Cutan Med Surg* **10**, 8-11.
- Trouba, K. J., Hamadeh, H. K., Amin, R. P., and Germolec, D. R. (2002). Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxidants & Redox Signaling* **4**, 665-673.

- Tsunemi, Y., Saeki, H., Nakamura, K., Sekiya, T., Hirai, K., Fujita, H., et al. (2002). Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* **30**, 161-6.
- Turksen, K., Kupper, T., Degenstein, L., Williams, I., and Fuchs, E. (1992). Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5068-72.
- Tzu, J., Krulig, E., Cardenas, V., and Kerdel, F. A. (2008). Biological agents in the treatment of psoriasis. *G Ital Dermatol Venereol* **143**, 315-27.
- Utas, S., Kose, K., Yazici, C., Akdas, A., and Kelestimur, F. (2002). Antioxidant potential of propylthiouracil in patients with psoriasis. *Clin Biochem* **35**, 241-6.
- Vaccaro, M., Magaudda, L., Cutroneo, G., Trimarchi, F., Barbuzza, O., Guarneri, F., and Guarneri, B. (2002). Changes in the distribution of laminin alpha1 chain in psoriatic skin: immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Br J Dermatol* **146**, 392-8.
- van de Kerkhof, P. C., and Lammers, A. M. (1987). Intraepidermal accumulation of polymorphonuclear leukocytes in chronic stable plaque psoriasis. *Dermatologica* **174**, 224-7.
- Vang, T., Miletic, A. V., Bottini, N., and Mustelin, T. (2007). Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. *Autoimmunity* **40**, 453-61.
- Vassar, R., and Fuchs, E. (1991). Transgenic mice provide new insights into the role of TGF-alpha during epidermal development and differentiation. *Genes Dev*, **5**, 714-27.
- Vinuesa, C. G., Cook, M. C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K. M., et al. (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*, **435**, 452-8.
- Vissers, W. H., Berends, M., Muys, L., van Erp, P. E., de Jong, E. M., and van de Kerkhof, P. C. (2004). The effect of the combination of calcipotriol and betamethasone dipropionate versus both monotherapies on epidermal proliferation, keratinization and T-cell subsets in chronic plaque psoriasis. *Exp Dermatol*, **13**, 106-12.
- Voskas, D., Jones, N., Van Slyke, P., Sturk, C., Chang, W., Haninec, A., et al. (2005). A cyclosporine-sensitive psoriasis-like disease produced in Tie2 transgenic mice. *Am J Pathol*, **166**, 843-55.
- Weinberg, J. M. (2003). An overview of infliximab, etanercept, efalizumab, and alefacept as biologic therapy for psoriasis. *Clin Ther*, **25**, 2487-505.

- Weinstein, G. D., McCullough, J. L., and Ross, P. (1984). Cell proliferation in normal epidermis. *J Invest Dermatol*, **82**, 623-8.
- Wolf, N., Quaranta, M., Prescott, N. J., Allen, M., Smith, R., Burden, A. D., et al. (2008). Psoriasis is associated with pleiotropic susceptibility loci identified in type II diabetes and Crohn disease. *J Med Genet*, **45**, 114-6.
- Wrone-Smith, T., and Nickoloff, B. J. (1996). Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest*, **98**, 1878-87.
- Xia, Y. P., Li, B., Hylton, D., Detmar, M., Yancopoulos, G. D., and Rudge, J. S. (2003). Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood*, **102**, 161-8.
- Yildirim, M., Inaloz, H. S., Baysal, V., and Delibas, N. (2003). The role of oxidants and antioxidants in psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **17**, 34-36.
- Young, C. N., Koepke, J. I., Terlecky, L. J., Borkin, M. S., Boyd, S. L., and Terlecky, S. R. (2008). Reactive oxygen species in tumor necrosis factor-alpha-activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol* **128**, 2606-14.
- Zakarian, K., Nguyen, A., Letsinger, J., and Koo, J. (2007). Excimer laser for psoriasis: a review of theories regarding enhanced efficacy over traditional UVB phototherapy. *J Drugs Dermatol*, **6**, 794-8.
- Zalewska, A., Wyczolkowska, J., Narbutt, J., and Sysa-Jedrzejowska, A. (2007). Nitric oxide levels in plasma and fibroblast cultures of psoriasis vulgaris patients. *J Dermatol Sci*, **48**, 237-40.
- Zenz, R., Eferl, R., Kenner, L., Florin, L., Hummerich, L., Mehic, D., Scheuch, H., Angel, P., Tschachler, E., and Wagner, E. F. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature*, **437**, 369-75.
- Zhang, X. J., Huang, W., Yang, S., Sun, L. D., Zhang, F. Y., Zhu, Q. X., et al (2009). Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nat Genet* **41**, 205-10.
- Zheng, Y., Eilertsen, K. J., Ge, L., Zhang, L., Sundberg, J. P., Prouty, S. M., Stenn, K. S., and Parimoo, S. (1999). *Scd1* is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat Genet*, **23**, 268-70.

### **Annexe 3. Présence des polyphénols dans la diète et dans la biomasse forestière.**

**Avant-propos**

Cette annexe fait l'objet d'un article intitulé *Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass* qui a été publié dans *Current Nutrition & Food Science* 5 (4): 264-295, 2009

Tatjana Stevanovic a effectué la rédaction de l'introduction, la partie concernant la classification des polyphénols et les conclusions. Papa Niokhor Diouf a rédigé la partie concernant l'importance des ressources forestières en tant que source de polyphénols antioxydants. J'ai rédigé la partie concernant l'action des polyphénols pour la santé. La rédaction de cet article a été réalisée sous la supervision de la Dre Tatjana Stevanovic.

## Résumé

En dehors de leur valeur nutritive, les aliments contiennent aussi un large éventail de composés chimiques bioactifs pouvant contribuer à leurs effets bénéfiques sur la santé. Ces molécules bioactives se présentent sous forme de diverses structures chimiques, parmi lesquelles on retrouve les caroténoïdes, les stérols, les acides gras et les polyphénols. Dans cette revue, l'emphase est mise sur les polyphénols, des constituants communément présents dans les plantes vasculaires, les fruits, les légumes, les thés et le cacao. Les polyphénols extractibles, pouvant être obtenus via l'extraction par solvants de la biomasse forestière, ont un intérêt particulier dans ce travail de par leur présence importante au sein des différents résidus de l'industrie de transformation du bois. Les flavonoïdes, les dérivés de l'acide cinnamique et les proanthocyanidines, qui partagent une partie de leur voie de biosynthèse avec les lignines, ainsi que quelques non-flavonoïdes tels que les stilbènes et les tannins hydrolysables sont analysés. Les aliments riches en ces polyphénols et leurs sources forestières sont comparés. L'emphase est mise sur les résidus de la transformation du bois tels les écorces et les nœuds, du fait que ces matériaux représentent des sources précieuses de polyphénols bioactifs. Une des propriétés les plus reconnues des polyphénols est leur activité antioxydante. De ce fait, les études les plus représentatives sur la capacité antioxydante d'extraits forestiers sont présentées et comparées à celles d'extraits d'origine alimentaire. Les taux en polyphénols totaux de ces extraits sont également présentés dans ce travail. Finalement, des recherches reliées à l'application de certains polyphénols ou d'extraits forestiers pour la prévention et/ou le traitement des maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer et le cancer sont présentées. Il devient donc clair à partir des résultats analysés, que la biomasse forestière représente une source importante en polyphénols bioactifs. En effet, les résidus issus de la transformation du bois ont un réel potentiel pour le développement de nouveaux produits sous forme de compléments alimentaires, aliments fonctionnels, cosmétiques ou médicaments.



**Article****Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass**

Tatjana Stevanovic<sup>1</sup>, Papa Niokhor Diouf<sup>1</sup>, Martha-Estrella García-Pérez<sup>1,2</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup> Centre de Recherche sur le Bois, Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6. <sup>2</sup> Centre LOEX de l'Université Laval, Génie tissulaire et régénération: LOEX - Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec, Aile-R, 1401 18<sup>e</sup> rue, Québec, Qc, Canada, G1J 1Z4 and Faculté de Pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6.

**Address for reprint requests:**

Tatjana Stevanovic, Ph.D.

Centre de recherche sur le bois, Université Laval, Département des sciences du bois et de la forêt, Pavillon Gene H. Kruger, 2425 rue de la Terrasse, Québec, Qc, Canada G1V 0A6.  
Tel.: (1) 418 656 2131ext 7337. Fax: (1) 418 656 209

E-mail address: [Tatjana.Stevanovic@sbf.ulaval.ca](mailto:Tatjana.Stevanovic@sbf.ulaval.ca)

## **Abstract**

In addition to their nutritive value, foods provide health benefits or have a role in disease prevention since they contain a wide range of phytochemicals which represent functional or bioactive components. These bioactive molecules present in foods are based on a variety of chemical structures, from carotenoids, through sterols and fatty acids, to different types of polyphenols. In this review, the polyphenols which are common constituents of vascular plants are explored. They are also common constituents of fruits and vegetables, teas and cocoas. The extractable polyphenols, obtainable by solvent extraction of the forest biomass, are of special interest as they are readily available from different types of forest and wood transformation residues. Flavonoids, cinnamic acid derivatives and proanthocyanidins, which share a part of their biosynthetic pathway with lignins, and therefore are associated with “woody” character of the plants, are reviewed along with some non-flavonoids important as food constituents such as stilbenes and hydrolysable tannins. The foods rich in these polyphenols are reviewed along with the forest sources of the same classes of molecules. The emphasis is put on residues of wood transformation such as bark and knotwood as these materials represent particularly rich resources for bioactive polyphenol classes. One of the most notorious bioactive properties of polyphenols is their antioxidant activity. The most important results on antioxidant capacity of forest trees extracts are presented and compared to those obtained for the extracts from healthy foods rich in polyphenols. These results are discussed also in relation to total phenol content of the studied extracts. Finally, the results on the application of selected types of polyphenols or extracts from forest biomass in prevention and/or treatment of diseases which are related to oxidative stress, cardiovascular disease, Alzheimer and cancer, are presented. It is clear from all discussed results, that the forest biomass in general and the residues of wood transformation in particular, represent the important natural resources of bioactive polyphenols. These residues have a real potential to be used as raw materials for the development of food supplements, functional foods, cosmetics and pharmaceutical products.

## Introduction

As it is evident for the pharmaceutical industry which cannot remain committed exclusively to the synthetic drugs derived from the petrochemical raw materials, the same is true for food and cosmetic industries which are already making shift towards renewable resources and green technologies. The principles of green chemistry are going to guide all future developments of new health products derived from the biomass. Since the forest biomass is the most important biomass on Earth, and as wood industry is generating the huge amounts of residues, these are available as an important resource for further processing and valorisation of bioactive molecules through extraction.

Phenolic compounds are ubiquitous constituents of plants, and their major sources in human diet are fruits, vegetables and various beverages. Phenolic compounds exhibit a wide range of physiological activities, such as antioxidant, anti-allergenic, anti-atherogenic, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-thrombotic, cardioprotective, vasodilatory effects and anti-carcinogenic (Jeffery and Keck, 2008; Manach *et al.*, 2005; Middleton *et al.*, 2000).

Phenolic compounds have been associated with the health benefits derived from consuming high levels of fruits, vegetables and beverages such as tea and cocoa. The favourable effects derived from phenolic compounds consumed with foods have been most often attributed to their antioxidant activity (Scalbert *et al.*, 2005). Therefore when plant foods are consumed, these phytochemicals contribute to the intake of natural antioxidants and consequently to health benefits associated with the protection against oxidation.

Like herbal medicines, the extracts of different parts of forest trees contain a variety of compounds, some of which are bioactive molecules. These bioactive substances are available to solvent extraction since they are present in porous structure of wood in form of free molecules which means that they are not chemically bonded to the polymers of the cell walls, the structural wood components: cellulose, hemicelluloses and lignins. They are rather associated to these structural polymers through low-energy intermolecular interactions, or simply deposited in the cell lumens or other types of cavities. Being freely positioned in the porous system of lignocellulosic materials these molecules can be

solubilised by different solvents according to their physico-chemical characteristics. They are collectively named the extractives to refer to their common solubility in different solvent systems, but in fact they comprise a vast multitude of chemical structures. We shall be focusing in this review on polyphenols as ubiquitous plants constituents and important for human diet, as they are common components of many vegetables, fruits and other healthy diets and are of considerable interest due to their bioactive properties.

We shall pay particular attention to those phenols, which have been so rightly named “the woody phenols” by Bate-Smith (Bate-Smith, 1962), which are common constituents of all vascular plants, among which the forest trees occupy central place. These phenols make difference between “woody” and “non woody” plants. The polyphenols which are found in vascular plants (characterised by lignified cell walls), such as ferns, gymnosperms and angiosperms (both monocotyledons and dicotyledons), are not found in mosses, algae, lichens and fungi which do not form vascular tissues. We want to make case in this review that the same bioactive polyphenols to which the health benefits of the diets rich in fruits and vegetables are attributed, are available from forest trees and consequently from the residues of industrial wood transformation. The deposition of lignins in cell walls is the fundamental feature of vascular plants, which enabled the development of land plants among which the forest trees. There are numerous structural analogies between the lignins and those “woody phenolics” as Bate-Smith has remarked, which can be explained, at least in part, by the sharing of the common phenylpropanoid biosynthetic pathway between lignins and the “extractable” woody polyphenols. Bate Smith has noted that three types of polyphenols are dominant in the leaves of vascular plants, the biosynthesis of which is closely related to the development of their vascular system. These three types of omnipresent polyphenols in the leaves of vascular plants are the proanthocyanidins (or condensed tannins, the polymers based on flavan-3-ols), the derivatives of hydroxycinnamic acids: p-coumaric, caffeic, ferulic and sinapic (such as glycosides, esters and amides) and the glycosides of one class of flavonoids, the flavonols (we may quote kaempferol, quercetin, and myricetin, in order of increasing hydroxylation of their B-rings). The three classes focused by Bate-Smith make incidentally part of those classes of polyphenols that are common constituents of fruits and vegetables which are often related to beneficiary effects on human health.

Incidentally, the biosynthesis of all three cited classes of polyphenols is directly linked to that of the lignins. The part of phenylpropanoid biosynthetic pathway is shared not only between lignin and flavonoids (therefore also by flavonols as one of the above identified flavonoid classes) but also with the proanthocyanidins (condensed tannins) as presented in Figure 48. The quinone methides are important intermediates for the biosynthesis of lignins and proanthocyanidins (condensed tannins), two major classes of plant polymer polyphenols and both have important antioxidant properties.

The hydroxycinnamic acids are directly involved in the biosynthesis of lignin in the sense that monomeric precursors, the derivatives of cinnamic alcohols, p-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols are derived from them and also because these acids are directly incorporated in some lignins (Croteau *et al.*, 2000).

We shall describe the bioactive properties of the selected classes of polyphenols indicating their major plant sources, starting with those which make part of healthy diets (fruits, vegetables, teas, cocoa, wines, etc.) and completing the information by identifying forest trees sources rich in the same molecules. The bioactivities of polyphenols are most often linked to their antioxidant properties since oxidative stress is related to many degenerative illnesses and processes such as cardiovascular, cancer, Alzheimer and aging process itself. The antioxidant capacities of plant extracts shall be reviewed and completed with the examples of the results obtained on the wood extracts in our and other laboratories. We will conclude our review with the examples of application of forest-derived phenolics in treatment and prevention of cardiovascular and Alzheimer diseases as well as of process of aging and cancer.



## **Classification of dietary polyphenols and their occurrence in forest trees**

Structurally, phenolic compounds comprise an aromatic ring, bearing one or more hydroxyl substituents, and they range from simple molecules to highly complex polymerised compounds, such as lignins, the most abundant polyphenols in nature. Despite this structural diversity, this group of compounds is often referred to simply as polyphenols. Though their structural diversity results in the wide array of phenolic compounds that occur in nature, polyphenols can basically be categorised into several classes among which phenolic acids (derivatives of benzoic and cinnamic acids), flavonoids and tannins (proanthocyanidins) are the main dietary polyphenols. All mentioned classes happen to fall into the category of “woody phenolics” of vascular plants, as shall be described further. Since the plant polyphenols present in foods are often classified as flavonoids and flavonoid-related compounds and non flavonoids, we shall also follow that classification.

The flavonoids are the derivatives of phenylpropanoid metabolism. Their structures are based on C6-C3-C6 skeletons, the A ring of the flavonoid structure being acetate-derived (3 x C2) and the C and B rings originating from cinnamic acid derivatives (phenylpropanoid pathway). The flavonoids constitute an enormous class of natural polyphenols with more than 6000 (Schijlen *et al.*, 2004) different compounds identified so far, belonging to anthocyanidins (more commonly present in form of anthocyanins, their glycoside derivatives), flavones and flavonols (and their glycosides), flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidins) and to polymeric proanthocyanidins. Closely structurally related to flavonoids are iso-flavonoids which differ from the flavonoids by the position at which their B-rings are substituted to heterocyclic chroman (C) ring: isoflavonoids are substituted at C-3 whereas for the flavonoid it is the C-2 position. Isoflavonoids are common constituents of numerous members of Fabaceae (Leguminosae) family and their important food source are for example soya beans and products. Recent studies have demonstrated an interesting antioxidant potential of isoflavones versus corresponding flavones which has been related to the subtle structural differences between the studied structurally closely related molecules (isomers) (Han *et al.*, 2009). The interactions of selected flavonoids and iso-flavonoids with membranes have been proposed to determine their efficiency in preventing lipid oxidation and consequently

their antioxidant capacity (Erlejman *et al.*, 2004). An interesting hypothesis has been proposed recently (Wiseman, 2006) that chemotherapy of bowel cancer, a frequent consequence of Crohn's disease (inflammatory bowel syndrome), caused by gut exposure to harmful reactive oxygen species (ROS), could give better results if supplemented by daily intake *per or* of isoflavonoids from soya (or other bioflavonoids).

### **Non flavonoid dietary constituents and their wood sources**

The compounds based on C6-C3 (phenyl propanoid polyphenols) represent another important class of non-flavonoids, and these compounds are directly linked to lignin (polymer phenyl propanoid) biosynthesis in vascular plants. The most important examples are cinnamic acids and their derivatives such as chlorogenic acid, p-coumaric, ferulic and sinapic acids, already mentioned in the context of "woody" phenolics. The C6-C3 dimers, based on two phenylpropane units (2 x C6-C3), are the lignans, common constituents of several fruits and vegetables, but much more important as wood constituents of many forest trees, particularly abundant in knotwood. They are closely related to the biosynthesis of lignins and are also issued from the phenylpropanoid biosynthetic pathway. Important natural products are various coumarins which are derivatives of o-cinnamic acid, also based on C6-C3 skeleton. Another class of non-flavonoid polyphenols which are less frequently found in diets (except for the grapes and peanuts) are the stilbenes (resveratrol in grapes and pomegranate) with C6-C2-C6 skeletons. Stilbenes are however quite important constituents of several forest trees and are principally found in conifer bark and heartwood of tropical hardwoods and some temperate zone conifers and are also issued from phenylpropanoid biosynthesis (Figure 48).

#### *Compounds with C6-C1 skeletons and hydrolysable tannins*

The non-flavonoids most commonly present in plants are represented by simple phenols, such as C6-C1 compounds and their derivatives. The hydroxybenzoic acid derivatives are the examples of such phenolics: protocatechuic acid, gallic acid and its dimers, which are components of hydrolysable tannins, common constituents of berry fruits: raspberries, strawberries, black current and blackberries, as well as of nuts such as walnuts and hazelnuts (Clifford and Scalbert, 2000).



The hydrolysable tannins share the common properties with the condensed tannins (proanthocyanidins) such as fairly good water solubility, high molecular mass and capacity to precipitate the proteins (property identified as tanning quality), which explains their astringency. Unlike the majority of the plant phenolics which are issued from phenylpropanoid biosynthetic pathway, the hydrolysable tannins are generated through alternative pathways. The hydrolysable tannins are the copolymers (esters) of sugars and phenolic acids derived from shikimic acid, gallic acid and its dimer hexahydroxydiphenic acid, which is upon hydrolysis recovered in lactone form known as ellagic acid. The hydrolysis products serve to classify hydrolysable tannins as gallotannins and ellagitannins.

An interesting study has been performed on wood of carob tree, *Ceratonia siliqua* L. (family Leguminosae) which is the forest tree mainly exploited for its comestible beans or pods. It is an evergreen tree that grows naturally in dry regions of the Mediterranean basin and its pod is more important than the wood since export of carob pods has a significant value for Turkish forestry, for example (Balaban, 2004). The studies on tannin content and nutritional value of carob pods have demonstrated that carob pod meal is constituted primarily of carbohydrates and proteins, containing also both condensed and hydrolysable (gallo-ellagic type) tannins (Avallone *et al.*, 1997), whilst the analyses of carob tree heartwood and sapwood has demonstrated the gallotannins as dominant form of hydrolysable tannins. The composition of the hydrolysable tannins present in carob heartwood is quite different from that of hydrolysable tannins of oak and eucalyptus woods which are rich in ellagitannins (Cadahia *et al.*, 1997). In hydrolysable tannins of carob tree wood gallic acid is associated with methyl inositol and glucose, the ellagic acid being detected in very small amounts (Balaban, 2004). Beside the high concentration of gallotannin, carob heartwood is characterized by quite high concentration of condensed tannins, which exceeds even the concentration of condensed tannins in the bark of some *Quercus* species. This could also explain the higher total phenol content of carob wood in comparison to oak and eucalyptus woods (Balaban, 2004).

Hydrolysable tannins of ellagic type are common constituents of oak and eucalyptus heartwoods. If there is one evident example of consumption of wood polyphenols, it is the case of wines aged in oak wood barrels. Wine ageing in oak barrels is traditionally

employed in wine production as an indispensable step for the elaboration of high quality wines. This process involves the alcohol extraction of certain oak wood constituents and their interaction with the flavonoid constituents of grapes already present in young wine. There is a huge body of documentation about how the storage of wines in oak barrels enhances their aromatic profile and flavour, the red wines acquiring additional benefits from stabilisation of their colour during storage in oak barrels (Karathanos *et al.*, 2008; Garde-Cerdan and Ancin-Azpilicueta, 2006). There have been claims that red wine consumption (in moderation!) in Southern European countries and in France in particular (“French paradox”) may be associated with lower incidence of coronary heart disease and may also protect against certain cancers, despite the fact that the Mediterranean diet is rich in saturated fats. Red wine is a major dietary source of resveratrol (originating from grapes), and this stilbene along with other red wine phenols, has been suggested to contribute to the protective effects through various mechanisms (Cassidy *et al.*, 2000).

The tannins contained in red wines determine their taste and color properties. Even if the primary sources of tannins in wine are grape seeds and skins which contain proanthocyanidins or condensed tannins, the ellagitannins from oak heartwood used in barrel aging contribute also largely to the health benefits related to red wine consumption (Chatonnet and Dubourdieu, 1998). The ellagitannins from oak wood are derived from galloyl units esterified to a sugar core, containing also a C-glycosidic bond (Wiseman, 2006; Nonaka *et al.*, 1990). (-)-Vescalagin and (-)-castalagin are found in heartwood of oak species used to manufacture the barrels in Europe. Castalagin, vescalagin, grandinin and five roburins have been identified as the major constituents of oak woods (Glabasnia and Hofmann, 2007; Glabasnia and Hofmann, 2006; Cadahia *et al.*, 2001) used to manufacture the barrels in Europe: pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.). The influence of these ellagitanins on growth of human colon cancer has been examined recently (Fridrich *et al.*, 2008).

To these preventive effects of hydrolysable tannins yet another pharmacological related to anticancer efficiency of the products found in aged wines has been added. These products are the result of nucleophilic reactions between the flavanols originating from grapes and hydrolysable tannins from oak wood in alcoholic medium that has been the focus of studies

by Quideau and collaborators in the recent years (Quideau *et al.*, 2003; Quideau *et al.*, 2004; Quideau *et al.*, 2005). Four flavano-ellagitannins, including two novel molecules have been hemi-synthesised: acutissimin A and epiacutissimin A (3-OH  $\beta$ - and  $\alpha$ - epimers) and acutissimin B and epiacutissimin B (3-OH  $\beta$ - and  $\alpha$ -epimers), which result from a nucleophilic substitution reaction between (-)-vescalagin and (+)-catechin or (-)-epicatechin. The same type of chemical reaction leads to the formation of the derivative of (-)-vescalagin and ethanol, the vescalene which was demonstrated to be a potent inhibitor of DNA decatenation *in vitro*.

Yet another role of hydrolysable tannins has been revealed in relation to the protection of unsaturated fatty acids against oxidation in nuts. Unlike unsaturated fatty acids in many other nuts, which are susceptible to oxidation leading to quality deterioration, walnut oils in the seed are stable against oxidation (Fukuda *et al.*, 2003). Interestingly, the content of  $\alpha$ -tocopherol, an antioxidant, is even lower in walnuts than in other nuts, such as almonds, hazelnuts, or peanuts. The separation of antioxidants from walnut kernel pellicles led to the identification of ellagic hydrolysable tannins as the major polyphenols, along with other polyphenols which are most probably responsible for the protection of the fatty acids from oxidation in walnuts (Ito *et al.*, 2007). The hepatoprotective effect of an extract of walnut pellicle polyphenols using an acute hepatitis model has been studied recently (Shimoda *et al.*, 2008). It is remarkable that the walnuts are the fruits of a tree species *Juglans nigra*.

#### *Cinnamic acid derivatives*

There are many dietary sources of hydroxycinnamic acids: caffeic, ferulic, sinapic and their derivatives, such as chlorogenic acid (which should be preferably named quinic acid derivative). For caffeic acid the good sources are coffee beverage, blueberries, apples, ciders; for p-coumaric acid: spinach, sugar beet, cereal brans; for ferulic acid: coffee, citrus juices, sugar beet, cereal brans; for sinapic acid broccoli, kale and other leafy brassicas and citrus juices; for quinic acid derivatives: for caffeoylquinic acids (chlorogenic acid) good sources are coffee beverage, blueberries, apples, ciders; for p-coumaroylquinic acids the good dietary sources are sweet cherries while for feruloylquinic acids the good source is coffee (Clifford, 2000).

The hydroxycinnamic acids and their derivatives are present in various parts of forest trees as they are direct precursors of the monolignols implicated in lignin biosynthesis. The cork part of bark is particularly rich source of cinnamic acids as it contains suberin, which is consisted of aliphatic and polyphenolic domains (Freire *et al.*, 2002). The monomeric composition of suberin extracts was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) after gradual alkaline methanolysis of *Quercus suber* cork Lopes *et al.*, 2000. The obtained results indicate that 1-alkanols and alkanolic and  $\alpha, \omega$ -alkanedioic acids are preferentially removed upon mild alkaline conditions, whereas mid-chain-modified  $\omega$ -hydroxyalkanoic acids are preferentially removed under stronger alkaline conditions. Saturated  $\omega$ -hydroxyalkanoic acids were found to be abundant in all suberin extracts and the most important aromatic constituent of suberin was determined to be the ferulic acid (both *cis* and *trans* isomers). The chemical composition of suberin in cork from *Quercus suber* L. was studied on virgin and reproduction cork (Bento *et al.*, 2001). The average chemical monomeric composition of suberin on virgin and reproduction cork were determined to be comparable for alkanolic acids (5.1% versus 3.3%) for  $\alpha, \omega$ -diacids (11.2% vs 10.1%),  $\omega$ -hydroxyacids (45.0 vs 48.1%), alkanols (1.9 vs 1.8%), 9,10-epoxy-18-hydroxyoctadecanoic acid (5.9 vs 5.8%), 9,10-epoxyoctadecanodioic acid (4.8 vs 3.6%), 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid (7.5% vs 10.4%), 9,10-dihydroxyoctadecanedioic (6.1 vs 6.8%), ferulic acid (5.8 vs 4.5%) and glycerol (4.3% for both). In general, larger variability was found for the suberin monomers from virgin cork. Suberized cells are generally found in underground plant parts (e.g., epidermis, endodermis, exodermis, root phellem, and tuber phellem) as well as in bundle sheath cells and the phellem (cork) of aboveground tissues of woody species that undergo secondary thickening, and is particularly well studied in cork oak *Quercus suber* and Douglas fir *Pseudotsuga mensiesii* (Bernards, 2002). The phenolic precursors to the polyphenolic domain of suberin are represented by a significant amount of hydroxycinnamic acids and their derivatives, among which ferulic acid and feruloyltyramine and cinnamic alcohols derivatives.

The conifers' and angiosperms' defence responses to mechanical injuries or pathogen invasions include, among other phenomena, stronger lignification of cell walls and higher accumulation of phenolics issued from the phenylpropanoid pathway (Kusumoto, 2005)

which comprise both cinnamic acids and stilbenes derivatives (Bonello *et al.*, 2003), as well as the increased activities of the enzymes for the phenylpropanoid pathway after the inoculation of pathogens (Bucciarelli *et al.*, 1998). An interesting parallelism has been revealed in regard of cinnamic acids linked to lignin in form of terminal units in different types of agricultural wastes: cereal straws, maize stems and oil palm fibre compared to fast growing poplar wood. Lignins in all of these plants contain cinnamic acids linked through ester or ether bonds, therefore in that respect cinnamic acids could be regarded as monolignols which act as bridges between the polysaccharides and lignins (Suni *et al.*, 2001). Ferulic and *p*-coumaric acids were determined to be the dominant hydroxycinnamic acids released by alkaline hydrolysis from the straws of rye, rice, wheat straw, maize stems, barley, oil palm fibre and fast-growing poplar wood (in decreasing order of quantities released). The higher proportions of covalently bound ferulic and *p*-coumaric acids are found mainly in *Gramineae* cell walls such as cereal straws and stems. The cell walls of graminaceous monocots typically contain larger amounts of hydroxycinnamic acids than dicotyledons (such as woods), and *p*-coumaric acid tends to be the main hydroxycinnamic acid in the stems/stalks of cereals, whereas the cereal bran is enriched in ferulic acid (Iiyama *et al.*, 1990). The position of poplars in this context is very interesting as their lignins contain *p*-hydroxy benzoic acid as terminal units, linked mainly through ester bond. The cereal straw lignins were also found to contain the residues of *p*-hydroxy benzoic acid (Suni *et al.*, 2001). We have identified caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) in the dichloromethane extracts of yellow birch wood (Lavoie and Stevanovic, 2006).

### *Stilbenes*

Stilbenes are 1,2-diarylethenes, the A ring usually having two hydroxyl groups in the *m*-position, while B ring is substituted by hydroxy and methoxy groups in the *o*-, *m*- and/or *p*-position. The biosynthesis of stilbenes is related to the phenylpropanoid biosynthetic pathway (Figure 48), the substitution pattern of B-rings reflecting that of the cinnamic acids the stilbenes are derived from. Stilbenes occur in many vascular plants: *Dipterocarpaceae*, a family of dicotyledonous angiosperms, mainly lowland rainforest tropical trees, important for timber production (the name of the family coming from the name of its type genus: *Dipterocarpus*, derived from Greek: di: two; pteros: wing; and karpos: fruits: two-winged

fruit); *Cyperaceae*, a family of monocot angiosperms, of which *Cyperus papyrus* served for writing material production in Ancient Egypt; *Gnetaceae* (a family of tropical gymnosperms, with a sole genus *Gnetum*, the species growing in Africa and Asia (often in form of woody vines); *Pinaceae*, an important gymnosperm family consisting of 11 genera of which *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*, *Larix* and *Cedrus* comprise important forest trees for timber production; *Leguminosae* or *Fabaceae*, the third largest family of flowering plants, which includes many agricultural plants, such as peas *Pisum sativum*, beans *Phaseolus* spp., soya bean *Glycine max*, and important forest trees belonging to genus *Acacia*, among 730 genera and almost 2000 species of *Fabaceae* (*Leguminosae*); *Myrtaceae*, a family of dicotyledonous plants which includes the woody shrubs and trees, such as different species of genus *Eucalyptus*, native fast-growing species of Australia, planted on Iberian peninsula and in Chile and Brazil for paper production; or the *Myrtus*, a genus of species of flowering plants native to southern Europe and north Africa, growing in form of shrubs or small trees, with leaves and white flowers containing fragrant essential oil; the Cloves (*Syzygium aromaticum*) is also an important member of this family, used as spice, its active constituent being a phenylpropanoid eugenol; *Moraceae* (mulberry or fig family); *Fagaceae* (the beech family, comprises important forest trees genera *Quercus* different oak trees, *Fagus* beech, *Castanea* chestnuts); *Liliaceae* (monocotyledonous ornamental plants with lily-shaped flowers) and *Vitaceae* (the most important genus which contains many grape species *Vitis* spp. containing resveratrol). Some of industrially important woods are produced by the forest trees belonging to the cited families, as indicated. The parts of the vascular plants which most commonly contain stilbenes are the roots, barks, rhizomes and leaves.

The stilbenes are more often found in forest trees than in plants that are routinely consumed for food (Cassidy *et al.*, 2000; Hovelstad *et al.*, 2006). The common food sources of stilbenes are grapes including their transformation products juices and wines, as well as peanuts (from the *Leguminosae* family) and their transformation products peanut butter and oil. The plant used in traditional Chinese medicine for the treatment of several diseases, *Veratrum formosanum* (family of *Liliaceae*) contains resveratrol as an active principle (Chung *et al.*, 1992). Resveratrol glucoside piceid has been identified as *Picea abies* bark constituent, along with stilbene aglycons resveratrol, astringin and isohapontin, while

pinosylvin, pinosylvin monomethyl ether and other pinosylvin derivatives were determined in the knotwood extracts of various pines: *Pinus strobus*, *P. banksiana* and *P. sylvestris* (Pietarinen *et al.*, 2006a). Particularly high amount of stilbenes has been determined in knotwood of *Pinus sibirica* for about 46% of total hydrophilic extracts (Willfor *et al.*, 2003a). Among the knotwood extracts from different members of softwoods genera (*Abies*, *Pseudotsuga*, *Thuja*, *Picea*, *Larix*), only members of *Pinus* were determined to contain the stilbenes, which are otherwise regular constituents of pine heartwoods (Willfor *et al.*, 2003a). Pinosylvins have been determined to be potent antibacterial and antifungal agents and the hydrophilic extracts from knotwood of several pines, rich in stilbenes, proved to be efficient antibacterial agents when tested against three species of paper mill bacteria (Lindberg *et al.*, 2004). A recent research has demonstrated that the resveratrol derivatives are responsible for the exceptional natural durability of tropical hardwood tatajuba (*Bagassa guaianensis*), family of *Moraceae*. The *trans*-oxyresveratrol was determined to be the major tatajuba heartwood extract constituent. The antimicrobial, anti-inflammatory and anti-cancer properties of this resveratrol derivative have been documented in the literature and it has also been isolated from other species belonging to the *Moraceae* family (Royer, 2008).

### *Lignans*

Lignans are common constituents of linseed (flax), lentils, garlic, asparagus, carrots, green beans, rye, pears and prunes. The variation of the incidence of various cardiovascular diseases, osteoporosis, menopausal symptoms, breast and prostate cancers, observed in different geographical regions, has stimulated interest in the role of the polyphenols present in diet in disease prevention. In Asia, where urine and plasma levels of iso-flavones are high, the cancers are comparatively rare (Cassidy *et al.*, 2000; Adlercreutz, 2002).

Since the structures of isoflavones, stilbenes and lignans are similar to the estrogen 17 $\beta$ -estradiol, they may exhibit selective estrogens' receptor modulating activities and are therefore named phytoestrogens. Phytoestrogens have been associated with the preventive effects against various cancers. The relation between the consumption of phytoestrogen-rich foods such as whole grain products, which contain lignans, and the prevention of breast, prostate, and colon cancers has been proposed (Cassidy *et al.*, 2000). Phytoestrogens

are also defined as polyphenolic non-steroidal plant compounds with estrogen-like biological activity which include the lignans (Cos *et al.*, 2003).

Closely related to lignins, the lignans occur in form of dimers or higher oligomers. Widespread throughout the plant kingdom, lignans are attributed roles in defence against various pathogens or as antioxidants found in flowers, seeds, seed coats, stems, nuts, bark, wood, leaves, and roots of various plants. Lignans are found in ferns, gymnosperms and angiosperms. Sesame seed has been an important oilseed since ancient times. It contains 25% protein and 50% oil. Some of many health promoting effects of sesame seeds have been attributed to lignans they contain: sesamin, sesamol, sesaminol and sesamolol. Both lignan aglycones and lignan glucosides are found in sesame oil. Sesamin, the major sesame oil lignan, is known to reduce plasma cholesterol and to increase plasma  $\gamma$ -tocopherol in humans (Croteau *et al.*, 2000).

The lignan formation biochemistry has only recently begun to be explained. The main research focus has been on generation of the most common  $\beta$ - $\beta'$ -linked lignan dimers. The lignans are formed by a strict stereoselective coupling of two monolignols, most often two coniferyl alcohol molecules. The first demonstrated example of stereoselective control of phenolic coupling was the *in vitro* synthesis of (+)-pinoresinol. The overall reaction, discovered in *Forsythia* species, consists of a laccase or laccase-like enzyme catalyzed one-electron oxidation which leads to the formation of the corresponding free radical (so far similar to the biosynthesis of lignin) and then a dirigent protein (from Latin: *dirigere*, to guide or align) orients the presumed free radical substrates in such a way that random coupling cannot occur; only the formation of the  $\beta$ - $\beta'$ -coupled intermediate, (+)-pinoresinol, is permitted. The particular antipode (optical form) of pinoresinol thus formed varies with the plant species: flax seeds *Linum usitatissimum* accumulate (-)-pinoresinol, while *Forsythia* species accumulate (+)-pinoresinol (Davin and Lewis, 2000; Davin *et al.*, 1997; Gang *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 1999).

The gene encoding the *Forsythia* dirigent protein has been cloned and the functional recombinant protein expressed. It is not homologous to any other protein. Given the existence of lignans linked by way of other distinct bonding modes and the increasing



number of homologous genes and expressed sequence tags found in different species which synthesise lignans, one can presume that the dirigent proteins represents a new class of proteins. Lewis and Davin (Lewis *et al.*, 1999) were first to describe the involvement of dirigent proteins in lignan formation and they also postulated certain involvement of these proteins in lignin and suberin biosynthesis which are regarded by classical theory as random polymers. Interestingly, immunochemical studies have demonstrated that initiation of lignin biosynthesis is both temporally and spatially associated with the secretion of distinct proteins from the Golgi apparatus, including some that are proline-rich, and their deposition into the cell wall. Lewis and Davin (Lewis *et al.*, 1999) postulate that these or related polypeptides, including some proline-rich proteins, may participate the lignification and may be related to the dirigent proteins which have been identified in lignan biosynthesis. Indeed, dirigent sites have been detected in regions where lignification is initiated. Thus, lignin biopolymer assembly may be associated with dirigent protein control in form of a proteinaceous template (Davin and Lewis, 2000; Davin *et al.*, 1997; Gang *et al.*, 1999).

Depending on the plant source in which it is initially formed, pinoresinol can then undergo a variety of conversions (Figure 49). This primary lignan is converted to the multiplicity of lignans in the plant kingdom by ring cleavage and ring formation reactions as well as through further substitutions. Aryltetralin lignans like podophyllotoxin and related compounds are of special medicinal interest. They have antiviral and cytotoxic properties (Bohlin and Rosen, 1996; Damayanthi and Lown, 1998; Imbert, 1998).

Podophyllotoxin has been isolated from rhizomes of *Podophyllum* species (*Podophyllaceae*) which were collected from wild habitats. Therefore, some *Podophyllum* species, such as *P. hexandrum* from the Himalayas are regarded as endangered species. Chemical synthesis of aryltetralin lignans is possible but complicated. In the aim to find the alternative biotechnological sources for podophyllotoxin and related compounds, the plant cell cultures of different *Linum* species have been studied and shown to accumulate substantial amounts of cytotoxic lignans, mainly podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin. Although the lignan levels might not be sufficient to use these cell cultures as biotechnological production systems, these cell cultures have proved to be

useful experimental systems for the elucidation of the biosynthetic pathways leading to various lignans (Kuhlmann *et al.*, 2002).

Initially formed pinoresinol can further be enantiospecifically transformed into lariciresinol and secoisolariciresinol, which are converted by dehydrogenation into matairesinol (Figure 49). In effect, lariciresinol and secolariciresinol have been identified as major lignans in knotwood from several fir species, as well as in pine knotwood (Willfor *et al.*, 2003a). Matairesinol is also the presumed precursor of plicatic acid and its analogs in western red cedar (*Thuja plicata*), as well as of podophyllotoxin in the Indian plant (*Podophyllum hexandrum*), also known as Himalayan May apple, as well as in North American May apple (*P. peltatum*). A buffer extraction of leaf blades of *P. peltatum* has been demonstrated to yield podophyllotoxin in amounts similar to the ethanol extraction of *P. hexandrum* rhizomes and roots. Leaf blades of *P. peltatum* store podophyllotoxin 4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and in the process of extraction by buffer, the glucopyranoside is converted into its aglycone and glucose. Being a rich source of podophyllotoxin, American May apple has been proposed a potential to become a sustainable crop (Moraes *et al.*, 2002).

Interestingly, pinoresinol/lariciresinol reductase, which converts pinoresinol into lariciresinol and secoisolariciresinol, shows considerable homology to the phytoalexin-forming isoflavonoid reductases, indicative perhaps of a common evolutionary line in plant defence for both the lignans and isoflavonoids (Croteau *et al.*, 2000). Therefore, the biosynthetic analogies could be in the basis of the functional analogies existing for phytoestrogens, isoflavonoids and lignans.

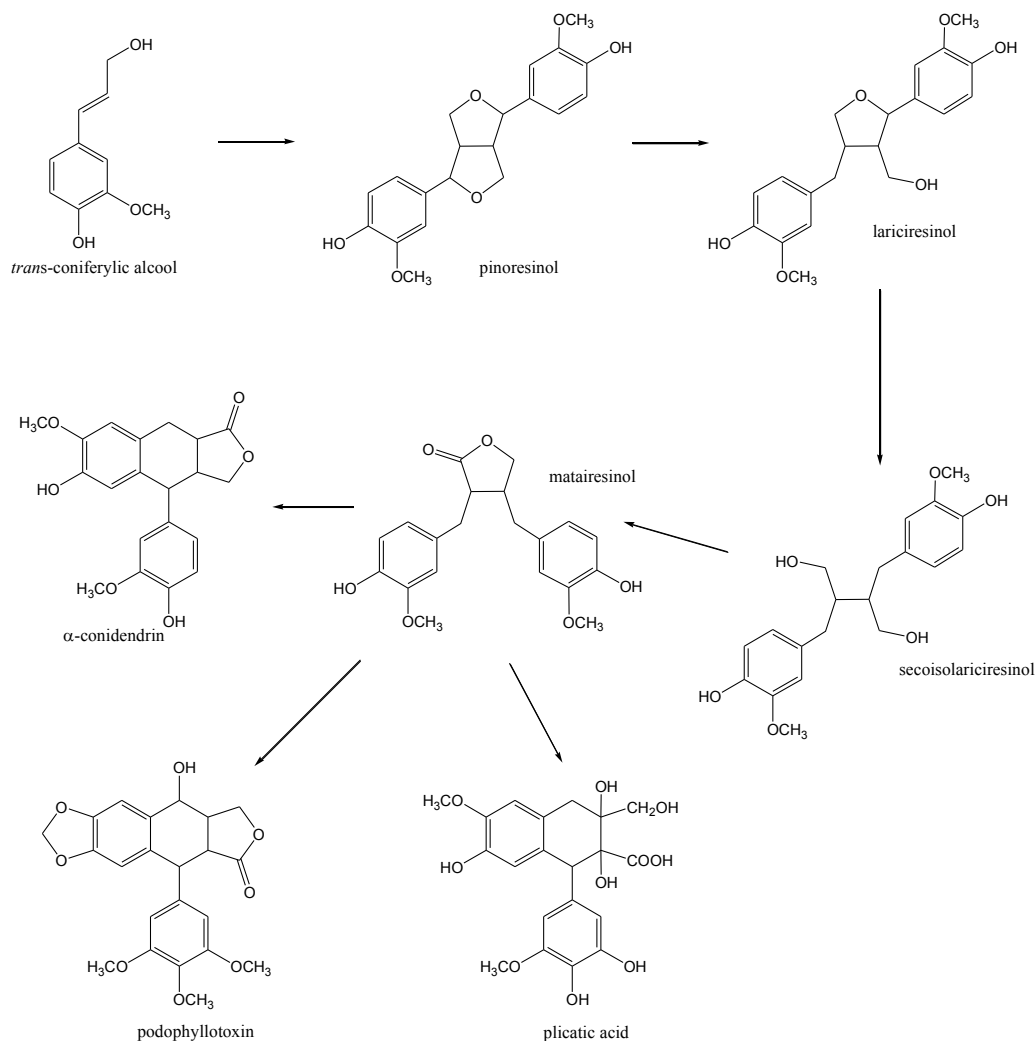


Figure 49 Biosynthetic pathways to different lignans

The Finnish study on bioactive molecules from industrially important forest trees has revealed significantly increased concentrations of lignans in knotwood as compared to the heartwood of various industrially important softwoods. The lignans seem to be particularly abundant in knotwood of softwoods, while the various flavonoids have been determined in knotwood from hardwoods. The concentrations of the phenolics identified in knotwood (the branch stubs encased in tree trunk) of *Picea abies* have been determined to be on average around 15% w.w<sup>-1</sup> and to be 50 to 100 times higher than in normal wood (Willfor *et al.*, 2003b; Willfor *et al.*, 2003c). Therefore these residues of wood transformation, regularly discarded by pulping industry could represent the new sources of bioactive molecules from forest biomass. Lignans and oligolignans (the products of condensation reaction between

the lignans) have been determined to be present in particularly high concentrations in knotwood from firs (*Abies balsamea* and *A. sibirica*, 33% of hydrophilic extract), from *Pseudotsuga menziesii* (45%) and from *Larix decidua* (40%), the hydrophilic extracts representing 10-20% of the dry wood (Willfor *et al.*, 2003a). Lignans are found in large amounts (6-24% w.w<sup>-1</sup>), in Finnish spruce knots. The 7-hydroxy derivative of matairesinol, the hydroxymatairesinol, is the major lignan found in heartwood and in particularly high concentration in knotwood of Norway spruce *Picea abies*, comprising 65-85% of all identified lignans (Willfor *et al.*, 2003a). A food supplement, under the trade name HMRlignan™, has been developed in Finland on the basis of hydroxymatairesinol extracted from Norway spruce *Picea abies* knotwood (Kangas *et al.*, 2002). A recent Finnish study has demonstrated that substantially higher concentrations of lignans are found in spruce knots (4-8 g/100 g) than in wheat (2.8 mg/100 g) or rye (1.0 mg/ 100 g) bran (Smeds *et al.*, 2007).

A study on lignans and stilbenes from Norway spruce (*Picea abies*) and pine from central Norway has confirmed the same principal lignan constituents as determined in Finnish study (Hovelstad *et al.*, 2006). Hydroxymatairesinol has been determined to constitute over 84% of all lignans in *Picea abies* knotwood (6.5% w.w<sup>-1</sup>), while sapwood contains only trace amounts of lignans. Hydroxymatairesinol has been used as a chiral source in the synthesis of derivatives with bioactive effects (Eklund *et al.*, 2002; Eklund *et al.*, 2003; Eklund and Sjöholm, 2003). A lignan isolated from *Juniperus communis* berries, (-)-desoxypodophyllotoxin, has not been found in wood of the same species (Sakar *et al.*, 2002). A standardized herbal mixture derived from Himalayan cedar *Cedrus deodara* bark comprising of three lignans (78% wikstromol, 11% matairesinol and 11% dibenzylbutyrolactol (w.w<sup>-1</sup>) was found to possess cytotoxic activity against several cancer cell lines and showed ability to induce tumour regression *in vivo*. The same lignans have been determined in Himalayan cedar wood (Sachin *et al.*, 2008).

### **Flavonoids and condensed tannins**

With more than 6000 different compounds described thus far (Schijlen *et al.*, 2004), the flavonoids constitute the most widespread class of polyphenols in nature. They are found in many plant tissues, in form of monomers, dimers, higher oligomers and polymers the latter

being represented by condensed tannins as the most common important class. The flavonoids are typically found as mixtures of coloured oligomers and polymeric components in various heartwoods and barks of forest trees.

Flavonoids and other plant phenolics, such as phenolic acids, stilbenes, tannins, lignans, and lignin, are especially common in leaves, flowering tissues, and woody parts such as stems and barks. They are important for normal growth, development and defence of plants against infection and injury. Flavonoids constituting plant colors are present in flowers, fruits, and leaves. They are generally present in form of glycosylated derivatives, although they also occur in form of inorganic sulphate or organic acid derivatives, malonylated derivatives as well as in form of free aglycons.

Flavonoids have a variety of functions in plants. The flower constituents, the anthocyanidins (the flavonoids bearing positive charge on oxygen in chromane C-ring, see Figure 50 for flavonoids relations) are responsible for colouration, which is related to the hydroxylation pattern of the B ring: its simple hydroxylation like in pelargonidin is responsible for deep orange colour as found in geraniums; the 3,4-dihydroxylation of the B-ring like in cyanidin is responsible for bright red like in roses and the 3,4,5-trihydroxylation like in delphinidin is in base of blue or mauve colouration of delphiniums. The common constituent of leaves, the kaempferol (5,7,4'-trihydroxy-flavonol) is attributed the protection against the UV-B. Flavonols, flavones and flavanols (frequently named catechins) constitute three of the major subclasses of the flavonoids, most widely distributed in plants.

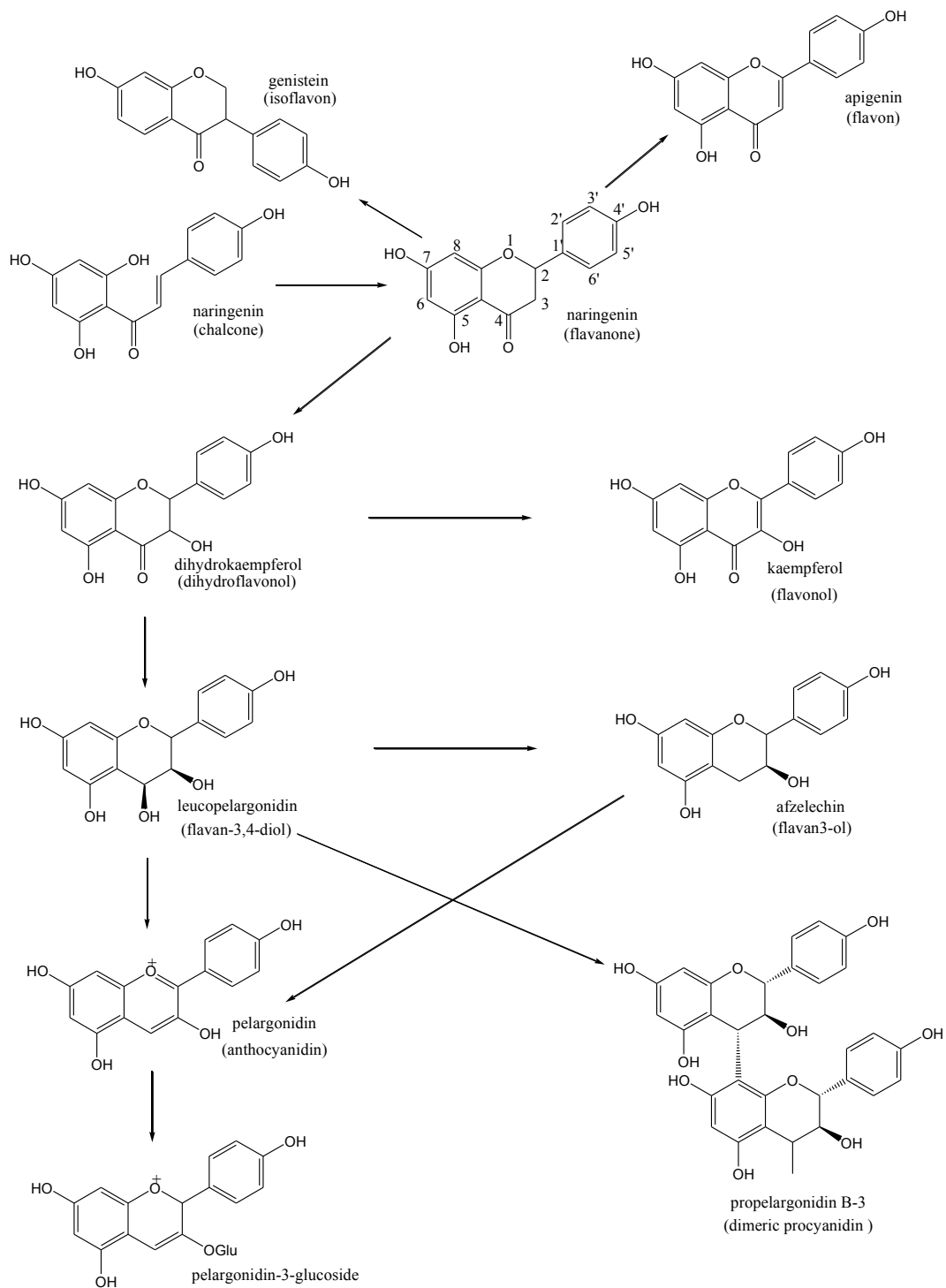


Figure 50 Relations between different classes of flavonoids

*Flavones, flavonols, flavanones, dihydroflavonols, chalcones*

The common diets based on vegetables and fruits are rich sources of flavonoids. The consumption of flavonols and flavones has been estimated to be between 20-22 mg/day in North America (US), whereas in Mediterranean (Italy) it is estimated to be 35 mg/day (Li and Levy-Milne, 2008). The most largely distributed flavonols in plants are quercetin (5,7,3',4'-tetrahydroxy flavon-3-ol), kaempferol (5,7,4'-trihydroxy-flavonol), myricetin (5,7,3',4',5'-pentahydroxy-flavonol) and isorhamnetin (5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxy-flavonol). The most abundant flavones in plants are luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) and apigenin (5,7,4'-trihydroxy flavone). The highest levels of flavonol quercetin (5,7,3',4'-tetrahydroxy-flavon-3-ol) levels are found in onions, kale, broccoli and beans, while flavonol kaempferol (5,7,4'-trihydroxy-flavon-3-ol) is only found in kale, endive, broccoli and leek, the general concentration of quercetin in vegetables ranging between 30 and 300 mg.kg<sup>-1</sup>. The quercetin content in most fruits is considerably lower than in vegetables except for apples, apricots and blackcurrants, which contain between 30-70 mg.kg<sup>-1</sup> of quercetin. The content of flavonol myricetin (5,7,3',4',5'-pentahydroxy-flavon-3-ol), luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxy-flavone) and apigenin (5,7,4'-trihydroxy-flavone) is generally below the limit of detection (about 1 mg. kg<sup>-1</sup>), except for beans, sweet red pepper and celery stalks which may contain up to 60 mg.kg<sup>-1</sup> of these flavonoids. Quercetin levels in red wine are somewhat higher than in fruit juices in which they are generally below 5mg.L<sup>-1</sup>. Various black tea infusions were determined to contain between 10 and 25mg.L<sup>-1</sup> of quercetin. Flavonols and flavones occur mainly as glycosides in fruit and vegetable foods, which does affect their bioavailability (Hollman and Arts, 2000).

However, only limited data on contents of individual glycosides are available, the majority of data concerning the aglycons. The sugar residues of glycosides are preferably bonded through -OH at the 3-position, less frequently at the 7-position, and only in rare cases at the 4', 3'- and 5- positions of the B and A rings of flavonols. Flavones occur mainly as 7-O-glycosides, but they are also reported to occur as C-glycosides (the sugar is directly attached to an aromatic carbon atom in that case), for which relatively few data are available. These types of glycosides are also determined in teas and cereals. D-Glucose is the most common glycone part of the glycosides, even though other sugar residues are often reported, such as D-galactose, L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose and D-apiose, as

well as the D-glucuronic acid. The sugars having D-configuration constitute the glycone part of  $\beta$ -glycosides, while those with L-configuration occur mainly as  $\alpha$ -glycosides. The major glycosides determined in onions are D-glucosides, more precisely quercétine-4'-glucoside and quercétine-3,4'-diglucoside (Hollman and Arts, 2000). Green beans contain mainly quercetin-3-O-glucuronide. The two main glycosides of quercetin and kaempferol in broccoli are quercetin-3-O-sophoroside (sophorose: 2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\alpha$ -D-glucopyranose) and kaempferol-3-O-sophoroside. The glycosides of quercetin determined in apple peel are: 3-O- $\alpha$ -L-arabinose, 3-O- $\beta$ -D-galactoside, 3-O- $\beta$ -D-glucoside,  $\alpha$ -L-rhamnoside and 3-O- $\beta$ -D-xyloside. As for the forest trees, the major sources of flavonol glycosides are the leaves. Different quercetin and kaempferol glycosides have been determined in leaves of birches (Bedgood *et al.*, 2005) while rutin, a glycoside of quercetin and disaccharide rutinose (6-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl-D-glucose) has been determined in important amounts in *Eucalyptus* spp. leaves (Conde *et al.*, 1997). Rutin, which can also be described as quercetin-3-rhamnoglucoside is a common constituent of a number of *Eucalyptus* spp. leaves. It has been extracted industrially from leaves of *E. macrorrhyncha* in 1960's in Australia. At the time (by the end of XIX century) when it was first isolated in form of yellow crystalline substance, rutin was suggested to be used as a dyestuff, such use of black oak *Quercus tinctoria* bark having already been established on the basis of its content of the quercitrin, the 3-rhamnoside of quercetin. However, it was for the pharmacological properties of rutin that its medicinal uses have been developed. Rutin has been reported to inhibit the action of hyaluronidase, particularly when combined with ascorbic acid (Humphreys, 1964). It has been attributed antioxidant, anticancerogenic, antithrombotic, and anti-inflammatory activities. It is present in many plants, such as tobacco leaves, birch and eucalyptus leaves the latter being the richest source among forest trees. The common food sources of rutin are buckwheat leaves, stems and seeds, the best buckwheat source of rutin being the *Fagopyrum tataricum*. The antiplatelet, antiviral and antihypertensive properties and the strengthening of blood vessels as well as the results on a dose-response effect of rutin in defending against low-density lipoprotein peroxidation, have inspired a study of the antioxidant mechanism of rutin *in vitro* (Yang *et al.*, 2008). Rutin is present in various other plants among which the caper berries (*Capparis spinosa*) native to the Mediterranean region which are usually consumed pickled. Rutin from



different parts of *Capparis spinosa* growing wild in Iran has been studied recently as a potential local source of rutin (Ramezani *et al.*, 2008).

The extracts of Hawthorn (*Crataegus* sp.), a large genus of shrubs and trees in the family *Rosaceae*, native to temperate regions of the Northern Hemisphere in Europe, Asia and North America, can be used for the treatment of declining cardiac performance, classified by the New York Heart Association (NYHA) as stages I and II (Svedstrom *et al.*, 2006). Dried flowering tops, flowers, leaves and fruits of *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* are most commonly used as crude drugs, other hawthorn species being less frequently used. A total of 20 flavone and 13 flavonol derivatives have been identified in *Crataegus*, among which three glycosides of quercetin: quercitrine (3-rhamnoside), hyperoside (3-galactoside of quercetin) and rutin (3-rutinoside), while the flavone derivatives appear as C-glycosides, among which the most important is vitexin containing the C-glucose at C-8 position of the flavonoid skeleton A-ring (Svedstrom *et al.*, 2006).

The major flavonoids present in knotwood of industrial wood species were determined to belong to dihydroflavonols (also named flavanon-ols) and dihydroflavons. Dihydromyricetin and dihydrokaempferol were found in knotwood from different *Populus* spp, along with taxifolin (dihydroquercetin, a dihydroflavonol) and flavonol kaempferol (Pietarinen *et al.*, 2006b). Dihydroflavones are the central intermediates in flavonoid biosynthesis (Figure 50). The flavones and flavonols are biosynthesized through the side branches of flavonoid biosynthesis (Schijlen *et al.*, 2004). The biosynthesis of flavonoids is initiated by the enzymatic step catalysed by chalcone synthase in which three malonyl-CoA units are stepwise condensed with p-coumaroyl-CoA to yield naringenin chalcone, which is rapidly isomerized in most of the plants to flavanone naringenin (Schijlen *et al.*, 2004), central intermediate in flavonoid biosynthesis, which explains its wide distribution in plants. In effect, the naringenin has been identified as a very important flavonoid constituent of the knotwood from different poplar species: *Populus grandidentata*, *P. tremula* and *P. tremuloides* (Pietarinen *et al.*, 2006b).

Naringenin is reported to have significant antimicrobial (both antifungal and antibacterial) activities, higher than kaempferol, quercetin or taxifolin. The biosynthesis of flavonoids seems to be triggered by the infection of the plant followed by the accumulation of

phenolics, which seems to occur soon after contamination. The accumulation of phenolics has been related to their modulating effect on the action of the phytohormone auxin IAA (indole-acetic acid) which may lead to tissue differentiation and to changes such as closure of vessels with tyloses which are blocking the pathways to the aggressive invaders (Treutter, 2005). In effect, the accumulation of phenolics in heartwood, reaction wood and knotwood is a well documented phenomenon in wood science. Naringenin, taxifolin and quercetin have also been determined as the major flavonoid constituents of bark, while quercetin was determined also in wood of *Eucalyptus globulus* (Conde *et al.*, 1995). The flavanone naringenin and its glucoside, naringenin-7-O- $\beta$ -glucoside, as well as the dihydroflavonols such as dihydrokaempferol, dihydrokaempferol-7-O- $\beta$ -glucoside and dihydroquercetin (taxifolin), along with flavonol kaempferol have been determined in knotwood of aspens. The knotwood of European aspen *Populus tremula* was determined to contain high concentrations of dihydrokaempferol and naringenin, their glucosides, followed by taxifolin and kaempferol (in decreasing order of concentration). The concentrations of dihydrokaempferol were determined to be 50-3000 times higher in knots (7.9-31 mg.g<sup>-1</sup> freeze dried wood) than in stemwood of European aspen (0.01-0.34 mg.g<sup>-1</sup> freeze dried wood) (Pietarinen *et al.*, 2006b). Dihydrokaempferol was dominant among the flavonoids determined in North American trembling aspen *P. tremuloides*, as it was in European *P. tremula*. The concentrations of dihydrokaempferol were determined to be 50–900 times higher in the knots (0.02-1.2 mg.g<sup>-1</sup> freeze dried wood) than in the stemwood of *P. tremuloides* (6.1-34 mg.g<sup>-1</sup> freeze dried wood). The glucoside of dihydrokaempferol was present both in stemwood and in living knotwood as confirmed by hydrolysis of the extracts. Naringenin, kaempferol, and taxifolin were also identified in the wood samples of *P. tremuloides*.

Living knots of *P. grandidentata* were determined to contain large amounts of glucosides. The enzymatic hydrolysis increased the flavonoid concentrations from 30 mg.g<sup>-1</sup> to 80 mg.g<sup>-1</sup>. Dihydrokaempferol dominated the aglycone flavonoids, as it was the case with *P. tremuloides* and *P. tremula*. The concentrations of naringenin, taxifolin and catechin determined in wood samples of *P. grandidentata* were higher than in the other aspen species studied in that research. It has also been demonstrated that the heartwood of *P. grandidentata* contained remarkably higher concentrations of flavonoids (30-80 mg.g<sup>-1</sup>

freeze dried wood), both before and after hydrolysis, than the sapwood (0.19-0.76 mg.g<sup>-1</sup> freeze dried wood), which was not determined for the other two aspen species, sapwood and heartwood of which contained comparable amounts of flavonoids (Pietarinen *et al.*, 2006b).

Heartwood, sapwood and knotwood of *Salix caprea* were reported to contain several flavonoids. The flavonoids determined in the studied tissues were naringenin, naringenin-enol, dihydrokaempferol, galocatechin, dihydroquercetin (taxifolin), dihydromyricetin, as well as a glycoside of dihydrokaempferol (Pohjamo *et al.*, 2003). The flavanone naringenin was determined in knotwood of *Salix caprea* as it had been determined in knotwood of *Populus* species discussed previously, all of the discussed species from genera *Populus* and *Salix* belonging to the same family *Salicaceae*. The 5-glucoside of naringenin has been determined in bark of many *Salix* species (Rowe, 1989).

Interestingly, important amounts of flavanone pinocembrin and dihydroflavonol pinobanksin have been determined in the knotwood of pines *Pinus banksiana* and *P. strobus*. These flavanons have a common characteristic that their B-rings are not hydroxylated at all. Incidentally, pinobanksin and pinocembrin have been determined along with chrysin, a flavone analog of pinocembrin, as the main flavonoid constituents of propolis (honey glue) originating from *Populus* spp. The bud exudates of *Populus* trees are considered to be the main sources for European and North American propolis to which many health benefits are attributed (Bankova *et al.*, 2002).

*Acacia confusa* Merr. (*Leguminosae* or *Fabaceae*) is traditionally used as a medicinal plant in Taiwan. In recent study 8 flavonoids, the majority of which had a characteristic 7, 8-hydroxylation pattern of the A-rings, already determined for other members of genus *Acacia*, have been isolated and purified from the ethanolic extract of *Acacia confusa* heartwood. The following flavonoids have been determined in the *Acacia confusa* heartwood extract: 7,8,3',4'-tetrahydroxy-4-methoxyflavan-3-ol (discussion below, flavanol group); 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavanone; melanoxetin (7,8,3',4'-tetrahydroxyflavonol); 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone; transilitin (3-O-methoxy derivative of flavonol melanoxetin); 3,4,2',3',4'-pentahydroxy-*trans*-chalcone (chalcone having the same pyrogallol hydroxylation pattern as the A-ring- 7,8-hydroxylated flavonoids) ; 3,7,8,3'-

tetrahydroxy-4'-methoxyflavone; 7,8,3'-trihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone; 7,3',4'-trihydroxyflavone; 7,3',4'-trihydroxy-3-methoxyflavone.

A remarkable feature of dominant flavonoids synthesised by the members of *Leguminosae* family, as exemplified by the discussed *Acacia* flavonoids is the absence of hydroxylation at C-5 position of A rings. The same pattern is found in proanthocyanidins of the species belonging to this family which are often designated as resorcinol type condensed tannins according to their hydroxylation pattern. The hydroxylation pattern of condensed tannins consisting of A-rings hydroxylated at 5 and 7 positions together with O- from chroman ring is designated phloroglucinol type of condensed tannins, which is the common pattern of bark pine condensed tannins (procyanidins).

#### *Flavanols and proanthocyanidins*

The flavanols constituting the most important catechins and procyanidins, catechin and epicatechin, have two chiral carbons, C-2 and C-3. So far, only flavanols with a 2R configuration have been found in nature. The most important flavanols occurring in nature are (+)-catechin (2R,3S-3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavan), (-)-epicatechin (2R,3R-3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavan), (+)-gallocatechin (2R,3S-3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavan) and (-)-epigallocatechin (2R,3R-3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavan) and the gallic acid esters: (-)-epicatechin gallate and (-)-epigallocatechin gallate. Catechins are the major constituents of teas, the aqueous infusions of the *Camelia sinensis* L. Epicatechin, epigallocatechin and epigallocatechin-3-gallate were determined in black and green tea and in oolong tea, but not the catechin. Black tea contains therefore mainly the gallates of epicatechin, linked through ester bond to 3-OH of C-ring of epicatechin, along with the epigallocatechin, which differs from epicatechin by the hydroxylation pattern of the B-ring (three hydroxyl groups, at 3', 4' and 5' positions). Because of high concentration of catechins in teas, tea waste has been proposed as their potential source. High concentrations of procyanidins and catechins are also found in chocolate (cocoa). The concentration of catechins in chocolate can be four times higher than in teas (Yilmaz, 2006). *Acacia catechu* was found to be a rich source for catechins which accumulate in both heartwood and leaves (Shen *et al.*, 2006). Catechin and epicatechin are the dominant secondary metabolites in catechu heartwood whereas gallate catechins (epicatechin-3-O-

gallate and epigallocatechin-3-*O*-gallate) are the major flavan-3-ols in leaves. Catechin (16–24 mg.g<sup>-1</sup> of oven-dried wood) was also determined as major polyphenol in the extracts of willow *Salix caprea* heartwood, sapwood and knotwood, with higher concentrations in the knots than in the stemwood (Pohjamo *et al.*, 2003). High concentration (about 240 mg.g<sup>-1</sup>) of catechins (catechin, epicatechin and galocatechin) has been determined in the monomeric polyphenol fraction of the *Pinus radiata* bark hot water extract (Ku and Mun, 2008).

Another subclass of flavanols are the flavan-3,4-diols (known also as leucoanthocyanidins) which have been identified as major flavonoids in *Acacia crassiocarpa* and *A. mangium*. Leucoanthocyanidins are defined as monomeric compounds which produce red-coloured anthocyanidins by cleavage of their C–O bond upon heating with mineral acid-butanol. Melacacidin (7,8,3',4'-tetrahydroxy-flavan-3,4-diol (2S,3R,4S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-chroman) and its 4-epimer isomelacacidin (2S,3R,4R)-2-(3,4-dihydroxyphenylchroman) have been determined as major flavonoids in the heartwood and knotwood of *Acacia crassiocarpa*, while the sapwood was determined to contain only melacacidin. Quercetin and dihydroquercetin (taxifolin) have been determined in all studied tissues, but in approximately 10 fold lower concentrations than the flavan-diols. The teracacidin (differing from the melacacidin only by the single hydroxylation of its B-ring, having the same configurations of carbons 2,3 and 4, could be therefore presented as 7,8,4'-trihydroxy-flavan-3,4-diol) and its oxidised derivative: keto-teracacidin (3,4',7,8-tetrahydroxyflavanone) have been determined as the major components of the hydrophilic extracts of heartwood and knotwood of *A. mangium*. They are also found in sapwood of the same species, however only in minor concentrations (Pietarinen *et al.*, 2005). Much higher concentrations of teracacidin (2.4-19 mg.g<sup>-1</sup> freeze dried wood) and keto-teracacidin (0.77-4.4 mg.g<sup>-1</sup> freeze dried wood) in heartwood and knots have been determined in *A. auriculiformis*, than in *A. mangium* (43 and 3.5 higher, respectively) and the better heart-rot resistance of the *A. auriculiformis* has been explained by the high concentration of teracacidin which has also been determined to be efficient against wood rotting fungi tested *in vitro* assays (Mihara *et al.*, 2005).

The catechins can also be regarded as monomers of polymeric proanthocyanidins, known also as condensed tannins. The catechins constitute the procyanidin condensed tannins, most commonly found in temperate zone conifer barks, but other types of proanthocyanidins are distributed in other plants. The profisetinidins, for example, represent a class of condensed tannins constituting commercial tannins Quebracho and Black Wattle tannins. The proanthocyanidins constitute one of the most ubiquitous groups of all plant phenolics, as already determined by Bate-Smith in 1960'. They are available from fruits, vegetables, nuts, seeds, flowers, heartwood and bark of forest trees. These polyphenols are becoming particularly interesting in the fields of nutrition, health and medicine, as a rapidly growing body of evidence is suggesting that the proanthocyanidins may act as potent antioxidants and/or are capable to modulate key biological pathways *in vivo* in mammals (Ferreira and Slade, 2002). They produce anthocyanidins (therefore their name proanthocyanidins) when heated under strongly acidic conditions in the presence of molecular oxygen, by cleavage of a C-C bond. Proanthocyanidins can be classified as oligomers (dimers to pentamers) and polymers (up to hexamers and higher, also well known as condensed tannins) according to number of flavan-3-ol monomer units. They can also be classified on the basis of their linkage characteristics. B-type proanthocyanidins, which represent the dominant class of proanthocyanidins, are biosynthesized by coupling electrophilic flavanyl unit at C(4) position of C-ring, which is presumably generated from a flavan-3,4-diol or a flavan-3-ol, most commonly to C(8) or C(6) (A-ring) of a nucleophilic flavanyl unit, e.g. a flavan-3-ol. They are categorised according to the hydroxylation patterns of the chain-extender units into: procyanidins (3,5,7,3',4'-pentahydroxylation), prodelphinidins (3,5,7,3',4',5'-hexahydroxylation), propelargonidins (3,5,7,4'-tetrahydroxylation), profisetinidins (3,7,3',4'-tetrahydroxylation), prorobinetidins (3,7,3',4',5'-pentahydroxylation), proteracacinidins (3,7,8,4'-tetrahydroxylation), promelacacinidins (3,7,8,3',4'-pentahydroxylation), procassinidins (7, 4'-dihydroxylation), probutinidins (7,3', 4'-trihydroxylation). However, the flavan-3-ol units can also be doubly linked by a C4 → C8 bond and an additional ether bond from O7 → C2, which is the bonding pattern of the A-type of proanthocyanidins (Porter *et al.*, 1991). Three new analogues of A-type proanthocyanidins with substantial activity against hyaluronidase have been isolated recently from the water-soluble fraction of peanut skins (Lou *et al.*, 1999).

Hyaluronidase activity increases in chronic inflammatory conditions, e.g. in inflammatory joint disease. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) fruit juice has been used traditionally for the treatment and prevention of urinary tract infections and it is one of the best known natural sources of A-type proanthocyanidins which are powerful antioxidants (Vinson *et al.*, 2008).

The procyanidins represent a dominant and most widespread class of naturally occurring proanthocyanidins. One of the most representative proanthocyanidins-rich extract from forest trees is the French maritime bark extract which has been developed in form of a polyphenol-rich food supplements sold under the names of Pycnogenol<sup>®</sup> and Oligopin<sup>®</sup>. These extracts are based primarily on complex mixtures of oligomeric and polymeric procyanidins, containing also monomeric flavanols catechin and epicatechin (Jerez *et al.*, 2006). These two flavanols are the main building blocks of a variety of condensed tannins belonging to procyanidin type such as found in conifer bark and grape extracts. The latter are known to have strong antiradical activity and therefore various beneficial effects on human health are related to grape extracts (Bagchi *et al.*, 2000). Catechin, epicatechin and their galloylated derivatives, along with their oligomers, have been identified in grape seeds, using various methodologies (Peng *et al.*, 2001, Yang and Chien, 2000). In contrast to grape seed extract which contains catechin gallate, the Pycnogenol<sup>®</sup> is exclusively composed of oligomers of two to seven units of catechin/epicatechin, linked together by C-4-C-8 and C-4-C-6 bonds classified as procyanidins B1, B3, B7, and others. Pycnogenol<sup>®</sup> or Oligopin<sup>®</sup> is exclusively prepared from the bark of the *P. maritima* (= *P. pinaster*) growing in the coastal region of Bay of Biscay in the Landes de Gascogne in France, where climatic conditions seem to significantly influence the properties of this species. Various efforts to cultivate the same species in other geographical areas have failed, indicating the uniqueness of the environmental conditions necessary for the growth of the French maritime pine from which the Pycnogenol<sup>®</sup> is extracted (Packer *et al.*, 1999).

Maritime pine bark extract was determined also to contain dihydroflavonol taxifolin, phenolic acids such as caffeic, ferulic, and *p*-hydroxybenzoic acid as minor constituents and glycosides, mainly glucopyranosyl derivatives of either flavanols or phenolic acids (Packer *et al.*, 1999). Many of these components are also found in common fruits and vegetables, as

well as in plant derived substances from grapes and berries and in beverages such as green and black tea and red wine, as discussed previously. Pycnogenol<sup>®</sup> is utilized throughout the world as a nutritional supplement and as a phytochemical remedy for various diseases ranging from chronic inflammation to circulatory dysfunction. The results of numerous studies performed on Pycnogenol<sup>®</sup> have consistently indicated that these procyanidin-flavonoid mixtures have tremendous antioxidant capacity as well as other bioactivities not directly associated with its free radical-scavenging activity, such as inhibition of enzyme activity and modulation of gene expression. Our recent study has demonstrated a very interesting potential of procyanidins-rich extract from black spruce *Picea mariana* bark extract (Diouf *et al.*, 2009). We have demonstrated that procyanidins from black spruce bark are composed mainly from hexamers to octamers and that the major constitutive units are epicatechin. Black spruce is one of the most important industrial species from Canadian forests and its bark is available in huge quantities. We therefore anticipate a potential for development of the original nutraceutical supplements and/or natural antioxidants from black spruce bark.

The bark extracts of four Japanese willow species: *Salix rorida*, *S. kinuyanagi*, *S. gilgiana*, *S. gracilistyla* were analysed for total phenols, total flavonoids and total proanthocyanidins. The highest content of phenolics was determined in *Salix rorida* among which hydroxyl-phenyl propanol and its glucoside, catechins and its dimers were identified. The bark of that species was determined to contain even higher amount (6-10%) of proanthocyanidins than the Japanese conifers (2-7%). The *Salix rorida* bark polyphenols were determined to belong to mixed procyanidin /prodelpinidin type and the octamers were determined to be the major oligomers (Ohara and Yanagi, 1995).

There are also reports of co-occurrence of procyanidins and prodelpinidins with profisetinidins, as in the heartwood of *Acacia baileyana* (Foo, 1984). Prorobinetinidins are the main components of the higher oligomeric fractions of the commercially important black wattle *Acacia* (“Mimosa”) bark extract (Coetzee *et al.*, 1995). Black wattle extract from the tannin-rich bark of *Acacia mearnsii* has been used universally as a tanning material for more than a century, its industrial application to be gradually extended in the second half of XX century to the manufacture of surfactants in ore flotation, flocculants in



water treatment, various types of wood adhesives, and adhesives for packaging materials. These uses are all based on the 70% phenolic (“tannin”) content of the bark extract, the phenols (tannins) corresponding to the relative molar mass range between 300 and 3 000 (Viviers *et al.*, 1983). The higher resistance of *A. auriculiformis* was mainly related to the more important concentration of monomeric flavan, teracacidin, as discussed previously (Barry *et al.*, 2005). The profisetinidin type of condensed tannins seem to dominate the bark and heartwood of *Acacias* as opposed to procyanidin type of condensed tannins which is more largely distributed in nature and is commonly found in bark of conifers species from temperate zone. The profisetinidin type tannins (the monomeric flavan fisetinidin could be described as 7,3’4’-trihydroxy-flavan-3-ol) with 7-monohydroxy A-rings, are also described as resorcinol type flavonoids (resorcinol hydroxylation pattern is constituted of C-7 hydroxyl and O-atom of the C- ring), seem to dominate the barks and heartwoods of different *Acacia* species. In addition, condensed tannins from acacias (or generally from the southern hemisphere hardwoods) can be classified more precisely as profisetinidin-, prorobinetinidin-, proguibourtinidin-, promelacacinidin- and proteracacinidin-type (Ferreira *et al.*, 2005). The profisetinidins are also the major constituents of the commercial Quebracho tannins obtained by extraction from *Schinopsis balansae* (quebracho-colorado) heartwood, family of *Anacardiaceae* (Pasch *et al.*, 2001) as well as from the durable heartwood of the locust tree (*Robinia pseudacacia* L.).

## **Phenolic compounds from woody plant/forest trees as a source of natural antioxidants**

### **Antioxidant activity of woody plant extracts**

Wood has been extensively used in food industry. Wood extractives contained in oak barrel, particularly the ellagitannins, are crucial to the organoleptic characteristics, preservation, as well as maturation and aging of wine (Chatonnet and Dubourdieu, 1998; Pocock *et al.*, 1994; Spillman *et al.*, 2004). Wood smoking is one of the oldest and widely used food (ham, sausages and fish) preservation and flavouring processes (Toth and Potthast, 1984). Free radicals and reactive oxidative/nitrogen species (RONS) present in the environment, such as superoxide anions ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), peroxy radical ( $ROO\cdot$ ), hydroxyl radicals ( $\cdot OH$ ) and nitric oxide ( $NO\cdot$ ) can trigger reactions damaging the essential molecules in living organisms such as lipids, proteins, and nucleic acids. Many

illnesses such as diabetes and degenerative diseases, cancer, heart and vascular diseases, neurological, and ocular disorders, as well as the aging process itself, are related to the oxidative stress induced by reactive species. These reactive species can also induce damage to processed foods leading to loss of their quality (rancidity), stability, and safety. Synthetic antioxidants are introduced into various nutraceuticals, pharmaceutical supplements, or as food additives, in order to neutralise the action of the radical reactions and prevent damage of biomolecules in body, as well as of lipids in foods. However, the concerns about potential mutagenic activity and possible carcinogenic effects of synthetic antioxidants (Botterweck *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002), such as butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) have stimulated the search for natural antioxidants. The polyphenols which are naturally-occurring plant metabolites have been recognised as antioxidant agents. They are widely available from forest trees and shrubs in form of extracts from leaves, stems, bark and wood. They play important roles at the nutritional and physiological level and in pharmacology by their antioxidant properties. Several compounds isolated from woody-plant extracts such as lignans, proanthocyanidins, phenolic acids, phenol glycosides and flavonoids have been shown to be powerful antioxidant agents (Pohjamo *et al.*, 2003; 108; Gulcin *et al.*, 2006; Neacsu *et al.*, 2007; Perez-Bonilla *et al.*, 2006; Falah *et al.*, 2008; Tung *et al.*, 2008). Since the separation of the constituent antioxidants would be costly and quite inefficient, the plant extracts are most often evaluated as crude extracts. Thus obtained results also seem to better represent the integrated effects of all antioxidants and they reflect, if any, the synergistic effects between them.

A series of papers have screened the antioxidant properties of woody-plant extracts using different well established *in vitro* and *in vivo* assays for their potential use in food industry. However the methodologies used for evaluating natural antioxidants must be carefully interpreted based on the system and analytical method for determining the end point of oxidation (Frankel and Meyer, 2000). The most widely used assays *in vitro* to assess the antioxidant potential of biological materials are based on the disappearance of two stable and non-biological free radical chromogens: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) cation radical (ABTS•<sup>+</sup>). These methods allow a rapid screening of antioxidants as they are simple and easy to

perform compared to the assays using physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. Several woody-plant extracts were shown to better scavenge DPPH• (Diouf *et al.*, 2009; Jerez *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2007; Gandin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2008; Sultana *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2001; Diouf *et al.*, 2009) or ABTS•<sup>+</sup> (Gulcin *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007; Gandin *et al.*, 2009; Ku and Mun, 2008; Ngoc *et al.*, 2008; Gulcin *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Tourino *et al.*, 2005) than butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole, vitamin E or vitamin C, the antioxidants commonly used in food industry. Another way to investigate the antioxidant potential of an extract/compound is to study its scavenging capacity against specific RONS. Numerous forest tree and shrub extracts, particularly from bark and leaves, have been demonstrated to possess high scavenging potential against superoxyde anion radicals (Wang *et al.*, 2004, Cui *et al.*, 2005, Chang *et al.*, 2001, Bouhleb *et al.*, 2008, Tung *et al.*, 2009), hydrogen peroxyde (Gandin *et al.*, 2009, Gulcin *et al.*, 2007, Almeida *et al.*, 2008a, Almeida *et al.*, 2008b), alkyl peroxy radicals (Sultana *et al.*, 2007, Chang *et al.*, 2001, Tung *et al.*, 2009, Almeida *et al.*, 2008; Barreira *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008), hydroxyl radicals (Chang *et al.*, 2001, Almeida *et al.*, 2008b, Lantto *et al.*, 2009; Mathew and Abraham, 2006; Singh *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2005), nitric oxide (Diouf *et al.*, 2009, Lin *et al.*, 2007, Almeida *et al.*, 2008a, Almeida *et al.*, 2008b, Kumar *et al.*, 2005, Da Silva *et al.*, 2007) and peroxy nitrite (Almeida *et al.*, 2008a, Almeida *et al.*, 2008b, Choi *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2008; Smejkal *et al.*, 2007). Antioxidant activity of an extract or compound is often associated with their redox properties, which allow them to act as reducing agents (Siddhuraju *et al.*, 2002). The reducing capacity of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity. A series of studies have reported the strong reducing power of woody-plant extracts (Gandin *et al.*, 2009, Sultana *et al.*, 2007, Diouf *et al.*, 2009, Siddhuraju *et al.*, 2002).

Among so far studied extracts, the most successful natural antioxidant from forest tree is the French maritime pine (*Pinus maritima* or *P. pinaster*) bark extract which is commercially available as Pycnogenol<sup>®</sup> and Oligopin<sup>®</sup>. Several studies have evaluated its potential application as functional ingredients of food products by measuring its efficiency as free radical scavengers, inhibitors of lipid peroxidation and protectors of endogenous

antioxidants. Widely used in pharmacology and cosmetology or as a food supplement, Pycnogenol<sup>®</sup> is proven to be an effective antioxidant both *in vitro* and *in vivo*. By free-cell *in vitro* assays, the French maritime pine bark extract has been demonstrated to be efficient radical scavenging agent against (a) stable free radicals such as DPPH (Packer *et al.*, 1999, Jerez *et al.*, 2007), ABTS<sup>•+</sup> [147], (b) reactive oxygen species (ROS) such as O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Grimm *et al.*, 2004; Virgili *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2002) and •OH (Jerez *et al.*, 2007, Virgili *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 2008), and (c) reactive nitrogen species (RNS) such as NO• (Virgili *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 2008) and ONOO<sup>-</sup> (Kim *et al.*, 2008). This bark extract has been shown to have excellent radical scavenger and antioxidant properties in model reactions that were superior to those of various fruit and plant extracts and other antioxidants (Packer *et al.*, 1999; Rohdewald, 2002). Wood and coworkers (Wood *et al.*, 2002) investigated the superoxide radical scavenging activity of pine bark extract by two *in vitro* tests. In that study, the extract was determined to be 13-fold more effective antioxidant than vitamin C, commonly used in food industry as antioxidant additive. Other investigators have reported the high overall antioxidant activity of French maritime pine bark extract (PBME) in comparison to 11 phytochemicals present in fruits and vegetables against peroxy radical evaluated by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and total oxidant scavenging capacity (TOSC) assays (Tomer *et al.*, 2007). PMBE was as effective as quercetin and grape skin extract. Another study on 15 medicinal plants (Pietta *et al.*, 1998) showed that PMBE with the extracts of green tea, grape seeds, bilberry, ginkgo and red grape skin exhibit higher total antioxidant activity ( $\approx 2.5$  mM Trolox equivalent) than extracts from witch hazel, artichoke, passion flower, Echinacea, hawthorn, sweet clover, and eleuthero. The antioxidant activity of PMBE has been also studied in food model system. It has been reported that PMBE and its fractions inhibit the lipid peroxidation of corn oil in an oil-in-water emulsion system (Tourino *et al.*, 2005). Pine bark extract has been shown to reduce the lipid oxidation of raw (Ahn *et al.*, 2004) and cooked (Ahn *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2007) ground beef, more efficiently than BHT/BHA mixture. The same finding has been reported for biological lipid samples as well as for biological proteins samples, including LDL, liposome, lipoprotein, DNA (Sivonova *et al.*, 2004; Sivonova *et al.*, 2006). In several cell systems, pine bark extract protects against oxidative stress by doubling the intracellular synthesis of anti-oxidative enzymes and by acting as a potent scavenger of free radicals

(Rohdewald, 2002). PMBE was shown to protect macrophages and epithelium cells against intercellular oxidative stress by decreasing free radical generation and modulating the redox enzymes (Gandin *et al.*, 2009; Bayeta and Lau, 2000; Ansari *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2000). A study on rat pheochromocytoma cells line suggests that PMBE may reduce neuronal apoptosis which is one of the pathological features of Alzheimer's disease, possibly by decreasing free radical generation (Peng *et al.*, 2002). *In vivo*, standardized PMBE (Pycnogenol<sup>®</sup>) has low acute and chronic toxicity with mild unwanted effects occurring in a small percentage of patients following oral administration (Rohdewald, 2002). For rat fed with PMBE for 8 weeks, a significant increase of total antioxidant capacity in plasma has been shown. Supplementation in human shows similar trend. Intake of Pycnogenol<sup>®</sup> for 6 week has been found to increase plasma antioxidant capacity and to exert favourable effects on the lipid profile in human (Devaraj *et al.*, 2002). Williamson and Manach have reviewed several studies on dietary polyphenols in human nutrition and reported the pronounced effects of Pycnogenol<sup>®</sup> on the vascular system, including plasma antioxidant activity (Williamson and Manach., 2005). However, there were other studies in which such effect was not found (Ryan *et al.*, 2008, Silliman *et al.*, 2003). A beneficial effect of Pycnogenol<sup>®</sup> administration to children affected by attention deficit hyperactivity disorder has been found in terms of total antioxidant status, explained by restoring a more balanced oxidative status (Dvorakova *et al.*, 2006). Pycnogenol<sup>®</sup> has also been shown to protect DNA against oxidative damage *in vivo* (Chovanova *et al.*, 2006).

Finding new natural, safe and economical antioxidant substances, especially from abundant and low-value raw materials is a real challenge nowadays, and it makes part of the sustainability concept (Moure *et al.*, 2001). Apart from the barks which were previously extensively discussed, a series of papers have attempted to evaluate the potential application of lignocellulosic wastes and/or by-products from forestry as renewable sources of food additives. The liquors and ethyl acetate fractions from autohydrolysis treatment (Garrote *et al.*, 2003; Moure *et al.*, 2005; Parajó *et al.*, 2008), from steam explosion treatment (Castro *et al.*, 2008) and from acid hydrolysis (Gonzalez *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 1999), of both hardwoods and softwoods, have been found to have antioxidant activity which was determined to depend on the severity of the process and to

be comparable and sometimes higher than that of synthetic antioxidants, BHT and BHA, commonly used in food industry.

### Phenolic contents/compositions

There are several analytical methods to determine the polyphenols contained in the extracts from forest trees which are identical to those used for determination of food polyphenols. The qualitative and quantitative determination of phenolic compounds in natural matrices is a difficult task even for modern analytical techniques such as liquid chromatography (Lin *et al.*, 2007).

One of the most frequently used methods to determine the total phenol (TP) content relies on colorimetric measurement with the Folin-Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965). By this method, TP content is usually expressed in terms of gallic acid, tannic acid or catechin equivalents per mass units of raw material or extract. As an example, the total phenol content of pine extracts (Jerez *et al.*, 2007; Lantto *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2007; Kahkonen *et al.*, 1999; Ku *et al.*, 2007; Kwak *et al.*, 2006; Pinelo *et al.*, 2004; Yen *et al.*, 2008; Zulaica-Villagomez *et al.*, 2005) are presented in Table 26.

Table 26 Total phenol contents of pine tree extracts from different plant-parts

Genus	Plant part	Drying method	Solvent extraction	TP content	Reference
<i>pinaster</i>	bark	room temperature	ethanol	68.5 <sup>a</sup>	(Jerez <i>et al.</i> , 2007)
	wood	room temperature	methanol ethanol acidified water	8.5-11.2 <sup>a</sup> 5.1-8.22 <sup>a</sup> 1.0-1.9 <sup>a</sup>	(Pinelo <i>et al.</i> , 2004)
<i>radiata</i>	bark	room temperature	ethanol	123.8 <sup>a</sup>	(Jerez <i>et al.</i> , 2007)
	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	145.9 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>massionana</i> Lam.	bark	air-dried	60% aqueous ethanol	25.1 <sup>a</sup>	(Yen <i>et al.</i> , 2008)
<i>sylvestris</i>	needle	air-dried	80% aqueous methanol	17.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	(Kahkonen <i>et al.</i> , 1999)
	cork	air-dried	80% aqueous	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	(Kahkonen <i>et al.</i> ,

			methanol		1999)
	bark	air-dried	80% aqueous methanol	76.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	(Kahkonen <i>et al.</i> , 1999)
<i>densiflora</i>	needle	ND	75% aqueous ethanol	57.7 <sup>c</sup>	(Kwak <i>et al.</i> , 2006)
	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	20.6 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>sibirica</i>	seed	air-dried	95% aqueous acetone	5.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	(Lantto <i>et al.</i> , 2009)
<i>resinosa</i>	cone	air-dried	80% aqueous ethanol	3.3-106.9 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	needle	freeze-dried	80% aqueous ethanol	18.7-32.4 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	bark	ND	80% aqueous ethanol	11.3-14.3 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	wood	ND	80% aqueous ethanol	1.8 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
<i>banksiana</i>	cone	freeze-dried	80% aqueous ethanol	28.5 <sup>c</sup>	(Fraser <i>et al.</i> , 2007)
	cone	air-dried	80% aqueous ethanol	14.1-133.6 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	needle	freeze-dried	80% aqueous ethanol	51.4-58.3 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	bark	ND	80% aqueous ethanol	32.1-98.2 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	20.5 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
	wood	ND	80% aqueous ethanol	3.6-5.4 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
<i>nigra</i>	cone	air-dried	80% aqueous ethanol	7.0-29.0 <sup>a</sup>	(Zulaica- Villagomez <i>et al.</i> , 2005)

	needle	freeze-dried	80% aqueous ethanol	14.4 <sup>a</sup>	(Zulaica-Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
<i>eliotti</i>	cone	air-dried	80% aqueous ethanol	8.8-43.2 <sup>a</sup>	(Zulaica-Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	needle	freeze-dried	80% aqueous ethanol	12.8 <sup>a</sup>	(Zulaica-Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	bark	ND	80% aqueous ethanol	30.3-32.1 <sup>a</sup>	(Zulaica-Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
	wood	ND	80% aqueous ethanol	2.4 <sup>a</sup>	(Zulaica-Villagomez <i>et al.</i> , 2005)
<i>thunbergii</i>	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	13.5 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>contorta</i>	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	27.8 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>rigida</i>	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	80.3 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>taeda</i>	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	8.1 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>rigida x taeda</i>	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	3.0 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>serotina</i>	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	5.3 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>koraiensis</i>	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	32.8 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)
<i>parviflora</i>	outer bark	oven-dried (60°C)	hot water	10.2 <sup>b</sup>	(Ku <i>et al.</i> , 2007)

<sup>a</sup> Determined by Folin-Ciocalteu assay, in units of mg gallic acid equivalent per g of raw material (mg/g GAE). <sup>b</sup> Determined by Folin-Ciocalteu assay, in units of mg (+)-catechin equivalent per g of raw material (mg/g CAE). <sup>c</sup> Determined by Folin-Ciocalteu assay, in units of mg tannic acid equivalent per g of raw material (mg/g TAE). ND: not determined



As we can observe, the amount of total phenolics varies widely in plant materials even for the same raw material reported by different authors, and ranges from 1.1 to 145.9 mg GAE.g<sup>-1</sup> of dry material (Table 26), the values comparable and even higher in some cases (barks and juvenile cones) than those determined for edible plants (Kahkonen *et al.*, 1999; Balasundram *et al.*, 2006). Among pine materials, low levels were found in *P. sylvestris* cork whereas *P. radiata* outer bark was determined to contain the highest amounts of phenolics. Significant difference in the amounts of total phenol content in different tissues as well as in the same plant (different parts) materials could be explained by the fact that the concentration of phenolic compounds is affected by plant species, type of tissue, maturity at harvest, growing conditions, soil conditions, felling season, post-harvest treatment like drying, storage, as well as processing conditions such as solvent and temperature of extraction, sample particle size and processing time (Pinelo *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 1992; Mononen *et al.*, 2004; Kalt *et al.*, 2001; Keinanen and Julkunen, 1996; Mammela, 2001). In general, bark contains relatively higher level of polyphenols than other plant organs (Gao *et al.*, 2007; Siddhuraju *et al.*, 2002; Kahkonen *et al.*, 1999), due to accumulation of phenolic compounds with the maturity of the plant and protective role of bark (Sultana *et al.*, 2007; Claudot *et al.*, 1997). On the contrary, as illustrated in Table 26, the total phenol contents of pine cones decreased with the age: the juvenile cones contained more phenolic compounds than the old ones, and even more than several pine bark extracts. The decrease of cone total phenols with maturity could be due to oxidative effects and/or the presence of seeds in juvenile cones which contain high level of total phenol content (330 mg.g<sup>-1</sup> GAE) (Zulaica-Villagomez *et al.*, 2005).

It has been reported in several studies that the potential antioxidant capacity of an extract is essentially related to its polyphenolic content/composition (Gao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004; Zulaica-Villagomez *et al.*, 2005; Bahorun *et al.*, 2004; Katalinic *et al.*, 2006), while there are also reports in which it was not possible to find such a relation (Ku *et al.*, 2007; Dasgupta and De, 2007). It is well known that different phenolic compounds have different responses to the Folin-Ciocalteu test. Even though flavonoids, phenolic acids and proanthocyanidins are the dominant phenolic compounds in all woody plants their quantitative and qualitative distributions vary between different tissues (Table 27) (Pratt and Hudson, 1990).

Table 27 Relative concentration of phenolic compounds in woody plant tissues. Tiré de Pratt and Hudson, 1990

Tissue	Relative concentrations
Leaf	Flavanol $\cong$ cinnamic acids > proanthocyanidins $\cong$ leucoanthocyanidins (flavan-3,4-diols)
Wood	Catechins $\cong$ leucoanthocyanidins > flavanol (proanthocyanidins) > cinnamic acids
Bark	As for wood but greater concentrations

We have observed a variation in phenolic composition between different tissues of yellow birch (unpublished results) (Figure 51). One can observe that the obtained chromatograms show different phenolic profiles for wood, inner and outer bark, and leaves extracts from yellow birch. Although a number of phenolic compounds are common to different yellow birch extracts at varying concentrations, distinctive phenols are plant-part specific as illustrated in Figure 51.

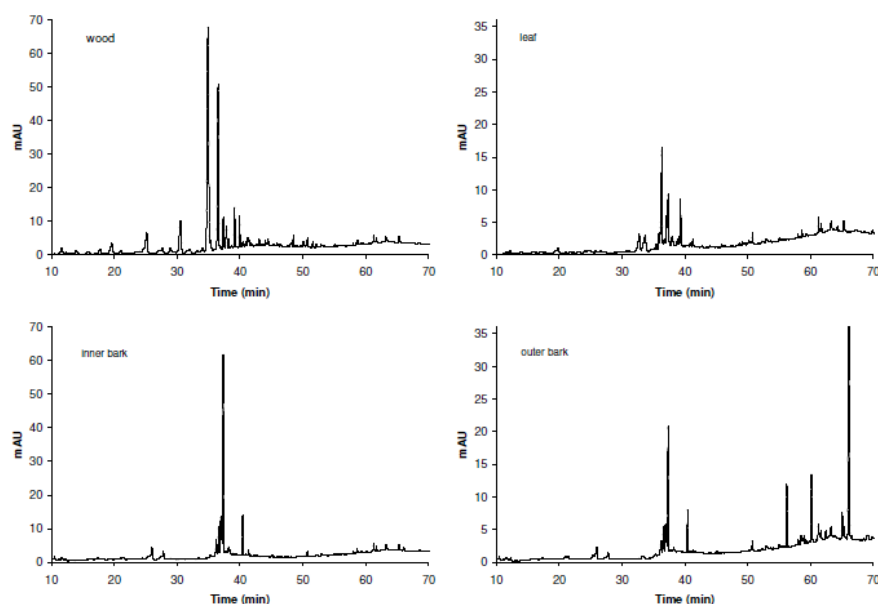


Figure 51 HPLC-DAD chromatograms of 95% aqueous ethanolic extracts (room temperature for 24h) of *Betula alleghaniensis* Britton. tissue at 1 mg. mL<sup>-1</sup> ( $\lambda$  280 nm).

Given the great diversity of phenolic compounds and the lack of authentic standards, the spectral information provided by the DAD detector is useful for the identification of the chromophore part(s) of the polyphenols analyzed which permits to identify the specific phenolic classes by using UV-absorbance maxima and shoulders assignments from literature (Bengoechea *et al.*, 1995), even if it is insufficient for the complete structural identification. Major phenolic constituents of yellow birch wood are characterised by simple phenol-like UV spectra. Several diarylheptanoids, phenylbutanoids, lignans and phenol glycosides have been determined in wood, bark and stem of various birch species extracts (Smite *et al.*, 1993; Pan *et al.*, 1994; Smite *et al.*, 1995; Fuchino *et al.*, 1996; Hanawa *et al.*, 1997; Hiltunen *et al.*, 2006). The peaks at RT 37.3 and 40.4 min (identified as simple phenols) present in the chromatograms recorded for yellow birch wood, inner and outer bark extracts have the UV spectral characteristics similar to the phenol glucosides betuloside and platyfyloside (Vainiotalo *et al.*, 1991). Betuloside, platyphyllside and their derivatives have been detected in wood, bark and stem of various birch species extracts (Mammela, 2001; Smite *et al.*, 1993; Fuchino *et al.*, 1996). Quercetin (RT = 36 to 39 min) derivatives, such as rutin, were identified as the most abundant phenolics in birch leaves according to the results of previous studies on leaves from *B. pendula* (Keinanen and Julkunen, 1996; Laitinen *et al.*, 2000).

In fact, the nature of the phenols contained in different extracts, and not only their total amounts, is also a factor influencing the antioxidant activity which has to be considered carefully. Several studies have investigated the relation between the chemical structure and the antioxidant activity of phenolic compounds among and within various subclasses, also present in woody plant extracts such as flavonoids (Han *et al.*, 2009; Amic *et al.*, 2007), lignans (Eklund *et al.*, 2005), proanthocyanidins (Plumb *et al.*, 1998), stilbenes (Matsuda *et al.*, 2001) and phenolic acids (Natella *et al.*, 1999). Soobrattee *et al.* have proposed the order of the antioxidant activity of different phenolic compound subclasses based on the results obtained by three methods *in vitro*: procyanidin dimer > flavanol > flavonol > hydroxycinnamic acids > simple phenolic acids (Soobrattee *et al.*, 2005). It has also been reported in several studies that the system in which the antioxidant activity of a phenolic compound is determined (e.g. polarity) also plays a role in determining the values of the relative antioxidant activity measured in homogeneous or heterogeneous system (Frankel

and Meyer, 2000; Frankel *et al.*, 1994; Foti *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996; Nenadis *et al.*, 2003). Siddhuraju *et al.* found that the relation between phenolic content and antioxidant activity depended on the methodology used to evaluate that activity (Siddhuraju *et al.*, 2002).

So, the antioxidant activity of an extract cannot be predicted only on the basis of its total phenolic content. As an extract is a complex mixture of a number of organic compounds, the differences in paths of activity of single compounds can induce synergism or antagonism phenomena (Jia *et al.*, 1998; Bonnely *et al.*, 2000; Peyrat-Maillard *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2007). It has been shown that the antioxidant mixture found in an extract is more active than are individual constituents or mixtures of main constituents mixed in specific proportions. The presence of non-phenolic compounds can also contribute to its overall antioxidant capacity. Several bioactive triterpenes and phytosterols have been examined for their possible antioxidant activities (Wang *et al.*, 2002; Yoshida and Niki, 2003; Winkler and Warner, 2008; Assimopoulou *et al.*, 2005; Cefarelli *et al.*, 2006), which are present in relatively high concentrations in yellow birch tissues (Habiyaemye *et al.*, 2002; Lavoie and Stevanovic, 2005; Lavoie and Stevanovic, 2007). The overall mechanism of antioxidant activity of natural extracts from forest trees is usually more complex than that of model compounds, due to interaction of different compounds present in extract mixtures. Thus, the antioxidant capacity of natural extracts should be related to the total phenols content, to the functional groups of the phenolic compounds present in the extracts and to the synergism between molecules but also to some non-phenolic compounds present in the extracts, which have antioxidant capacity.

### **Plant polyphenols and health**

Large amount of encouraging data from *in vitro* and animal models makes clear that consumption of a diet rich in plant polyphenols is associated with beneficial health effects. In this section we will provide some examples of investigations that demonstrate the positive effects on the health of some polyphenolic substances found in forest resources (Table 28).

Table 28 Summary of the promoting health effects of polyphenols from forest biomass

Polyphenol Class	Polyphenol Compound	Source in forest trees	Health effects	Ref
<b>Non flavonoids</b>				
Lignans	Pinoresinol Lariciresinol Matairesinol	Knotwood of <i>Abies balsamea</i> , <i>Abies sibirica</i> , <i>Pseudotsuga menziessi</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>Thuja plicata</i> and <i>Picea abies</i>	Chemoprevention against various cancers by modulation of oestrogen receptors and inhibition of carcinogenic precursors. They can also act as antioxidant, antiproliferative and pro-apoptotic agents.	(Touillaud <i>et al.</i> , 2007) (Webb <i>et al.</i> , 2007) (Schultze-Mosgau <i>et al.</i> , 1998) (Sung <i>et al.</i> , 1998) (Adlercreutz, 2007) (Linseisen <i>et al.</i> , 2004) (McCann <i>et al.</i> , 2002) (Adlercreutz <i>et al.</i> , 1992)
Stilbenes	Resveratrol and resveratrol glucoside	<i>Picea abies</i> bark, knotwood of <i>Pinus strobus</i> , <i>Pinus banksiana</i> and <i>Pinus sylvestris</i>	Cardioprotective effects due to the ability to act as antiplatelet, disrupt prostanoid synthesis and regulate lipoprotein metabolism  Inhibition of the initiation, promotion and progression of tumours <i>in vivo</i> . <i>In vitro</i> data show that resveratrol can decrease migration, adhesion and invasion of cancer cells. Additionally, it can induce cell death via p53 and through p53 independent mechanisms.  Resveratrol appears to be an efficient cell-death sensitized and its activity seems to be cell specific	(Soleas <i>et al.</i> , 1997) (Lee <i>et al.</i> , 2005) (Olson <i>et al.</i> , 2005) (Jang <i>et al.</i> , 1997) (Chen <i>et al.</i> , 2004) (Wu <i>et al.</i> , 2008) (Baek <i>et al.</i> , 2002) (Mahyar-Roemer <i>et al.</i> , 2001) (Wu <i>et al.</i> , 2004) (Babich <i>et al.</i> , 2000) (Billard <i>et al.</i> , 2002)
<b>Flavonoids</b>				

Flavonols	Quercetin Myricetin Kaempferol	Leaves of <i>Betula</i> spp and <i>Eucalyptus</i> spp	Cardioprotective effects by improvement of coronary vasodilatation, decrease of the platelet ability in the blood to clot, decrease of blood pressure and prevention of LDL oxidation  Cancer-preventive effects by enzymatic inhibition, modification of signal transduction pathways and protection against DNA damage induced by carcinogenic compounds.	(Cefarelli <i>et al.</i> , 2006) (Knekt <i>et al.</i> , 2002) (Hertog <i>et al.</i> , 1993) (Duarte <i>et al.</i> , 1993a) (Duarte <i>et al.</i> , 1993b) (Perez-Vizcaino <i>et al.</i> , 2006) (Guerrero <i>et al.</i> , 2007) (Guerrero <i>et al.</i> , 2007) (Galisteo <i>et al.</i> , 2004) (Duarte <i>et al.</i> , 2001) (Edwards <i>et al.</i> , 2007) (Dewhalley <i>et al.</i> , 1990) (CanivencLavier <i>et al.</i> , 1996) (Shih <i>et al.</i> , 2000) (Moon <i>et al.</i> , 2006) (Delgado <i>et al.</i> , 2008)
Dihydroflavonols	Taxifolin	Knotwood of <i>Populus</i> spp	Chemopreventive effects by modification of detoxification enzymes. It can also induce growth arrest and cell death in prostate cancer cells.	(Lee <i>et al.</i> , 2007) (Brusselmans <i>et al.</i> , 2005)
Proanthocyanidins	Pycnogenol <sup>®</sup>	<i>Pinus maritime</i> bark	Anti-aging protective effects against UV-induced wrinkle formation  Therapeutic potential in neurodegenerative diseases due to the ability to act against glutamate-induced cytotoxicity and $\beta$ -amyloid apoptosis of neurons	(Peng <i>et al.</i> , 2002) (Cho <i>et al.</i> , 2007) (Sime and Reeve, 2004) (Saliou <i>et al.</i> , 2001) (Markesbery, 1997) (Liu <i>et al.</i> , 2000)

### Cardioprotective effect

#### 7.3.5.1.1 Flavonoids

Epidemiological studies suggest that the consumption of flavonoid-rich diets decreases the risk of cardiovascular diseases due to three major effects (Knekt *et al.*, 2002): (a) improvement of coronary vasodilatation; (b) prevention of low-density lipoproteins (LDLs) oxidation; (c) decrease of the platelet ability in the blood to clot (Mojzisova and Kuchta, 2001). Several series of papers have screened the cardioprotective properties of woody-plant extracts (Quettier-Deleu *et al.*, 2003; Vuorela *et al.*, 2005; Pardo-Andreu *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008). Interestingly, some of the flavonoids having positive effects on the cardiovascular system are widely present in forest resources, mainly in leaves plant-parts as previously discussed.

For instance, quercetin intake has been associated with a decreased incidence of cardiovascular diseases (CVD) (Hertog *et al.*, 1993). Quercetin aglycon exerts direct vasodilator effects (endothelium-independent) in isolated arteries (Duarte *et al.*, 1993a; Duarte *et al.*, 1993b). This vasodilator effect occurs similarly in arteries constricted by different stimuli including endogenous vasoconstrictors (noradrenaline, ET-1 or TxA<sub>2</sub>), protein kinase C (PKC) activators and depolarizing agents (KCl). The molecular mechanisms of the direct vasodilator effects of quercetin are not definitely established but might involve multiple actions on protein kinases such as myosin light-chain kinase (MLCK) and PKC (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006).

In addition to their direct vasodilator effects, flavonoids have been reported to induce endothelium-dependent vasorelaxation (Andriambelison *et al.*, 1998; Fitzpatrick *et al.*, 1993). Thus, they can increase endothelial cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels, which is a physiological signal for the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation (Andriambelison *et al.*, 1997). Additionally, flavonoids can scavenge or inhibit the superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) synthesis, thereby protecting nitric oxide (NO) from O<sub>2</sub><sup>•-</sup> driven inactivation. This effect is related with an increase in NO half-life, which contributes to its biological activity (Lopez-Lopez *et al.*, 2004). Therefore, under conditions of high levels of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, flavonoids potentiate NO and endothelium-dependent relaxation, reverting oxidative stress-induced endothelial dysfunction (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006).

Flavonoids may also affect platelet function by several mechanisms, including antagonism of Tromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) receptors (TP). TxA<sub>2</sub> is a powerful inducer of platelet activation

and aggregation and is produced by sequential arachidonic acid metabolism, by cyclooxygenase and thromboxane synthase, upon activation of platelets with agonists such as adenosine diphosphate, thrombin or collagen. Once generated, TxA<sub>2</sub> acts in an autocrine and paracrine manner, increasing the activation and recruitment of the surrounding platelets to the site of vascular damage (Guerrero *et al.*, 2007). Flavonol quercetin and flavone luteolin are inhibitors of calcium mobilization after selective stimulation of platelet TP with 9,11-dideoxy-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -methanoepoxy-prosta-5 $\alpha$ ,13 $\beta$ -dien-1-oic acid (U46619). Moreover, platelet treatment with luteolin or quercetin also results in a sharp inhibition of U46619-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). In summary, flavonoids seem to interfere with TxA<sub>2</sub>-TP interaction (Guerrero *et al.*, 2007).

The effects of quercetin have also been analyzed in several animal models of hypertension. Chronic quercetin treatment (5 or 10 mg kg<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>) lowers blood pressure or prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR), nitric oxide deficient rats, desoxycorticosterone acetate-(DOCA) salt hypertensive rats, Dahl salt-sensitive hypertensive rats and two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats (Aoi *et al.*, 2004; Galisteo *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2001). Quercetin also exerts end-organ protection in hypertensive animals, reducing the cardiac and renal hypertrophy, the proteinuria and the vascular remodelling associated with elevated blood pressure (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006). The effect of *in vivo* quercetin supplementation on the blood pressure of both pre-hypertensive and stage 1 hypertensive patients has also been examined (Edwards *et al.*, 2007). Administration of quercetin (730 mg, daily) during four weeks caused a significant reduction in systolic, diastolic and mean arterial pressures in stage 1 hypertensive patients. Remarkably, no alterations in blood pressure were found in pre-hypertensive patients (Edwards *et al.*, 2007), suggesting that beneficial health effects of quercetin can be mainly expected when basal levels of damage are increased (Boots *et al.*, 2008).

Other reports have shown that quercetin metabolites, mainly quercetin-3-glucuronide (Q3GA) are present in the aorta of high cholesterol/quercetin glucoside-fed rabbits (Kamada *et al.*, 2005). Indeed, in these animals cholesterol accumulation was significantly inhibited, suggesting the anti-atherosclerotic action of the quercetin metabolites in the aorta. A more recent study (Kawai *et al.*, 2008) confirmed that Q3GA specifically



accumulates in the injured aorta, together with atherosclerotic plaques, where it down-regulates the expression of several established receptors (SR-A and CD36) for the oxidized/modified low-density-lipoproteins (LDL). These observations raise the possibility that the accumulation of quercetin metabolites in the aorta may play an important role in the anti-atherosclerotic effects of dietary quercetin (Kawai *et al.*, 2008).

Myricetin, another flavonol widely distributed in forest resources, has shown to be a potent inhibitor of oxidative modification of LDL by macrophages (Dewhalley *et al.*, 1990). The oxidative modification of LDL by macrophages increases the uptake of LDL into macrophages, thus resulting in the formation of cholesterol-laden foam cells in atherosclerotic lesions (Dewhalley *et al.*, 1990). Myricetin conserves the  $\alpha$ -tocopherol content in LDL, which would otherwise be rapidly depleted during LDL modification by macrophages (Dewhalley *et al.*, 1990).

### *Stilbenes*

The stilbene resveratrol appears to be an excellent cardioprotective agent through a multitude of mechanisms. Indeed, it has the ability to act as antiplatelet agent, disrupting the prostanoid synthesis and regulating the lipoprotein metabolism (Soleas *et al.*, 1997). One mechanism by which resveratrol exerts a positive effect on the vascular system is through decreasing the expression, production and secretion of endothelin 1 by endothelial cells (Chao *et al.*, 2005). Resveratrol also has a vasodilator effect by: a) modulating the endothelium-dependent release of NO, b) regulating the activation of MAPK and c) influencing the intracellular concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$ . Resveratrol can also suppress angiogenesis and is able to prevent cytokine-induced vascular leakage by downregulating the expression of adhesion molecules in tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )-stimulated endothelial cells (Bertelli *et al.*, 2001). TNF- $\alpha$ -induced vascular permeability changes have been shown to be inhibited *in vitro* and *in vivo* by resveratrol (Fulgenzi *et al.*, 2001). Resveratrol has antiatherogenic effect on vascular smooth muscle cells, which correlate with its ability to inhibit AP-1 and NF- $\kappa$ B transcription factors, decreasing ERK1/2 and inducing a cyclin-dependent G<sub>1</sub> arrest (Lee *et al.*, 2005). It also functions as an antifibrotic agent in the myocardium by decreasing cardiac fibroblastic proliferation and differentiation

(Olson *et al.*, 2005). Resveratrol has also reported to inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes, thereby conferring protection against ischemia (Buluc and Demirel-Yilmaz, 2006).

### **Proanthocyanidins and skin aging**

Skin is a major candidate and target of oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Cals-Grierson and Ormerod, 2004). These reactive species are major and significant contributors to skin aging (Wiesner *et al.*, 2006). Absorption of solar photons in the UVA and UVB regions induces the subsequent generation of ROS, organic free radicals and other toxic photoproducts that mediate skin photoaging (Wondrak *et al.*, 2006). Photoaging affects the sun-exposed areas and is clinically characterized by fine and coarse wrinkling, roughness, dryness, laxity, teleangiectasia, loss of tensile strength and pigmentary changes (Masnec and Poduje, 2008).

Pycnogenol<sup>®</sup>, the trade name for the standardized extract obtained from the bark of French maritime pine, has been studied on UV-induced wrinkle formation in hairless mouse skin combined with vitamin C, vitamin E and evening primrose oil (Cho *et al.*, 2007). Oral administration of this antioxidant mixture significantly inhibited wrinkle formation caused by chronic UV irradiation through significant inhibition of UV-induced matrix metalloproteinases activity accompanied by enhancement of collagen synthesis (Cho *et al.*, 2007). Pycnogenol<sup>®</sup> topically applied (0.05-0.2%) after UV exposure also results in a dose-dependent reduction of the immunosuppression and inflammatory sunburn reaction (Sime and Reeve, 2004). The activation of the proinflammatory and redox regulated transcription factor NF- $\kappa$ B is thought to play a major role in the erythema induced by UV radiation. Pycnogenol<sup>®</sup> dose-dependently inhibits the UV-induced NF- $\kappa$ B-dependent gene expression in the human keratinocyte cell line HaCaT, thereby indicating that its oral supplementation could reduce the skin erythema caused by UV radiation (Saliou *et al.*, 2001). Pycnogenol<sup>®</sup> also stimulates the secretion of human growth hormone in genetically engineered human keratinocytes (NHEK) (Buz'Zard *et al.*, 2002). Levels of this hormone declines about 15-30% per decade after age 30 and it is frequently non-existent by age 80 (Rudman *et al.*, 1990).

### **Proanthocyanidins and Alzheimer disease**

Oxidative stress has been associated with neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) (Butterfield *et al.*, 1999), in which the depletion of the antioxidant system causes the increase of lipid peroxidation products (Ahmad *et al.*, 2005; Markesbery, 1997). Although the exact mechanism of oxidative damage on Alzheimer disease pathogenesis are not completely elucidated, experimental evidence suggests that antioxidant treatment could have a therapeutic potential in the treatment of neurodegenerative disorders (Kobayashi *et al.*, 2000).

Pycnogenol<sup>®</sup> has been studied *in vitro* on specific neural systems. Indeed, it was extremely effective in protecting HT-4 neuronal cells from glutamate-induced cytotoxicity (Kobayashi *et al.*, 2000). Although glutamate is a neurotransmitter, elevated levels are associated with several neurological disorders and can lead to rapid cell death (Coyle and Puttfarcken, 1993). Pycnogenol<sup>®</sup> can also inhibit the  $\beta$ -amyloid apoptosis of neurons and vascular cells, both of which accumulate with age and are pathological features of AD (Peng *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000). A diet enriched with a combination of antioxidants including Pycnogenol<sup>®</sup> (0.057 g/15 kg of feed) can prevent the deposition of Periodic Acid Schiff (PAS)-positive bodies in the hippocampus of a mouse model of neurodegeneration (Veurink *et al.*, 2003)

### **Polyphenols and cancer**

#### *Flavonoids*

Cancer chemoprevention can be defined as the pharmacological administration of synthetic or natural compounds that prevent, inhibit or reverse carcinogenesis, or prevent the development of invasive cancer (Park and Pezzuto, 2002). Some of flavonoids widely present in forests resources such as taxifolin, luteolin, quercetin and myricetin are able to inhibit different processes involved in cancer development. Flavonoids display a wide range of biochemical and pharmacological properties, one of the most thoroughly characterized effects being chemopreventive activity. Chemopreventive effects of flavonoids are possibly exerted through a variety of mechanisms, including modification of

detoxification enzymes (CanivencLavier *et al.*, 1996; Shih *et al.*, 2000) and free radical scavenging (Raso *et al.*, 2001).

The chemopreventive effects of dihydroflavonol taxifolin on the expression of phase II detoxification enzymes have been evaluated (Lee *et al.*, 2007). Taxifolin exhibits high detoxification ability, being able to modulate the expression of several genes, including those coding for phase II detoxification enzymes, cell cycle regulatory proteins, growth factors, and DNA repair proteins (Lee *et al.*, 2007). Taxifolin has also shown inhibitory effects on the lipogenesis of LNCaP prostate cancer cells (Brusselmans *et al.*, 2005), an effect that has been associated with growth arrest and cell death (Brusselmans *et al.*, 2003).

Luteolin, a flavon available from forest resources, displays a variety of pharmacological effects *in vitro* and *in vivo* related to its anti-carcinogenic activity. Luteolin is indeed a potent antiproliferative agent on several cancer cell lines. It presents an  $IC_{50}$  of 3.1  $\mu\text{M}$  in A 549 human lung carcinoma cells; 2.3  $\mu\text{M}$  in mouse B16 melanoma 4A5 cells; 2.0  $\mu\text{M}$  in human T-cell leukemia cells CCRF-HSB-2 and 1.3  $\mu\text{M}$  in human gastric cancer TGBC11TKB cells (Kawaii *et al.*, 1999). Apoptosis and cell cycle arrest in  $G_0/G_1$  phase in five human hepatoma cell lines were observed after luteolin administration (Chang *et al.*, 2005). Cell cycle arrest in S-phase was found in CH27 human lung squamous carcinoma cells by using 50  $\mu\text{M}$  of luteolin (Leung *et al.*, 2005). Other study shows that a complete growth inhibition of PC-3 human prostatic cancer cells occurs after treatment with 100  $\mu\text{M}$  of luteolin (Knowles *et al.*, 2000). Additionally, in HT-29 human colon cancer, concentrations from 20 to 60  $\mu\text{M}$  of luteolin can generate cell cycle arrest in  $G_2/M$  by downregulation of cyclin B1 expression (Lim *et al.*, 2007). Luteolin has shown to be a strong inhibitor of cell proliferation in human leukemic CEM-1 and CEM-C7 cells. Incubation with 30  $\mu\text{M}$  of luteolin for 24 h resulted in a complete ATP depletion and inhibition of glucose uptake (Post and Varma, 1992). These results were confirmed by other experiments on leukemic lymphocytes (P 388 from mouse) where luteolin had the lowest  $IC_{50}$  value (1 $\mu\text{M}$ ) compared to the flavonoids tested (Hirobe *et al.*, 1997). Luteolin strongly inhibits the growth of HL60 human leukemia cells, being also able to induce morphological differentiation into granulocytes (Takahashi *et al.*, 1998).

The effects of luteolin on the tumor suppression in different cancer have also been tested *in vivo*. Fang and coworkers determined its effects on prostate cancer PC-3 xenograft in nude mice (Fang *et al.*, 2007). Treatment with luteolin at 5 mg.kg<sup>-1</sup> and 10 mg.kg<sup>-1</sup> decreased the tumor weight, without any indication of systemic toxicity. The inhibition of growth in normal and in cancerous prostate cells of mice by luteolin has also been demonstrated by Markaverich and coworkers (Markaverich and Alejandro, 1997). At a daily dose of 20 mg.kg<sup>-1</sup> of luteolin during 2 weeks, prostate weight was reduced by 60%, without adverse effects on total body weight and seminal vesicles. The chemopreventive effects of luteolin on bacterial enzymes in a colon carcinogenesis model induced by dimethylhydrazine (DMH) have been studied by Manju and coworkers (Manju and Nalini, 2007). After DMH treatment, the colon cancer incidence and the activities of bacterial enzymes  $\beta$ -glucuronidase (present in the proximal colon, distal colon, intestines, liver, and colon contents) and mucinase (colon and fecal contents) were significantly increased. However, after luteolin administration (0.1, 0.2, or 0.3 mg.kg<sup>-1</sup> per day) the colon cancer incidence, the number of tumors per rat and the tumor size were reduced by 70 to 90% in a dose-dependent manner, both in initiation and post-initiation stages of colon carcinogenesis. Moreover, the activities of  $\beta$ -glucuronidase and mucinase were significantly decreased. An increase in  $\beta$ -glucuronidase activity may augment the hydrolysis of glucuronide conjugates, liberating toxins, while an increase in the mucinase activity may enhance hydrolysis of protective mucins in the colon. Thus, according to these results, authors concluded that luteolin exerts chemopreventive and anticarcinogenic effects against DMH induced colon cancer. Effects of the *Perilla* leaf extract and luteolin, its main active component, on skin papillomas in mice, induced by dimethylbenz-[a]-anthracene (DMBA) and tissue plasminogen activator (TPA), were also investigated (Ueda *et al.*, 2003). Topical application of *Perilla* leaf extract prior to TPA resulted in a significant reduction in tumor incidence and multiplicity. An even more potent preventive effect was observed after the topical application of 1  $\mu$ g luteolin.

The cancer-preventive effects of the flavonol quercetin have also been extensively studied. These effects have been attributed to various mechanisms including their antioxidant activity, the inhibition of enzymes that activate carcinogens, the modification of signal transduction pathways as well as the interactions with receptors and other proteins

(CanivencLavier *et al.*, 1996; Shih *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2006). There are numerous reports on quercetin effects on the process of carcinogenesis. For instance, administration of a diet containing 2% quercetin to Swiss albino mice during four weeks markedly reduces the chromosomal aberrations induced by 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene (DMBA) in the bone marrow, a predictor of future cancer risk (Sengupta *et al.*, 2001). Volate and coworkers (Volate *et al.*, 2005) administered a carcinogen, azoxymethane, to rats and fed them with 0-3% quercetin or rutin, 3-rutinoside of quercetin. They found that the formation of aberrant crypt foci, a histological colon tumor marker, was markedly suppressed by quercetin, but not by rutin. This observation has been supported by results obtained by Dihal and coworkers (Dihal *et al.*, 2006). Quercetin is not only active as preventive agent in the colon cancer, but several organs, including tongue, breast, lung and skin seem to be target sites for this flavonol (Kato *et al.*, 1983; Verma *et al.*, 1988; Khanduja *et al.*, 1999).

The flavonol myricetin has also been studied in several cancer cell lines. For example, its protective effects against the DNA damage induced by some mutagenic and carcinogenic compounds present in the environment such as *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR) and benzo( $\alpha$ )pyrene (BaP), have been analysed in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) (Delgado *et al.*, 2008). Myricetin and quercetin decreased DNA strand breaks and oxidized pyrimidines induced by NDMA, but not oxidized purines. However, both myricetin and quercetin were capable to reduce oxidized pyrimidines and purines induced by NPYR thereby indicating that they are able to protect human derived cells against DNA strand breaks and oxidative DNA damage caused by some carcinogenic compounds present in the environment (Delgado *et al.*, 2008).

Upregulated cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in epidermis is involved in the development of skin cancer. Myricetin can inhibit the UVB-induced COX-2 expression in mouse skin epidermal JB6 P<sup>+</sup> cells (Jung *et al.*, 2008). This effect was also found by Lee and coworkers on phorbol ester-induced COX-2 expression in the same type of cells (Lee *et al.*, 2007). The activation of activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) induced by UVB was dose-dependently inhibited by myricetin treatment (Jung *et al.*, 2008). Moreover, this flavonol can suppress the Fyn kinase activity, a non receptor tyrosine kinase that plays a critical role in the development of skin cancer (Calautti *et al.*,

1995). Myricetin displays this effect similarly to 4-amino-5-(4-chloro-phenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*] pyrimidine, a well-known pharmacologic inhibitor of Fyn. *In vivo* mouse skin data also reveals that myricetin inhibits Fyn kinase activity directly and subsequently attenuates the UVB-induced COX-2 expression (Jung *et al.*, 2008). Overall, mouse skin tumorigenesis data clearly show that pretreatment with myricetin significantly suppresses UVB-induced skin tumor incidence in a dose-dependent manner.

### *Stilbenes*

*In vivo* data show that stilbene resveratrol can block the three stages of carcinogenesis: initiation, promotion and progression (Jang *et al.*, 1997). Topical application of resveratrol reduced the number of skin tumours in mouse by up 98%. Systemic administration of resveratrol has been shown to inhibit the initiation and growth of tumours in a wide variety of rodent cancer models. The efficacy of low doses ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , daily) in a rat model of cancer carcinogenesis (Tessitore *et al.*, 2000) suggests that the concentration of resveratrol obtained from dietary sources could be therapeutic. At higher, but pharmacologically acceptable doses, protective effects of resveratrol are more frequently observed. For instance, a daily dose of 40 mg per kg increased the survival of mice with subcutaneous neuroblastomas from 0% to 70% (Chen *et al.*, 2004). Although this substantiates its claim as a chemotherapeutic agent, its prophylactic activity remains to be defined (Bove *et al.*, 2002).

Resveratrol has the unique ability of targeting a number of cancers via a multitude of pathways. In colon carcinoma cells, resveratrol can decrease their migration, adhesion and invasion by decreasing the expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloprotease-9 under hypoxic conditions (Wu *et al.*, 2008). Resveratrol has also been shown to induce the expression of the nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1, a member of the TGF- $\beta$  superfamily, via p53 activity, thereby inducing cell death which account for its antitumorigenic effects (Baek *et al.*, 2002). It can also induce cell death via cell cycle deregulation or depletion of prosurvival proteins through p53 independent mechanisms (Mahyar-Roemer *et al.*, 2001). Resveratrol appears to be an efficient cell-death sensitizer, as demonstrated when it was administered with classic drug such as 5-fluorouracil, sensitizing a number of cell lines to this drug (Wu *et al.*, 2004). Additionally, it

can sensitize HeLa, K-562 and IM-9 cells to death after treatment with 0-8 Gy of x-rays (Baatout *et al.*, 2005). Apparently, it can also enhance the cytotoxic response of ionizing radiation in cell lines. For instance, DU 145 cells (resistant to ionizing radiation-induced cell death) pre-treated with resveratrol undergo a significant increase of cell death (Scarlati *et al.*, 2007). The action of resveratrol *in vitro* seems to be cell specific, as it is toxic to tongue squamous carcinoma, more so than to gingival fibroblasts (Babich *et al.*, 2000) and to leukemia cells, but not to normal hematopoietic progenitors or peripheral blood lymphocytes (Billard *et al.*, 2002). This is a very important characteristic since the lack of cell specificity nuances the treatment of malignancies.

### *Lignans*

The relation between the consumption of phytoestrogens-rich foods such as whole grain products, which contain lignans, and the prevention of breast, prostate, and colon cancers has been proposed (Cassidy *et al.*, 2000). Phytoestrogens such as isoflavones and lignans share common structural features with the mammalian oestrogen 17-oestradiol, enabling them to bind to the oestrogen receptor. Because their structural characteristics, they may compete with estrogens for binding to estrogen receptors (ERs) thereby acting as weak oestrogen agonists or antagonists (Touillaud *et al.*, 2007). Therefore, phytoestrogens can act as selective oestrogen receptor modulators (SERMs). Additionally, they can play a role in the chemoprevention against various cancers (Touillaud *et al.*, 2007). Phytoestrogens may also act through the regulation of other growth hormones such as insulin-like growth factor (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF), in concert with estrogens or independently with them (Webb *et al.*, 2007). Lignans have also demonstrated to be chemopreventive via their free radical scavenging activity (Webb *et al.*, 2007). Furthermore, lignans possess an anti-proliferative and pro-apoptotic potential (Schultze-Mosgau *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1998).

The lignans from forest resources of special interest are pinoresinol, lariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol and hydroxymatairesinol. Indeed, they are precursors of the mammalian lignans enterodiol and enterolactone (Heinonen *et al.*, 2001). Pinoresinol can be converted to lariciresinol and further metabolized to secoisolariciresinol and



matairesinol, which are converted to enterodiol and enterolactone in the large bowel (Adlercreutz, 2007).

Numerous studies support the role of lignans in preventing breast, prostate and colon cancer, but perhaps the most convincing evidence for the role of lignans in the prevention of cancer comes from research on breast cancer (Webb *et al.*, 2007). Some epidemiological studies have supported an inverse negative association between lignan intake and breast cancer risk (Dai *et al.*, 2002; Ingram *et al.*, 1997; Linseisen *et al.*, 2004; McCann *et al.*, 2002; McCann *et al.*, 2004). An increased intake of matairesinol, but not of secoisolariciresinol and consequently of enterolactone and enterodiol was significantly associated with a reduced breast cancer risk in German premenopausal women (Linseisen *et al.*, 2004). High enterolactone and enterodiol intake ( $> 0.67$  mg/day), was also associated with lower premenopausal breast cancer risk. However, associations were not statistically significant for postmenopausal breast cancer (McCann *et al.*, 2002). Similarly, another case-control study showed a significant reduction in breast cancer risk which was associated with an increased intake of lignans among premenopausal women (McCann *et al.*, 2004). In a population-based case-control study, higher urinary excretion of enterolactone was significantly associated with a decreased risk of breast cancer (Ingram *et al.*, 1997). Other population-based case-control study performed in China showed a significant decrease in breast cancer risk, which was related to a greater total lignan enterolactone and enterodiol excretion (Dai *et al.*, 2002).

Results of animal and *in vitro* studies have not always shown the inhibitory lignan role in breast cancer. For instance, in a study conducted in breast cancer cell lines, lignans stimulated the cell growth, and the effect could be blocked by the antiestrogen tamoxifen (Pettersson and Gustafsson, 2001). However, injected lignans and 10% flaxseed in the diet of ovariectomized nude mice with human breast cancer xenografts, inhibited estradiol-induced growth of the tumors (Jungstrom *et al.*, 2007). These divergent results have been difficult to explain, but it has been suggested that the effect of exogenous weak estrogens may be either agonistic or antagonistic depending on the level of endogenous estrogens (Adlercreutz, 2007). Furthermore, biphasic effects of enterolactone have been demonstrated using human breast cancer cell lines, where low concentrations stimulate DNA synthesis

whereas high concentrations inhibit it (Whitten *et al.*, 1991). Additionally, it has been found that matairesinol, enterolactone and enterodiol are able to bind the estradiol-binding nuclear type II sites (Adlercreutz *et al.*, 1992), a component of the genome that regulates estrogen-stimulated growth (Markaverich *et al.*, 1981). Therefore, it has been postulated that the antiproliferative and antiestrogenic effects of lignans could be mediated via these binding sites (Adlercreutz, 2007).

As to colon carcinogenesis, most of studies investigating the role of lignans have been either *in vitro* or animal based. In a study performed using four colon cancer cell lines (LS174T, Caco-2, HCT-15, and T-84) enterolactone and enterodiol at 100- $\mu$ M showed estrogen-independent growth inhibitory effects (Sung *et al.*, 1998). Supplementation of mutagenized Sprague-Dawley rats with 10–30% rye (Davies *et al.*, 1999; Mutanen *et al.*, 2000) or 5–10% flaxseed (Serraino and Thompson, 1992) was associated with significantly reduced aberrant crypt foci and tumor number, compared with nonsupplemented groups (Davies *et al.*, 1999; Serraino and Thompson, 1992). Administration of purified hydroxymatairesinol (0.02%) in the basal diet of mutagenized Apc<sup>Min</sup> mice caused a significant reduction of number of adenomas and normalized  $\beta$ -catenin levels compared with mice fed rye or basal diet (Oikannen *et al.*, 2000).

Studies of colon carcinogenesis in humans have mainly evaluated the influence of dietary intake of lignan-rich foods on the behaviour of potential intermediate markers of colon carcinogenesis. In a randomized cross-over trial, subjects (17 middle-aged Finnish men and women) were fed during 4 weeks with either whole meal rye or white wheat bread as 20% of their daily energy intake (Grasten *et al.*, 2000). Consumption of the whole meal rye bread (RBP) was associated with a high fecal wet weight and fecal frequency as well as with a low fecal total bile excretion. In men, RBP was associated with a decreased transit time, lower  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -glucosidase activities, increased fecal butyrate concentrations, and increased concentration of chenodeoxycholic acid. In women, RBP was associated with a higher urease activity, a higher proportion of cholic acid, a lower proportion of secondary bile acids, and a lower lithocolic acid/chenodeoxycholic acid ratio. No differences were seen between rye and white wheat with respect to fecal total short chain fatty acids, diacylglycerol concentration, or ammonia concentration.

Studies of lignan intake and prostate cancer remain scarce compared to those using populations affected with breast and colon cancer. Administration of enterolactone and enterodiol *in vitro* inhibited the growth of the prostatic cancer cell lines (PC-3, LNCaP), while enterolactone alone inhibited the growth of the DU-145 prostatic cancer cell line (Lin *et al.*, 2000). Animal studies in Dunning rats with established R3327 prostatic tumors, demonstrated that supplementation with either soy or rye as 33% of the diet significantly retarded the tumor growth compared with controls (Zhang *et al.*, 1997). Early cross-sectional studies showed that Finnish men with similar fat intakes as Western men had a lower incidence of prostate cancer. It was then speculated that this low risk was due to an increased intake of lignans, primarily in the form of rye breads (Adlercreutz, 1998). Because the prostate's growth is dependent on testosterone, it was hypothesized that the anti-estrogenic nature of lignans makes them a prime candidate for reducing prostate cancer risk (Griffiths *et al.*, 1998). Moreover, it has been suggested that the abilities of lignans to inhibit aromatase, to increase the production of steroid hormones, and to compete for the estrogen receptor- $\beta$  can decrease the androgenic effects of testosterone on the prostate (Griffiths *et al.*, 1998).

Overall, it is possible to conclude that although some *in vitro*, animal and epidemiological studies support a role for lignan-rich foods and purified lignans in the modulation of breast, prostate and colon cancer, additional studies are needed to adequately establish the role of lignans in cancer prevention.

## Conclusions

The same bioactive polyphenols that are found in the healthy diets are also available from the forest biomass and they are commonly classified as flavonoid and non-flavonoid polyphenols. Among the latter the stilbenes and the lignans are potentially available from knotwood from conifer wood species in which they are present in high concentrations. Hydroxymatairesinol from knotwood of Norway spruce (*Picea abies*) has been developed in form of food supplement in Finland. The various classes of flavonoids are common constituents of many fruits and vegetables and they also seem to accumulate in knotwood, among hardwood genera studied so far: *Populus*, *Salix* and *Acacia*. They also accompany the condensed tannins in the polyphenols rich heartwoods of several *Acacia* species. The

best studied class of flavonoid-related polyphenols are the proanthocyanidins from conifer barks. The maritime pine proanthocyanidins have been developed in form of dietary supplements and cosmetic products. Our results on black spruce bark proanthocyanidin indicate to their structural particularities, while their good antioxidant and anti-inflammatory capacities indicate to the potential of their application for the development of new products in food, cosmetic and nutraceutical sectors.

A series of studies has been devoted to screening the antioxidant properties of woody-plant extracts using different well established *in vitro* and *in vivo* assays. The reducing capacity of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity. A series of studies have reported the strong reducing power of woody-plant extracts. The French maritime pine (*Pinus maritima* or *P. pinaster*) bark extract has been proven to be the most successful natural antioxidant from forest trees so far studied. Several studies have evaluated its potential application as functional ingredient of food products by measuring its efficiency as free radical scavengers, inhibitors of lipid peroxidation and protectors of endogenous antioxidants. Widely used in pharmacology and cosmetology or as a food supplement, it has been proven to be an effective antioxidant both *in vitro* and *in vivo*. It has been demonstrated in several studies that the potential antioxidant capacity of an extract is essentially related to its polyphenolic content, which has most often been determined as total phenols, but the specific molecular composition seems also to be important. The overall mechanism of antioxidant activity of natural extracts from forest trees is usually more complex than that of individual constituents studied as model compounds, due to interaction of different constituents of the extract mixture. Thus, the antioxidant capacity of natural extracts should be related to the total phenols content, to the types of the phenolic compounds present in the extracts and to the synergism between these polyphenols, but also to some non-phenolic compounds present in the extracts, which could also have antioxidant capacity.

Large amount of encouraging data from *in vitro* and animal models clearly demonstrate that consumption of diets rich in plant polyphenols is associated with beneficial health effects. There are investigations that demonstrate the positive effects on the health of several polyphenols that are also present in forest resources. Epidemiological studies suggest that

the consumption of flavonoid-rich diets decreases the risk of cardiovascular diseases by improvement of coronary vasodilatation; by prevention of low-density lipoproteins (LDLs) oxidation and by decrease of the platelet ability in the blood to clot. Some of the flavonoids having positive effects on the cardiovascular system are present in forest resources, particularly in leaves. Such is the case of quercetin and myricetin. Additionally, flavonoids such as taxifolin, luteolin, quercetin and myricetin are able to inhibit different processes involved in cancer development.

Proanthocyanidins from the bark of French maritime pine produce a dose-dependent reduction of the immunosuppression and inflammatory sunburn reaction and have demonstrated to be extremely effective in protecting neuronal cells from glutamate-induced cytotoxicity. Lignans such as pinoresinol, lariciresinol, secoisolariciresinol, matairesinol and hydroxymatairesinol, widely present in forest resources, possess antiproliferative and pro-apoptotic potential and are considered as phytoestrogens. Therefore, they have been hypothesized to behave like selective oestrogen receptor modulators and to play a role in the chemoprevention against various cancers.

The stilben resveratrol appears to be an excellent cardioprotective agent. Indeed, it has the ability to act as antiplatelet, disrupt prostanoid synthesis and regulate lipoprotein metabolism. *In vivo* data also show that this stilbene can block the three stages of carcinogenesis: initiation, promotion and progression.

We have demonstrated throughout this review that the same plant polyphenols which are attributed health benefits from consumption of vegetables, fruits, cocoa and tea beverages, are found in different parts of forest trees. Some parts of forest trees are particularly rich sources of polyphenols, as has been demonstrated for barks and knotwood of several industrial wood species, which make these tissues interesting raw materials. With the development of biorefinery approach to the forest biomass transformation, the extraction of residues such as barks and knotwood could be integrated into existing wood industry processes (pulp mills, sawmills, etc.) in order to add value to the wood transformation.

Overall, we can conclude that forest biomass and the residues of wood transformation in particular are the important natural resources of bioactive polyphenols, which have a real

potential to be used as raw materials for the development of food supplements, functional foods or pharmaceutical products which can enhance the animal and human health.

## References

- Adlercreutz, H. (2002). Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol*, **3**, 364-373.
- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **44**, 483-525.
- Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., *et al.* (1992). Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **41**, 331-337.
- Adlercreutz, M. (1998). Epidemiology of phytoestrogens. *Bailliere Clin Endocrinol Metabol*, **12**, 605-623.
- Ahmad, A.S., Ansari, M.A., Ahmad, M., *et al.* (2005). Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol Biochem Behav*, **81**, 805-813.
- Ahn, J.H., Grun, I.U., and Mustapha, A. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. *J Food Prot*, **67**, 148-155.
- Ahn, J., Grun, I.U., and Fernando, L.N. (2002). Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *J Food Sci*, **67**, 1364-1369.
- Ahn, J., Grun, I.U., and Mustapha, A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiol*, **24**, 7-14.
- Almeida, I.F., Fernandes, E., Lima, J., Costa, P.C., and Bahia, M.F. (2008a). Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chem*, **106**, 1014-20.
- Almeida, I.F., Fernandes, E., Lima, J., Costa, P.C., and Bahia, M.F. (2008b). Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. *J Photochem Photobiol B-Biol*, **91**, 87-95.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., and Trinajstic, N. (2007). SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med Chem*, **14**, 827-845.
- Andriambelason, E., Kleschyov, A.L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J.C., and Andriantsitohaina, R. (1997). Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol*, **120**, 1053-1058.
- Andriambelason, E., Magnier, C., Haan-Archipoff, G., *et al.* (1998). Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr*, **128**, 2324-33.

- Ansari, M.A., Keller, J.N., and Scheff, S.W. (2008). Protective effect of Pycnogenol in human neuroblastoma SH-SY5Y cells following acrolein-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*, **45**, 1510-1519.
- Aoi, W., Niisato, N., Miyazaki, H., and Marunaka, Y. (2004). Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Comm*, **315**, 892-896.
- Assimopoulou, A.N., Zlatanov, S.N., and Papageorgiou, V.P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chem*, **92**, 721-7.
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., and Monzani, A. (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J Food Compos Anal*, **10**, 166-172.
- Baatout, S., Derradji, H., Jacquet, P., and Mergeay, M. (2005). Increased radiation sensitivity of an eosinophilic cell line following treatment with epigallocatechin-gallate, resveratrol and curcuma. *Int J Mol Med*, **15**, 337-52.
- Babich, H., Reisbaum, A.G., and Zuckerbraun, H.L. (2000). *In vitro* response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicol Lett*, **114**, 143-153.
- Baek, S.J., Wilson, L.C., and Eling, T.E. (2002). Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis*, **23**, 425-34.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., *et al.* (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, **148**, 187-197.
- Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A., and Aruoma, O.I. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J Sci Food Agric*, **84**, 1553-61.
- Balaban, M. (2004). Identification of the main phenolic compounds in wood of *Ceratonia siliqua* by GC-MS. *Phytochem Anal*, **15**, 385-8.
- Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, **99**, 191-203.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., and Sabatini, A.G. (2002). Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Z Naturforsch C*, **57**, 530-3.
- Bate-Smith, E.C. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. I. Dicotyledons. *J Linn Soc Lond Bot*, **58**, 95-173.



- Battino, M., Ferreiro, M.S., Armeni, T., *et al.* (2005). In vitro antioxidant activities of antioxidant-enriched toothpastes. *Free Radic Res*, **39**, 343-350.
- Barreira, J.C.M., Ferreira, I., Oliveira, M., and Pereira, J.A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chem*, **107**, 1106-13.
- Bayeta, E., and Lau, B.H.S. (2000). Pycnogenol inhibits generation of inflammatory mediators in macrophages. *Nutr Res*, **20**, 249-259.
- Barry, K.M., Mihara, R., Davies, N.W., Mitsunaga, T., and Mohammed, C.L. (2005). Polyphenols in *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* heartwood with reference to heart rot susceptibility. *J Wood Sci*, **51**, 615-21.
- Becker, E.M., Ntouma, G., and Skibsted, L.H. (2007). Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation. *Food Chem*, **103**, 1288-96
- Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., and Robards, K. (2009). Analytical approaches to the determination of simple biophenols in forest trees such as *Acer* (maple), *Betula* (birch), *Coniferus*, *Eucalyptus*, *Juniperus* (cedar), *Picea* (spruce) and *Quercus* (oak). *Analyst*, **130**, 809-823.
- Bengoechea, L., Hernandez, T., Quesada, C., Bartolome, B., Estrella, I., and Gomez-Cordoves, C. (1995). Structure of hydroxycinnamic acid-derivatives established by high-performance liquid-chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia*, **41**, 94-8.
- Bento, M.F.S., Pereira, H., Cunha, M.A., Moutinho, A.M.C., van den Berg, K.J., and Boon, J.J. (2001). A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC-MS. *J Anal Appl Pyrolysis*, **57**, 45-55.
- Bernards, M.A. (2002). Demystifying suberin. *Can J Bot-Rev Can Bot*, **80**, 227-240.
- Bertelli, A.A.E., Baccalini, R., Battaglia, E., Falchi, M., and Ferrero, M.E. (2001). Resveratrol inhibits TNF alpha-induced endothelial cell activation. *Therapie*, **56**, 613-616.
- Billard, C., Izard, J.C., Roman, V., *et al.* (2002). Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk Lymphoma*, **43**, 1991-2002.
- Bohlin, L., and Rosen, B. (1996). Podophyllotoxin derivatives: Drug discovery and development. *Drug Discov Today*, **1**, 343-51.
- Bonello, P., Storer, A.J., Gordon, T.R., and Wood, D.L. (2003). Systemic effects of *Heterobasidion annosum* on ferulic acid glucoside and lignin of presymptomatic

- ponderosa pine phloem, and potential effects on bark-beetle-associated fungi. *J Chem Ecol*, **29**, 1167-82.
- Bonnely, S., Peyrat-Maillard, M.N., Rondini, L., Masy, D., and Berset, C. (2000). Antioxidant activity of malt rootlet extracts. *J Agric Food Chem*, **48**, 2785-2792.
- Boots, A.W., Haenen, G., and Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, **585**, 325-37.
- Botterweck, A.A.M., Verhagen, H., Goldbohm, R.A., Kleinjans, J., and van den Brandt, P.A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food Chem Toxicol*, **38**, 599-605.
- Bouhlef, I., Valenti, K., Kilani, S., *et al.* (2008). Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of Acacia salicina extracts (ASE) and modulation of cell gene expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ASE treatment. *Toxicol Vitro*, **22**, 1264-72.
- Bove, K., Lincoln, D.W., and Tsan, M.F. (2002). Effect of resveratrol on growth of 4T1 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 1001-5.
- Brusselmans, K., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. (2003). Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Cancer*, **106**, 856-62.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem*, **280**, 5636-5645.
- Bucciarelli, B., Jung, H.G., Ostry, M.E., Anderson, N.A., and Vance, C.P. (1998) Wound response characteristics as related to phenylpropanoid enzyme activity and lignin deposition in resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). *Can J Bot-Rev Can Bot*, **76**, 1282-1289.
- Buluc, M., and Demirel-Yilmaz, E. (2006). Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium. *Vasc Pharmacol*, **44**, 231-237.
- Butterfield, D.A., Howard, B., Yatin, S., *et al.* (1999). Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sci*, **65**, 1883-92.
- Buz'Zard, A.R., Peng, Q.L., and Lau, B.H.S. (2002). Kyolic (R) and Pycnogenol (R) increase human growth hormone secretion in genetically-engineered keratinocytes. *Growth Horm IGF Res*, **12**, 34-40.

- Cadahia, E., Conde, E., GarciaVallejo, M.C., and de Simon, B.F. (1997). Tannin composition of *Eucalyptus camaldulensis*, E-globulus and E-rudis 1 Wood. *Holzforschung*, **51**, 119-24.
- Cadahia, E., Varea, S., Munoz, L., de Simon, B.F., and Garcia-Vallejo, M.C. (2001). Evolution of ellagitannins in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *J Agric Food Chem*, **49**, 3677-3684.
- Calautti, E., Missero, C., Stein, P.L., Ezzell, R.M., and Dotto, G.P. (1995). Fyn tyrosine kinase is involved in keratinocyte differentiation control. *Genes Dev*, **9**, 2279-91.
- Cals-Grierson, M.M., and Ormerod, A.D. (2004). Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide-Biol Chem*, **10**, 179-93.
- CanivencLavier, M.C., Vernevaut, M.F., Totis, M., Siess, M.H., Magdalou, J., and Suschetet, M. (1996) Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*, **114**, 19-27.
- Cassidy, A., Hanley, B., and Lamuela-Raventos, R.M. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric*, **80**, 1044-62.
- Castro, E., Conde, E., Moure, A, *et al.* (2008). Antioxidant activity of liquors from steam explosion of *Olea europea* wood. *Wood Sci Technol*, **42**, 579-592.
- Cefarelli, G., D'Abrosca, B., Fiorentino, A., *et al.* (2006). Free-radical-scavenging and antioxidant activities of secondary metabolites from reddened Cv. Annurca apple fruits. *J Agric Food Chem*, **54**, 803-809.
- Chang, J.S., Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Kuo, Y.C., Chiang, L.C., and Lin, C.C. (2005). Increase of Bax/Bcl-X-L ratio and arrest of cell cycle by luteolin in immortalized human hepatoma cell line. *Life Sci*, **76**, 1883-93.
- Chang, S.T., Wu, J.H., Wang, S.Y., Kang, P.L., Yang, N.S., and Shyur, L.F. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem*, **49**, 3420-4.
- Chao, H.H., Juan, S.H., Liu, J.C., *et al.* (2005). Resveratrol inhibits angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression and subsequent proliferation in rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, **515**, 1-9.
- Chatonnet, P., and Dubourdieu, D. (1998). Comparative study of the characteristics of American white oak (*Quercus alba*) and European oak (*Quercus petraea* and *Q-robur*) for production of barrels used in barrel aging of wines. *Am J Enol Vitic*, **49**, 79-85.
- Chen, Y., Tseng, S.H., Lai, H.S., and Chen, W.J. (2004). Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Surgery*, **136**, 57-66.

- Cho, K.J., Yun, C.H., Yoon, D.Y., *et al.* (2000). Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol Appl Pharmacol*, **168**, 64-71.
- Cho, H.S., Lee, M.H., Lee, J.W., *et al.* (2007). Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **23**, 155-162.
- Choi, H.R., Choi, J.S., Han, Y.N., Bae, S.J., and Chung, H.Y. (2002). Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytother Res* 2002; 16: 364-7.
- Chovanova, Z., Muchova, J., Sivonova, M *et al.* (2006). Effect of polyphenolic extract, Pycnogenol®, on the level of 8-oxoguanine in children suffering from attention deficit/hyperactivity disorder. *Free Radic Res*, **40**, 1003-1010.
- Chung, M.I., Teng, C.M., Cheng, K.L., Ko, F.N., and Lin, C.N. (1992). An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*. *Planta Med*, **58**, 274-6.
- Claudot, A.C., Ernst, D., Sandermann, H., and Drouet, A. (1997). Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. *Planta*, **203**, 275-282.
- Clifford, M.N., and Scalbert, A. (2000). Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, **80**, 1118-1125.
- Clifford, M.N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric*, **80**, 1033-1043.
- Coetzee, J., Steynberg, J.P., Steynberg, P.J., Brandt, E.V., and Ferreira, D. (1995). Oligomeric flavonoids.18. Dimeric Prorobinetinidins from *Robina pseudacacia*. *Tetrahedron*, **51**, 2339-52.
- Conde, E., Cadahia, E., Garcivallejo, M., and Tomasbarberan, F. (1995). Low-molecular-weight polyphenols in wood and bark of *Eucalyptus globulus*. *Wood Fiber Sci*, **27**, 379-383.
- Conde, E., Cadahia, E., and Garcia-Vallejo, M.C. (1997). Low molecular weight polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E-globulus* and *E-rudis*. *Phytochem Anal*, **8**, 186-193.
- Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Berghe, D.V., Pieters, L., and Vlietinck, A.J. (2003). Phytoestrogens: Recent developments. *Planta Med*, **69**, 589-599.
- Coyle, J.T., and Puttfarcken, P. (2003). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, **262**, 689-95.

- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000). In: Buchanan B GW Ed, Jones R Ed, Biochemistry & Molecular Biology of Plants. New York, American Society of Plant Biologists. 1250-318.
- Cruz, J.M., Dominguez, J.M., Dominguez, H., and Parajo, J.C. (2001). Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *J Agric Food Chem*, **49**, 2459-2464.
- Cruz, J.M., Dominguez, J.M., Dominguez, H., and Parajo, J.C. (1999). Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. *Food Chem*, **67**, 147-153.
- Cui, Y.Y., Xie, H., and Wang, J.F. (2005). Potential biomedical properties of *Pinus massoniana* bark extract. *Phytother Res*, **19**, 34-38.
- Da Silva, E.G., Behr, G.A., Zanotto, A, *et al.* (2007). Antioxidant activities and free radical scavenging potential of Bauhinia microstachya (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biol Pharm Bull*, **30**, 1488-1496.
- Dai, Q., Franke, A.A., Jin, F., *et al.* (2002). Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, **11**, 815-21.
- Damayanthi, Y., and Lown, J.W. (1998). Podophyllotoxins: Current status and recent developments. *Curr Med Chem*, **5**, 205-52.
- Dasgupta, N., and De B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chem*, **101**, 471-4.
- Davies, M.J., Bowey, E.A., Adlercreutz, H., Rowland, I.R., and Rumsby, P.C. (1999). Effects of soy or rye supplementation of high-fat diets on colon tumour development in azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis*, **20**, 927-931.
- Davin, L.B., and Lewis, N.G. (2000). Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol*, **123**, 453-461.
- Davin, L.B., Wang, H.B., Crowell, A.L, *et al.* (1997). Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science*, **275**, 362-366.
- Delgado, M.E., Haza, A.I., Arranz, N., Garcia, A., and Morales, P. (2008). Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *Eur J Nutr*, **47**, 479-90.

- Devaraj, S., Vega-Lopez, S., Kaul, N., Schonlau, F., Rohdewald, P., and Jialal, I. (2002). Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids*, **37**, 931-934.
- Dewhalley, C.V., Rankin, S.M., Hout, J.R.S., Jessup, W., and Leake, D.S. (1990). Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol*, **39**, 1743-1750.
- Dihal, A.A., de Boer, V.C.J., van der Woude, H, *et al.* (2006). Quercetin, but not its glycosidated conjugate rutin, inhibits azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in F344 rats. *J Nutr*, **136**, 2862-2867.
- Diouf, P.N., Stevanovic, T., and Cloutier, A. (2009). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chem*, **113**, 897-902.
- Diouf, P.N., Stevanovic, T., and Cloutier, A. (2009). Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts. *Wood Sci Technol*, **43**, 457-470.
- Duarte, J., PerezVizcaino, F., Zarzuelo, A., Jimenez, J., and Tamargo, J. (1993). Vasodilator effects of quercetin on isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, **239**, 1-7.
- Duarte, J., Vizcaino, F.P., Utrilla, P., Jimenez, J., Tamargo, J., and Zarzuelo, A. (1993). Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol*, **24**, 857-862.
- Duarte, J., Perez-Palencia, R., Vargas, F., *et al.* (2001). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, **133**, 117-124.
- Dvorakova, M., Sivonova, M., Trebaticka, J., *et al.* (2006). The effect of polyphenolic extract from pine bark, Pycnogenol®, on the level of glutathione in children suffering from attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Redox Rep*, **11**, 163-172.
- Edwards, R.L., Lyon, T., Litwin, S.E., Rabovsky, A., Symons, J.D., and Jalili, T. (2007). Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr*, **137**, 2405-2411.
- Eklund, P.C., Riska, A.I., and Sjöholm, R.E. (2002). Synthesis of R-(-)-imperanene from the natural lignan hydroxymatairesinol. *J Org Chem*, **67**, 7544-7546.
- Eklund, P., Lindholm, A., Mikkola, J.P., Smeds, A., Lehtila, R., and Sjöholm, R. (2003). Synthesis of (-)-matairesinol, (-)-enterolactone, and (-)-enterodiol from the natural lignan hydroxymatairesinol. *Org Lett*, **5**, 491-493.

- Eklund, P.C., and Sjöholm, R.E. (2003). Oxidative transformation of the natural lignan hydroxymatairesinol with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone. *Tetrahedron*, **59**, 4515-4523.
- Eklund, P.C., Langvik, O.K., Warna, J.P., Salmi, T.O., Willfor, S.M., and Sjöholm, R.E. (2005). Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org Biomol Chem*, **3**, 3336-47.
- Erlejman, A.G., Verstraeten, S.V., Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. (2004). The interaction of flavonoids with membranes: Potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic Res*, **38**, 1311-1320.
- Falah, S., Katayama, T., and Suzuki, T. (2008). Chemical constituents from *Gmelina arborea* bark and their antioxidant activity. *J Wood Sci*, **54**, 483-489.
- Fang, J., Zhou, Q., Shi, X.L., and Jiang, B.H. (2007). Luteolin inhibits insulin-like growth factor 1 receptor signaling in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, **28**, 713-23.
- Ferreira, D., and Slade, D. (2002). Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Nat Prod Rep*, **19**, 517-541.
- Ferreira, D., Marais, J.P.J., and Slade, D. (2005). Heterogeneity of the interflavanyl bond in proanthocyanidins from natural sources lacking C-4(C-ring) deoxy flavonoid nucleophiles. *Phytochemistry*, **66**, 2216-2237.
- Fitzpatrick, D.F., Hirschfield, S.L., and Coffey, R.G. (1993). Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol*, **265**, H774-H778.
- Foo, L.Y. (1984) Condensed tannins, Co-occurrence of procyanidins, prodelphinidins and profisetinidins in the heartwood of *Acacia baileyana*. *Phytochemistry*, **23**, 2915-18.
- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M.T., and Ruberto, G. (1996). Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *J Agric Food Chem*, **44**, 497-501.
- Frankel, E.N., Huang, S.W., Kanner, J., and German, J.B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants-Bulk oils vs emulsions. *J Agric Food Chem*, **42**, 1054-1059.
- Frankel, E.N., and Meyer, A.S. (2007). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric*, **80**, 1925-1941.
- Fraser, M.H., Cuerrier, A., Haddad, P.S., Arnason, J.T., Owen, P.L., and Johns, T. (2007). Medicinal plants of Cree communities (Quebec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. *Can J Physiol Pharmacol*, **85**, 1200-1214.

- Freire, C.S.R, Silvestre, A.J.D., and Neto, C.P. (2002). Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid esters in the wood of *Eucalyptus globulus*. *Holzforschung*, **56**, 143-149.
- Fridrich, D., Glabasnia, A., Fritz, J, *et al.* (2008). Oak ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma cells. *J Agric Food Chem*, **56**, 3010-3015.
- Fuchino, H., Konishi, S., Satoh, T, *et al.* (1996). Chemical evaluation of *Betula* species in Japan .2. Constituents of *Betula platyphylla* var *japonica*. *Chem Pharm Bull*, **44**, 1033-1038.
- Fukuda, T., Ito, H., and Yoshida, T. (2003). Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry*, **63**, 795-801.
- Fulgenzi, A., Bertelli, A.A.E., Magni, E., Ferrero, E., and Ferrero, M.E. (2001). In vivo inhibition of TNF alpha-induced vascular permeability by resveratrol. *Transplant Proc*, **33**, 2341-2343.
- Galisteo, M., Garcia-Saura, M.F., Jimenez, R., *et al.* (2004). Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med*, **70**, 334-341.
- Gandin, V., Nystrom, C., Rundlof, A.K., *et al.* (2009). Effects of the antioxidant Pycnogenol® on cellular redox systems in U1285 human lung carcinoma cells. *Febs J*, **276**, 532-40.
- Gang, D.R., Costa, M.A., Fujita, M., *et al.* (1999). Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chem Biol*, **6**, 143-151.
- Gao, H., Shupe, T.F., Eberhardt, T.L., and Hse, C.Y. (2007). Antioxidant activity of extracts from the wood and bark of Port Orford cedar. *J Wood Sci*, **53**, 147-52.
- Garde-Cerdan, T., and Ancin-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends Food Sci Technol*, **17**, 438-447.
- Garrote, G., Cruz, J.M., Dominguez, H., and Parajo, J.C. (2003). Valorisation of waste fractions from autohydrolysis of selected lignocellulosic materials. *J Chem Technol Biotechnol*, **78**, 392-398.
- Glabasnia, A., and Hofmann, T. (2007). Identification and sensory evaluation of dehydro- and deoxy-ellagitannins formed upon toasting of oak wood (*Quercus alba* L.). *J Agric Food Chem*, **55**, 4109-4118.
- Glabasnia, A., and Hofmann, T. (2006). Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur*



- L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *J Agric Food Chem*, **54**, 3380-3390.
- Gonzalez, J., Cruz, J.M., Dominguez, H., and Parajo, J.C. (2004). Production of antioxidants from Eucalyptus globulus wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chem*, **84**, 243-51.
- Grasten, S.M., Juntunen, K.S., Poutanen, K.S., Gylling, H.K., Miettinen, T.A., and Mykkanen, H.M. (2000). Rye bread improves bowel function and decreases the concentrations of some compounds that are putative colon cancer risk markers in middle-aged women and men. *J Nutr*, **130**, 2215-2221.
- Griffiths, K., Denis, L., Turkes, A., and Morton, M.S. (1998). Phytoestrogens and diseases of the prostate gland. *Bailliere Clin Endocrinol Metabol*, **12**, 625-647.
- Grimm, T., Schafer, A., and Hogger, P. (2004). Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogonol). *Free Radic Biol Med*, **36**, 811-822.
- Guerrero, J.A., Navarro-Nunez, L., Lozano, M.L., *et al.* (2007). Flavonoids inhibit the platelet TxA(2) signalling pathway and antagonize TxA(2) receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells. *Br J Clin Pharmacol*, **64**, 133-144.
- Gulcin, I., Elias, R., Gepdiremen, A., and Boyer, L. (2006). Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Eur Food Res Technol*, **223**, 759-767.
- Gulcin, I., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., and Koksall, E. (2007). A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. *Afr J Biotechnol*, **6**, 410-8.
- Habiyaremye, I., Stevanovic-Janezic, T., Riedl, B., Garneau, F.X., and Jean, F.I. (2002). Pentacyclic triterpene constituents of yellow birch bark from Quebec. *J Wood Chem Technol*, **22**, 83-91.
- Han, R.M., Tian, Y.X., Liu, Y., *et al.* (2009). Comparison of Flavonoids and Isoflavonoids as Antioxidants. *J Agric Food Chem*, **57**, 3780-3785.
- Hanawa, F., Shiro, M., and Hayashi, Y. (1997). Heartwood constituents of *Betula maximowicziana*. *Phytochemistry*, **45**, 589-595.
- Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., *et al.* (2001). In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J Agric Food Chem*, **49**, 3178-3186.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, **342**, 1007-1011.

- Hiltunen, E., Pakkanen, T.T., and Alvila, L. (2006). Phenolic compounds in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. *Holzforschung*, **60**, 519-527.
- Hirobe, C., Qiao, Z.S., Takeya, K., and Itokawa, H. (1990). Cytotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry* 1997; **46**: 521-4. Iiyama K, Lam TBT, Stone BA. Phenolic-acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry*, **29**, 733-737.
- Hollman, P.C.H., and Arts, I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, **80**, 1081-1093.
- Hovelstad, H., Leirset, I., Oyaas, K., and Fiksdahl, A. (2006). Screening analyses of pinosylvin stilbenes, resin acids and lignans in Norwegian conifers. *Molecules*, **11**, 103-114.
- Huang, S.W., Hopia, A., Schwarz, K., Frankel, E.N., and German, J.B. (1996). Antioxidant activity of alpha-tocopherol and Trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem*, **44**, 444-452.
- Humphreys, F.R. (1964). The occurrence and industrial production of rutin in Southeastern Australia. *Econ Bot*, **18**, 195-253.
- Imbert, T.F. (1998). Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie*, **80**, 207-222.
- Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M., and Lopez, D. (1997). Case-control study of phytoestrogens and breast cancer. *Lancet*, **350**, 990-994.
- Ito, H., Okuda, T., Fukuda, T., Hatano, T., and Yoshida, T. (2007). Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnuts. *J Agric Food Chem*, **55**, 672-679.
- Jang, M.S., Cai, E.N., Udeani, G.O., *et al.* (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **275**, 218-220.
- Jeffery, E.H., and Keck, A.S. (2008). Translating knowledge generated by epidemiological and in vitro studies into dietary cancer prevention. *Mol Nutr Food Res*, **52**, S7-S17.
- Jerez, M., Pinelo, M., Sineiro, J., and Nunez, M.J. (2006). Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chem*, **94**, 406-414.
- Jerez, M., Selga, A., Sineiro, J., Torres, J.L., and Nunez, M.J. (2007). A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition. *Food Chem*, **100**, 439-444.
- Jia, Z.S., Zhou, B., Yang, L., Wu, L.M., and Liu, Z.L. (1998). Antioxidant synergism of tea polyphenols and alpha-tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution. *J Chem Soc-Perkin Trans*, **2**, 911-915.

- Jung, M.J., Chung, H.Y., Kang, S.S., Choi, J.H., Bae, K.S., and Choi, J.S. (2003). Antioxidant activity from the stem bark of *Albizia julibrissin*. *Arch Pharm Res* 2003; 26: 458-62.
- Jung, S.K., Lee, K.W., and Byun, S., *et al.* (2008). Myricetin suppresses UVB-induced skin cancer by targeting Fyn. *Cancer Res*, 68, 6021-6029.
- Jungstrom, M.B., Thompson, L.U., and Dabrosin, C. (2007). Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clin Cancer Res*, 13, 1061-1067.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., *et al.* (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 47, 3954-3962.
- Kalt, W., Ryan, D.A.J., Duy, J.C., Prior, R.L., Ehlenfeldt, M.K., and Vander Kloet, S.P. (2001). Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *J Agric Food Chem*, 49, 4761-4167.
- Kamada, C., Da Silva, E.L., Ohnishi-Kameyama, M., Moon, J.H., and Terao, J. (2005). Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res*, 39, 185-194.
- Kangas, L., Saarinen, N., Mutanen, M., *et al.* (2002). Antioxidant and antitumor effects of hydroxymatairesinol (HM-3000, HMR), a lignan isolated from the knots of spruce. *LWW*, S48-S57.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., and Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*, 94, 550-557.
- Kato, R., Nakadate, T., Yamamoto, S., and Sugimura, T. (1983). Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis*, 4, 1301-1305.
- Karathanos, V.T., Syrimbei, C., Chiou, A., Karathanos, A., and Makris, D.P. (2008). Evolution of benzoate derivatives and their hydroxycinnamate analogues during ageing of white wines in oak barrels. *J Food Compos Anal*, 21, 667-671.
- Kawai, Y., Nishikawa, T., Shiba, Y., *et al.* (2008). Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries - Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem*, 283, 9424-9434.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., and Yano, M. (1999). Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 896-899.

- Keinanen, M., Julkunen-Tiitto, R. (1996). Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics. *J Agric Food Chem*, **44**, 2724-2727.
- Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Pathania, V., and Syal, N. (1999). Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chem Toxicol*, **37**, 313-318.
- Kim, Y.J., Kang, K.S., and Yokozawa, T. (2008). The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. *Food Chem Toxicol*, **46**, 2466-2471.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., *et al.* (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*, **76**, 560-568.
- Knowles, L.M., Zigrossi, D.A., Tauber, R.A., Hightower, C., and Milner, J.A. (2000). Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutr Cancer*, **38**, 116-122.
- Kobayashi, M.S., Han, D., and Packer, L. (2000). Antioxidants and herbal extracts protect HT-4 neuronal cells against glutamate-induced cytotoxicity. *Free Radic Res*, **32**, 115-124.
- Ku, C.S., and Mun, S.P. (2008). Antioxidant properties of monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in hot water extract from *Pinus radiata* bark. *Wood Sci Technol*, **42**, 47-60.
- Ku, C.S., and Mun, S.P. (2008). Stabilization of extracellular matrix by *Pinus radiata* bark extracts with different molecular weight distribution against enzymatic degradation and radicals. *Wood Sci Technol*, **42**, 427-436.
- Ku, C.S., Jang, J.P., and Mun, S.P. (2007). Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *J Wood Sci*, **53**, 524-528.
- Kuhlmann, S., Kranz, K., Lücking, B., Alfermann, A.W., and Petersen, M. (2002). Aspects of cytotoxic lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Phytochemistry Rev*, **1**, 37-43.
- Kulkarni, A., Suzuki, S., and Etoh, H. (2008). Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. *J Wood Sci*, **54**, 153-157.
- Kumar, R.S., Sivakumar, T., Sunderam, R.S., *et al.* (2005). Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. *Brazilian J Med Biol Res*, **38**, 1015-1024.
- Kusumoto, D. (2005). Concentrations of lignin and wall-bound ferulic acid after wounding in the ploem of *Chamaecyparis obtusa*. *Trees Struct Funct*, **19**, 451-456.
- Kwak, C.S., Moon, S.C., and Lee, M.S. (2006). Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). *Nutr Cancer*, **56**, 162-171.

- Laitinen, M.L., Julkunen-Tiitto, R., and Rousi, M. (2000). Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *J Chem Ecol*, **26**, 1609-1622.
- Lantto, T.A., Dorman, H.J.D., Shikov, A.N., *et al.* (2009). Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chem*, **112**, 936-943.
- Lavoie, J.M., and Stevanovic, T. (2006). Yield and composition of lipophylic extracts of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) as a function of wood age and aging under industrial conditions. *Holzforschung*, **60**, 184-9.
- Lavoie, J.M., and Stevanovic, T. (2005). Variation of chemical composition of the lipophilic extracts from yellow birch (*Betula alleghaniensis*) foliage. *J Agric Food Chem*, **53**, 4747-4756.
- Lavoie, J.M., Stevanovic, T. (2007). Selective ultrasound-assisted extractions of lipophilic constituents from *Betula alleghaniensis* and *B-papyrifera* wood at low temperatures. *Phytochem Anal*, **18**, 291-9.
- Lee, B., and Moon, S.K. (2005). Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced proliferation and matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells. *J Nutr*, **135**, 2767-2773.
- Lee, S.B., Cha, K.H., Selenge, D., Solongo, A., and Nho, C.W. (2007). The chemopreventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene regulation. *Biol Pharm Bull*, **30**, 1074-1079.
- Lee, K.M., Kang, N.J., Han, J.H., Lee, K.W., and Lee, H.J. (2007). Myricetin down-regulates phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse epidermal cells by blocking activation of nuclear factor kappa B. *J Agric Food Chem*, **55**, 9678-9684.
- Leung, H.W.C., Wu, C.H., Lin, C.H., and Lee, H.Z. (2005). Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur J Pharmacol*, **508**, 77-83.
- Lewis, N.G., and Davin, L.B. (1999) In: Barton D Ed, Meth-Cohn O Ed, *Comprehensive Natural Products Chemistry*. London, Elsevier. 639-712.
- Li, L.M., and Levy-Milne, R. (2008). Vegetable and Fruit Intake And Factors Influencing their Intake. *Can J Diet Pract Res*, **69**, 213-217.
- Lim, D.Y., Jeong, Y., Tyner, A.L., and Park, J.H.Y. (2007). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Physiol-Gastroint Liver Physiol*, **292**, G66-G75.

- Lin, C.T., Chu, F.H., Tseng, Y.H., Tsai, J.B., Chang, S.T., and Wang, S.Y. (2007). Bioactivity investigation of *Lauraceae* trees grown in Taiwan. *Pharm Biol*, **45**, 638-644.
- Lin, L.Z., and Harnly, J.M. (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *J Agric Food Chem*, **55**, 1084-1096.
- Lin, X., Switzer, B.R., and Demark-Wahnefried, W. (2001). Effect of mammalian lignans on the growth of prostate cancer cell lines. *Anticancer Res*, **21**, 3995-3999.
- Lindberg, L.E., Willfor, S.M., and Holmbom, B.R. (2004). Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **31**, 137-147.
- Linseisen, J., Piller, R., Hermann, S., and Chang-Claude, J. (2004). Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Int J Cancer*, **110**, 284-290.
- Liu, F.J., Lau, B.H.S., Peng, Q.L., and Shah, V. (2000). Pycnogenol protects vascular endothelial cells from beta-amyloid-induced injury. *Biol Pharm Bull*, **23**, 735-737.
- Lopes, M.H., Gil, A.M., Silvestre, A.J.D., and Neto, C.P. (2000). Composition of suberin extracted upon gradual alkaline methanolysis of *Quercus suber* L. cork. *J Agric Food Chem*, **48**, 383-391.
- Lopez-Lopez, G., Moreno, L., Cogolludo, A., *et al.* (2004). Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol*, **65**, 851-859.
- Lou, H.X., Yamazaki, Y., Sasaki, T., Uchida, M., Tanaka, H., and Oka, S. (1999). A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry*, **51**, 297-308.
- Lu, H.F., Wu, H.C., Hsia, T.C., Chen, W.C., Hung, C.F., and Chung, J.G. (2002). Effects of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on DNA adduct formation and arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumour cells. *J Appl Toxicol*, **22**, 37-44.
- Mahyar-Roemer, M., Katsen, A., Mestres, P., and Roemer, K. (2001). Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and preceded by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. *Int J Cancer*, **94**, 615-622.
- Mammela, P. (2001). Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Analyst*, **126**, 1535-1538.
- Manach, C., Mazur, A., and Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol*, **16**, 77-84.

- Manju, V., and Nalini, N. (2007). Protective role of luteolin in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Cell Biochem Funct*, **25**, 189-194.
- Markaverich, B.M., and Alejandro, M.A. (1997). Bioflavonoids, type II [H-3]estradiol binding sites and prostatic cancer cell proliferation. *Int J Oncol*, **11**, 1311-1319.
- Markaverich, B.M., Upchurch, S., and Clark, J.H. (1981). Progesterone and dexamethasone antagonism of uterine growth: a role for a second nuclear binding site for estradiol in estrogen action. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **14**, 125-132.
- Markesbery, W.R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, **23**, 134-147.
- Masnec, I.S., and Poduje, S. (2008). Photoaging. *Collo Antropol*, **32**, 177-180.
- Mathew, S., and Abraham, T.E. (2006). Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chem*, **94**, 520-8.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I., Park, J.Y., Harima, S., and Yoshikawa, M. (2001). Antioxidant constituents from rhubarb: Structural requirements of stilbenes for the activity and structures of two new anthraquinone glucosides. *Bioorg Med Chem*, **9**, 41-50.
- McCann, S.E., Moysich, K.B., Freudenheim, J.L., Ambrosone, C.B., and Shields, P.G. (2002). The risk of breast cancer associated with dietary lignans differs by CYP17 genotype in women. *J Nutr*, **132**, 3036-3041.
- McCann, S.E., Muti, P., Vito, D., Edge, S.B., Trevisan, M., and Freudenheim, J.L. (2004). Dietary Lignan intakes and risk of pre- and postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer*, **111**, 440-443.
- Middleton, E., Kandaswami, C., and Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, **52**, 673-751.
- Mihara, R., Barry, K.M., Mohammed, C.L., and Mitsunaga, T. (2005). Comparison of antifungal and antioxidant activities of *Acacia mangium* and *A-auriculiformis* heartwood extracts. *J Chem Ecol*, **31**, 789-804.
- Miller, D.P., Howell, G.S., Michaelis, C.S., and Dickmann, D.I. (1992). The content of phenolic-acid and aldehyde flavor components of white oak as affected by site and species. *Am J Enol Vitic*, **43**, 333-8.
- Mojzisova, G., and Kuchta, M. (2001). Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiol Res*, **50**, 529-535.

- Mononen, K., Alvila, L., and Pakkanen, T.T. (2004). Effect of growth site type, felling season, storage time and kiln drying on contents and distributions of phenolic extractives and low molar mass carbohydrates in secondary xylem of silver birch *Betula pendula*. *Holzforschung*, **58**, 53-65.
- Moon, Y.J., Wang, X.D., and Morris, M.E. (2006). Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol Vitro*, **20**, 187-210.
- Moraes, R.M., Lata, H., Bedir, E., Maqbool, M., and Cushman, K. (2002). In: Whipkey JJ Ed, Whipkey A Ed, Trends in new crops and new uses. Alexandria, ASHS Press, 527-532.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., *et al.* (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, **72**, 145-171.
- Moure, A., Dominguez, H., and Parajo, J. (2005). Antioxidant activity of liquors from aqueous treatments of *Pinus radiata* wood. *Wood Sci Technol*, **39**, 129-139.
- Mutanen, M., Pajari, A.M., and Oikarinen, S.I. (2000). Beef induces and rye bran prevents the formation of intestinal polyps in Apc(Min) mice: relation to beta-catenin and PKC isozymes. *Carcinogenesis*, **21**, 1167-1173.
- Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., and Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation. *J Agric Food Chem*, **47**, 1453-1459.
- Neacsu, M., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E, *et al.* (2007). Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *Holz Als Roh-und Werkst*, **65**, 1-6.
- Nenadis, N., Zafiropoulou, I., and Tsimidou, M. (2003). Commonly used food antioxidants: a comparative study in dispersed systems. *Food Chem*, **82**, 403-407.
- Ngoc, T.M., Hung, T.M., Thuong, P.T., *et al.* (2008). Antioxidative activities of galloyl glucopyranosides from the stem-bark of *Juglans mandshurica*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72**, 2158-2163.
- Nonaka, G., Sakai, T., Tanaka, T., Mihashi, K., and Nishioka, I. (1990). Tannins and related compounds. Structure revision of C-glycosidic ellagitannins, castalagin, vescalagin, casuarinin and stachyurin, and related hydrolyzable tannins. *Chem Pharm Bull*, **38**, 2151-2156.
- Ohara, S., and Yanagi, K. (1995). Polyphenols in *Salix* species.1. Polyphenols from the bark of *Salix rorida* Lackschewitz. *Mokuzai Gakkaishi*, **41**, 406-413.
- Oikannen, S.I., Pajari, A.M., and Mutanen, M. (2000). Chemopreventive activity of hydroksymatairesinol in adenomatous polyposis colimultiple intestinal neoplasia (Apc)(Min) mice. *Cancer Lett*, **159**, 183-187.



- Olson, E.R., Naugle, J.E., Zhang, X.J., Bomser, J.A., and Meszaros, J.G. (2005). Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol*, **288**, H1131-H1138.
- Packer, L., Rimbach, G., and Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med*, **27**, 704-724.
- Pan, H.F., and Lundgren, L.N. (1994). Glycosides and phenyl glucoside esters from inner bark of *Betula Pubescens*. *Phytochemistry*, **36**, 79-83.
- Parajó, J.C., Domínguez, H., Moure, A., *et al.* (2008). Recovery of phenolic antioxidants released during hydrolytic treatments of agricultural and forest residues. *EJEAFChe*, **7**, 3243-3249.
- Pardo-Andreu, G.L., Paim, B.A., Castilho, R.F., *et al.* (2008). *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. *Pharmacol Res*, **57**, 332-338.
- Park, E.J., and Pezzuto, J.M. (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev*, **21**, 231-255.
- Pasch, H., Pizzi, A., and Rode, K. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins. *Polymer*, **42**, 7531-7539.
- Peng, Z.K., Hayasaka, Y., Iland, P.G., Sefton, M., Hoj, P., and Waters, E.J. (2001). Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*, **49**, 26-31.
- Peng, Q.L., Buz'Zard, A.R., and Lau, B.H.S. (2002). Pycnogenol<sup>®</sup> protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis. *Mol Brain Res*, **104**, 55-65.
- Perez-Bonilla, M., Salido, S., Van Beek, T.A., *et al.* (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *J Chromatogr A*, **1112**, 311-318.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., and Andriantsitohaina, R. (2006). Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res*, **40**, 1054-1065.
- Pettersson, K., and Gustafsson, J.A. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol*, **63**, 165-192.
- Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (2003). Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *J Am Oil Chem Soc*, **80**, 1007-1012.

- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., and Nunez, M.J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunes amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem*, **85**, 267-273.
- Pietarinen, S.P., Willfor, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., and Holmbom, B.R. (2006a). Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *J Wood Sci*, **52**, 436-444.
- Pietarinen, S.P., Willfor, S.M., Vikstrom, F.A., and Holmbom, B.R. (2006b). Aspen knots, a rich source of flavonoids. *J Wood Chem Technol*, **26**, 245-258.
- Pietarinen, S.P., Willfor, S.M., Sjöholm, R.E., and Holmbom, B.R. (2005). Bioactive phenolic substances in important tree species. Part 3: Knots and stemwood of *Acacia crassicarpa* and *A-mangium*. *Holzforschung*, **59**, 94-101.
- Pietta, P., Simonetti, P., and Mauri, P. (1998). Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J Agric Food Chem*, **46**, 4487-4490.
- Plumb, G.W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., and Williamson, G. (1998). Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res*, **29**, 351-358.
- Pocock, K.F., Sefton, M.A., and Williams, P.J. (1994). Taste thresholds of phenolic extracts of French and American oakwood - The influence of oak phenols on wine flavor. *Am J Enol Vitic*, **45**, 429-434.
- Pohjamo, S.P., Hemming, J.E., Willfor, S.M., Reunanen, M.H.T., and Holmbom, B.R. (2003). Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. *Phytochemistry*, **63**, 165-169.
- Porter, L.J., Ma, Z., and Chan, B.G. (1991). Cacao procyanidins- Major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*, **30**, 1657-1663.
- Post, J.F.M., and Varma, R.S. (1992). Growth inhibitory effects of bioflavonoids and related compounds on human leukemic CEM-C1 and CEM-Cz cells. *Cancer Lett*, **67**, 207-213.
- Power, K.A., Saarinen, N.M., Chen, J.M., and Thompson, L.U. (2006). Mammalian lignans enterolactone and enterodiol, alone and in combination with the isoflavone genistein, do not promote the growth of MCF-7 xenografts in ovariectomized athymic nude mice. *Int J Cancer*, **118**, 1316-1320.
- Pratt, D.E., and Hudson, B.J.F. (1990). In: Hudson B.J.F. Ed, Food antioxidants. London, Elsevier Applied Science. 171-191.

- Quettier-Deleu, C., Voiselle, G., and Fruchart, J.C., *et al.* (2003). Hawthorn extracts inhibit LDL oxidation. *Pharmazie*, **58**, 577-581.
- Quideau, S., Jourdes, M., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P., and Baudry, C. (2003). DNA topoisomerase inhibitor acutissimin A and other flavano-ellagitannins in red wine. *Angew Chem Int Ed*, **42**, 6012-6014.
- Quideau, S., Varadinova, T., Karagiozova, D., *et al.* (2004). Main structural and stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonhydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. *Chem Biodivers*, **1**, 247-258.
- Quideau, S., Jourdes, M., Lefeuvre, D., *et al.* (2005). The chemistry of wine polyphenolic c-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chem-Eur J*, **11**, 6503-6513.
- Ramezani, Z., Aghel, N., Keyghobadi, N. (2008). Rutin from different parts of *Capparis spinosa* growing wild in Khuzestan/Iran. Pakistan. *J Biol Sci*, **11**, 768-772.
- Raso, G.M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., and Di Carlo, R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci*, **68**, 921-931.
- Rohdewald, P. (2002). A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol<sup>®</sup>), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **40**, 158-168.
- Rowe, J.W. (1989). Ed. Natural Products of Woody Plants. Berlin, Springer-Verlag.
- Royer, M. (2008). Les molécules responsables de la stabilité des bois: cas des bois tropicaux de Guyane. Cayenne, Thesis of Université des Antilles et de la Guyane.
- Rudman, D., Rudman, I.W., Cohn, L., *et al.* (1990). Effects of human growth-hormone in men over 60 years old - Reply. *N Engl J Med*, **323**, 1562-1563.
- Ryan, J., Croft, K., Mori, T., *et al.* (2008). An examination of the effects of the antioxidant Pycnogenol<sup>®</sup> on cognitive performance, serum lipid profile, endocrinological and oxidative stress biomarkers in an elderly population. *J Psychopharmacol*, **22**, 553-562.
- Sachin, B.S., Koul, M., Zutshi, A., *et al.* (2008). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of Cedrus deodara active constituents and their pharmacokinetic profile in mice. *J Chromat B, Analyt Technol Biomed Life Sci*, **862**, 237-241.
- Sakar, M.K., Er, N., Ercil, D., Del Olmo, E., and San Feliciano, A. (2002). (-)-Desoxypodophyllotoxin and Diterpenoids from Juniperus nana Wild Berries. *Acta Pharma Sci*, **44**, 213-219.

- Saliou, C., Rimbach, G., Moini, H., *et al.* (2001). Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Radic Biol Med*, **30**, 154-160.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., and Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Amer Soc Clin Nutr*, 215S-217S.
- Scarlatti, F., Sala, G., Ricci, C., *et al.* (2007). Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase. *Cancer Lett*, **253**, 124-130.
- Schijlen, E.G.W., de Vos, C.H.R., van Tunen, A.J., and Bovy, A.G. (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, **65**, 2631-2648.
- Schultze-Mosgau, M.H., Dale, I.L., Gant, T.W., Chipman, J.K., Kerr, D.J., and Gescher, A. (1998). Regulation of c-fos transcription by chemopreventive isoflavonoids and lignans in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Eur J Cancer*, **34**, 1425-1431.
- Sengupta, A., Ghosh, S., and Das, S. (2001). Modulation of DMBA induced genotoxicity in bone marrow by quercetin during skin carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*, **20**, 131-134.
- Serraino, M., and Thompson, L.U. (1992). Flaxseed supplementation and early markers of colon carcinogenesis. *Cancer Lett*, **63**, 159-165.
- Shen, D., Wu, Q., Wang, M., Yang, Y., Lavoie, E.J., and Simon, J.E. (2006). Determination of the predominant catechins in *Acacia catechu* by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, **54**, 3219-3224.
- Shih, H., Pickwell, G.V., and Quattrochi, L.C. (2000). Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Arch Biochem Biophys*, **373**, 287-294.
- Shimoda, H., Tanaka, J., Kikuchi, M., *et al.* (2008). Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine: Hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut. *J Agric Food Chem*, **56**, 4444-44449.
- Siddhuraju, P., Mohan, P.S., and Becker, K. (2002). Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chem*, **79**, 61-67.
- Sime, S., and Reeve, V.E. (2004). Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol<sup>®</sup>. *Photochem Photobiol*, **79**, 193-198.

- Silliman, K., Parry, J., Kirk, L.L., and Prior, R.L. (2003). Pycnogenol does not impact the antioxidant or vitamin C status of healthy young adults. *J Am Diet Assoc*, **103**, 67-72.
- Singh, R., Singh, S., Kumar, S., and Arora, S. (2007). Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chem*, **103**, 505-511.
- Sivonova, M., Waczulikova, I., Kilanczyk, E., *et al.* (2004). The effect of Pycnogenol® on the erythrocyte membrane fluidity. *Gen Physiol Biophys*, **23**, 39-51.
- Sivonova, M., Zitnanova, I., Horakova, L., *et al.* (2006). The combined effect of pycnogenol with ascorbic acid and trolox on the oxidation of lipids and proteins. *Gen Physiol Biophys*, **25**, 379-396.
- Smeds, A.I., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., *et al.* (2007). Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. *J Agric Food Chem*, **55**, 1337-1346.
- Smejkal, K., Holubova, P., Zima, A., Muselik, J., and Dvorska, M. (2007). Antiradical activity of Paulownia tomentosa (Scrophulariaceae) extracts. *Molecules*, **12**, 1210-1219.
- Smite, E., Lundgren, L.N., and Andersson, R. (1993). Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of *Betula pendula*. *Phytochemistry*, **32**, 365-369.
- Smite, E., Pan, H., and Lundgren, L.N. (1995). Lignan glycosides from inner bark of *Betula pendula*. *Phytochemistry*, **40**, 341-343.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., and Goldberg, D.M. (1997). Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*, **30**, 91-113.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., and Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen*, **579**, 200-213.
- Souza, J.N.S., Silva, E.M., Loir, A., Rees, J.F., Rogez, H., and Larondelle, Y. (2008). Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chem*, **106**, 331-339.
- Spillman, P.J., Sefton, M.A., and Gawel, R. (2004). The effect of oak wood source, location of seasoning and coopering on the composition of volatile compounds in oak-matured wines. *Aust J Grape Wine Res*, **10**, 216-226.
- Sultana, B., Anwar, F., and Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chem*, **104**, 1106-1114.

- Sun, R.C., Sun, X.F., and Zhang, S.H. (2001). Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. *J Agric Food Chem*, **49**, 5122-5129.
- Sung, M.K., Lautens, M., and Thompson, L.U. (1998). Mammalian lignans inhibit the growth of estrogen-independent human colon tumor cells. *Anticancer Res*, **18**, 1405-1408.
- Suzuki, R., Matsushita, Y., Imai, T., *et al.* (2008). Characterization and antioxidant activity of Amazonian woods. *J Wood Sci*, **54**, 174-178.
- Svedstrom, U., Vuorela, H., Kostianen, R., Laakso, I., and Hiltunen, R. (2006). Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr A*. **1112**, 103-111.
- Takahashi, T., Kobori, M., Shinmoto, H., and Tsushida, T. (1998). Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 2199-2204.
- Tessitore, L., Davit, A., Sarotto, I., and Caderni, G. (2005). Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21(CIP) expression. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1619-22. Webb AL, McCullough ML. Dietary lignans: Potential role in cancer prevention. *Nutr Cancer*, **51**, 117-131.
- Tomer, D.P., McLeman, L.D., Ohmine, S., Scherer, P.M., Murray, B.K., and O'Neill, K.L. (2007). Comparison of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays. *J Med Food*, **10**, 337-344.
- Toth, L., and Potthast, K. (1984). Chemical aspects of the smoking of meat and meat products. *Adv Food Res*, **29**, 87-158.
- Touillaud, M.S., Thiebaut, A.C.M., Fournier, A., Niravong, M., Boutron-Ruault, M.C., and Clavel-Chapelon, F. (2007). Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst*, **99**, 475-486.
- Tourino, S., Selga, A., Jimenez, A., *et al.* (2005). Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J Agric Food Chem*, **53**, 4728-4735.
- Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol*, **7**, 581-591.

- Tung, Y.T., Wu, J.H., Huang, C.Y., Kuo, Y.H., and Chang, S.T. (2009). Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. *Bioresour Technol*, **100**, 509-514.
- Tung, N.H., Ding, Y., Kim, S.K., Bae, K., and Kim, Y.H. (2008). Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of the Chemical Components from the Stems of *Acer tegmentosum* Maxim. *J Agric Food Chem*, **56**, 10510-10514.
- Ueda, H., Yamazaki, C., and Yamazaki, M. (2003). Inhibitory effect of perilla leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. *Biol Pharm Bull*, **26**, 560-563.
- Vainiotalo, P., Julkuentiitto, R., Juntheikki, M.R., Reichardt, P., and Auriola, S. (1991). Chemical characteristics of herbivore defenses in *Betula pendula* winter-dormant young stems. *J Chrom*, **547**, 367-376.
- Veurink, G., Liu, D., Taddei, K., *et al.* (2003). Reduction of inclusion body pathology in ApoE-deficient mice fed a combination of antioxidants. *Free Radic Biol Med*, **34**, 1070-1077.
- Verma, A.K., Johnson, J.A., Gould, M.N., and Tanner, M.A. (1988). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res*, **48**, 5754-5758.
- Vinson, J.A., Bose, P., Proch, J., Al Kharrat, H., and Samman, N. (2008). Cranberries and cranberry products: Powerful in vitro, ex vivo, and in vivo sources of antioxidants. *J Agric Food Chem*, **56**, 5884-5891.
- Virgili, F., Kobuchi, H., and Packer, L. (1998). Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol®): Scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine raw 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med*, **24**, 1120-1129.
- Viviers, P.M., Botha, J.J., Ferreira, D., Roux, D.G., and Saayman, H.M. (1983). Synthesis of condensed tannins .7. Angular [4,6-4,8]-prorobinetinidin triflavanoids from black wattle (mimosa) bark extract. *J Chem Soc, Perkin Trans*, **1**, 17-22.
- Volate, S.R., Davenport, D.M., Muga, S.J., and Wargovich, M.J. (2005). Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis*, **26**, 1450-1456.
- Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., *et al.* (2005). Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health-related effects. *J Agric Food Chem*, **53**, 5922-5931.
- Wang, S.Y., Wu, J.H., Cheng, S.S., *et al.* (2004). Antioxidant activity of extracts from *Calocedrus formosana* leaf, bark, and heartwood. *J Wood Sci*, **50**, 422-426.

- Wang, T., Hicks, K.B., Moreau, R. (2002). Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates. *J Am Oil Chem Soc*, **79**, 1201-1206.
- Whitten, P.L., and Naftolin, F. (1991). In: Hochberg RB NF Ed, *New Biology of Steroid Hormones*. New York, Raven Press. 155-167.
- Wiesner, R.J., Zsurka, G., and Kunz, W.S. (2006). Mitochondrial DNA damage and the aging process-facts and imaginations. *Free Radic Res*, **40**, 1284-1294.
- Willfor, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., *et al.* (2003a). Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *J Agric Food Chem*, **51**, 7600-7606.
- Willfor, S., Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C., and Holmbom, B. (2003b). Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung*, **57**, 27-36.
- Willfor, S., Hemming, J., Reunanen, M., and Holmbom, B. (2003c). Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stemwood. *Holzforschung*, **57**, 359-372.
- Williamson, G., and Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, **81**, 243S-255S.
- Winkler, J.K., and Warner, K. (2008). The effect of phytosterol concentration on oxidative stability and thermal polymerization of heated oils. *Eur J Lipid Sci Technol*, **110**, 455-64.
- Wiseman, A. (2006). Crohn's disease leading to bowel cancer may be avoided by consumption of soya isoflavones: Adjunct-chemotherapy with oxaliplatin. *Med Hypotheses*, **66**, 934-935.
- Wondrak, G.T., Jacobson, M.K., and Jacobson, E.L. (2006). Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci*, **5**, 215-237.
- Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., and Peskin, A.V. (2002). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chem*, **77**, 155-161.
- Wu, H.Z., Liang, X., Fang, Y., Qin, X.R., Zhang, Y.X., and Liu, J.W. (2008). Resveratrol inhibits hypoxia-induced metastasis potential enhancement by restricting hypoxia-induced factor-1 alpha expression in colon carcinoma cells. *Biomed Pharmacother*, **62**, 613-621.
- Wu, S.L., Sun, Z.J., Yu, L., Meng, K.W., Qin, X.L., and Pan, C.E. (2004). Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer. *World J Gastroenterol*, **10**, 3048-52.



- Wu, J.H., Tung, Y.T., Wang, S.Y., Shyur, L.F., Kuo, Y.H., and Chang, S.T. (2005). Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *J Agric Food Chem*, **53**, 5917-5921.
- Yang, J.X., Guo, J., and Yuan, J.F. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Sci Technol*, **41**, 1060-1066.
- Yang, Y., and Chien, M.J. (2000). Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, **48**, 3990-3996.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Huang, D.W., Hsu, C.L., and Fu, T.Y.C. (2008). Protective effect of pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on LDL oxidation and its anti-inflammatory action by modulation of NOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*, **46**, 175-185.
- Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends Food Sci Technol*, **17**, 64-71.
- Yoshida, Y., and Niki, E. (2003). Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J Nutr Sci Vitaminol*, **49**, 277-280.
- Zhang, J.X., Hallmans, G., Landstrom, M., *et al.* (1997). Soy and rye diets inhibit the development of Dunning R3327 prostatic adenocarcinoma in rats. *Cancer Lett*, **114**, 313-314.
- Zhang, X.F., Thuong, P.T., Min, B.S., *et al.* (2006). Phenolic glycosides with antioxidant activity from the stem bark of *Populus davidiana*. *J Nat Prod*, **69**, 1370-1373.
- Zulaica-Villagomez, H., Peterson, D.M., Herrin, L., and Young, R.A. (2005). Antioxidant activity of different components of pine species. *Holzforschung*, **59**, 156-162.