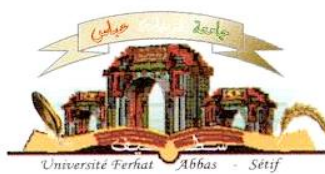


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2017

THÈSE

Présentée par

BOUDIAF Kaouthar

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Etude des propriétés anti-inflammatoires de la
thymoquinone et de ses mécanismes d'inhibition des
fonctions du neutrophile humain**

Soutenue publiquement le **09/02/2017**

DEVANT LE JURY

Président	BOURICHE Hamama	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	BENBOUBETRA Mustapha	Pr. UFA Sétif 1
Co-directrice	DANG Pham My-Chan	PhD. CR. CNRS, Paris-France
Examineurs	HAMBABA Leila	Pr. Univ. Batna 2
	ATMANI Djebbar	Pr. Univ. Bejaia

Année Universitaire : 2016/2017

A la mémoire de notre cher regretté

Pr. BENBOUBETRA Mustapha

*Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis et
lui accorde son pardon et sa miséricorde*

Amine

REMERCIEMENTS

Il m'est agréable d'adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont apporté de près ou de loin, aide et conseils lors de l'élaboration de cette thèse de doctorat.

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, Professeur Mustapha BENBOUBETRA, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour sa générosité et sa compréhension tout au long de mes années d'étude.

J'ai beaucoup de reconnaissance à témoigner à ma co-promotrice Dr. Pham My-Chan DANG qui est un modèle professionnel. Merci pour la confiance et le soutien sans failles que tu m'as témoigné, ta constante disponibilité et tes conseils précieux. J'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je remercie le Professeur BOURICHE Hamama de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ma thèse. Mes remerciements vont également au Pr. HAMBABA Leila et Pr. ATMANI Djebbar d'avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie de mon jury.

Je remercie très sincèrement Docteur Jamel El Benna de m'avoir accueillie au sein de son équipe dans le Centre de Recherche sur l'inflammation (CRI) de la Faculté de Médecine Xavier Bichat (INSERM U1149). Merci à vous et à tous les membres de l'équipe pour le climat sympathique dans lequel vous m'avez permis de travailler. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun m'ont beaucoup apporté. Je remercie vivement les autres chercheurs de l'équipe Pr. Marie-Anne GOUGEROT-POCIDALO, Dr. Jean-Claude MARIE et Dr. Axel PERIANIN. Merci à Margarita pour toute l'aide qu'elle m'a apportée dans mes manipes de cytométrie. Merci à Michèle pour ses petites visites chaleureuses (et délicieuses...) malgré sa retraite.

Merci à mes compagnons d'armes ; Hanane, Abdelali, Loïc, Viviana, Yamina et Hasna pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble. Un grand merci à mes copines de toujours, Amel et Nouara, et à Zahira, Dalila et Yacine pour tout le soutien qu'ils ne cessent de m'apporter. Je ne pourrais oublier Chahra, Roumyla et Naoual ; Sara et Farida, qui n'ont épargné aucun effort pour m'aider au moment où j'en avais vraiment besoin.

Enfin, je tiens à exprimer toute mon affection à ma famille, surtout à mes parents qui ont toujours été présents à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.

Tous ceux qui m'ont tendu la main, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Kaouthar

RESUME

Les Polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) jouent un rôle clé dans la défense anti-infectieuse de l'hôte par l'intermédiaire de la production massive des formes réactives de l'oxygène (FRO) par la NADPH oxydase et la libération des protéines antibactériennes contenues dans les granules. Cependant, la libération inappropriée de ces molécules dans le milieu extracellulaire peut induire des dommages tissulaires sévères, contribuant ainsi à la physiopathologie de plusieurs maladies inflammatoires aiguës et chroniques.

Dans le présent travail, nous avons montré que la thymoquinone (TQ) inhibe fortement les fonctions du neutrophile humain induites par le fMLF, notamment la production des FRO ($IC_{50} = 0,08 \mu\text{g/ml}$) et la dégranulation. L'inhibition de la production des FRO n'est pas due à un effet scavenger, puisque la TQ n'inhibe pas la production d'anions superoxydes par le système xanthine/xanthine oxydase, ni à un effet cytotoxique sur les neutrophiles comme l'indique les tests de viabilité. De même, la TQ n'a montré aucun effet sur l'activité catalytique du complexe NADPH oxydase préassemblé, ni sur la translocation vers la membrane de ses composantes cytosoliques. De manière intéressante, la TQ inhibe la phosphorylation de la sous unité cytosolique $p47^{PHOX}$ de la NADPH oxydase sur les Sérines 304 et 328 induite par le fMLF. La TQ inhibe également la libération des granules spécifiques et azurophiles, comme en témoigne la diminution de l'expression à la surface cellulaire de la $gp91^{PHOX}$, et du CD11b ainsi que de la libération extracellulaire de la MPO. Parallèlement, les voies des PKC et des MAPKs, connues pour être impliquées dans la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$ et la dégranulation respectivement, sont toutes deux affectées par la TQ. Enfin, dans un modèle de pleurésie induite par la λ -carraghénine chez le rat, la TQ réduit l'accumulation des PMN dans la cavité pleurale, montrant ainsi que non seulement elle inhibe les fonctions des neutrophiles, mais possède également des propriétés anti-inflammatoires *in vivo*. A cet égard, la TQ détiendrait un potentiel thérapeutique prometteur.

Mots clés : Thymoquinone ; neutrophiles ; NADPH Oxydase ; formes réactives de l'oxygène ; $p47^{PHOX}$; phosphorylation ; dégranulation.

SUMMARY

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are key players in host defense against pathogens through the robust production of reactive oxygen species (ROS) by NADPH oxidase, and the release of antibacterial proteins from granules. However, inappropriate generation and liberation of these molecules into the extracellular environment may induce severe tissue injuries, thereby contributing to the physiopathology of acute and chronic inflammatory disorders.

In the present study, we show that thymoquinone (TQ) inhibits fMLF-induced neutrophils functions, including ROS production ($IC_{50} = 0.08 \mu\text{g/ml}$) and granules exocytosis. The inhibition of ROS production was not due to a scavenger effect, as TQ did not inhibit superoxide anion produced by the xanthine/xanthine oxidase system, nor to a cytotoxic effect on neutrophils. In addition, TQ did not affect the catalytic activity of preassembled NADPH oxidase and also didn't affect the translocation of its cytosolic subunits towards the membrane. Interestingly, TQ impaired $p47^{PHOX}$ phosphorylation, a cytosolic subunit of NADPH oxidase, on Ser-304 and Ser-328 in response to fMLF. TQ also attenuated specific and azurophilic granules exocytosis in fMLF-stimulated neutrophils as shown by the decrease of cell surface expression of $gp91^{PHOX}$, CD11b and release of MPO. Concomitantly, both PKC and MAPK pathways, which have been involved in $p47^{PHOX}$ phosphorylation and granules exocytosis respectively, were inhibited by TQ in fMLF-stimulated neutrophils. Finally, in a model of λ -carrageenan-induced pleurisy in rats, TQ reduced neutrophil accumulation in pleural space, showing that not only it inhibits PMN functions but also holds anti-inflammatory properties *in vivo*. In this regard TQ exhibits promising therapeutic potential.

Keywords: Thymoquinone; neutrophils; NADPH Oxidase; reactive oxygen species; $p47^{PHOX}$; phosphorylation; degranulation.

الملخص

تلعب الخلايا المتعادلة متعددة النواة دورا أساسيا في الإنتاج المكثف للأنواع الأكسجينية النشطة بواسطة إنزيم NADPH Oxydase، وكذا تحرير البروتينات المضادة للبكتيريا المحتواة في حبيباتها. غير أن الإنتاج و التحرير غير المناسبين لهذه الجزيئات في الوسط الخارجي للخلية يمكنه أن يؤدي إلى تدمير حاد للأنسجة مما يساهم في الفيزيولوجيا المرضية لعدة أمراض التهابية حادة و مزمنة.

يبين هذا العمل أن الثيموكينون (Thymoquinone ; TQ) يثبط بقوة وظائف الخلايا المتعادلة للإنسان المنشطة بـ fMLF، خاصة إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة و إفراز محتوى الحبيبات. تثبيط إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة بواسطة TQ لا يعزى إلى تأثير إزاحي لجذر ما فوق الأكسيد، بما أن TQ لم يثبط إنتاج هذا الجذر بواسطة الإنزيم المؤكسد المرجع للكراتينين، ولا إلى أي تأثير سمي تجاه الخلايا المتعادلة. بالإضافة إلى ذلك، لم يظهر TQ أي تأثير على نشاطية المعقد الإنزيمي NADPH Oxydase المجمع مسبقا، ولا على انتقال مكوناته السيتوزولية نحو الغشاء الخلوي. بل أن TQ تمكن من تثبيط فسفرة سيرين 304 و 328 في p47^{PHOX}، وهي واحدة من التحت وحدات السيتوزولية للمعقد الإنزيمي NADPH Oxydase، في الخلايا المتعادلة للإنسان المنشطة بـ fMLF. تمكن TQ أيضا من تثبيط إفراز محتوى الحبيبات النوعية (spécifiques) و اللازوردية (azurophiles)، كما بينه تناقص كميات كل من gp91^{PHOX} و CD11b على الغشاء الخلوي و MPO المحررة خارج الخلية. موازاة مع هذا، تمكن TQ من التأثير على طرق التأشير الخلوية PKC و MAPK التي تتحكم على التوالي في فسفرة p47^{PHOX} و إفراز محتوى الحبيبات. في الأخير، و في نموذج التهاب ذات الجنب (pleurésie) عند الجرذ المحفزة بالكاراجينان، تمكن TQ من الحد من تجمع الخلايا المتعادلة في التجويف الجنب للجرذان، مما يبين أن TQ ليس قادرا فقط على تثبيط وظائف الخلايا المتعادلة، و لكنه يملك أيضا خصائص مضادة للإلتهاب في الكائن الحي. و لذلك يمكن القول أن TQ تتمتع بإمكانيات علاجية واعدة.

الكلمات المفتاحية: ثيموكينون، الخلايا المتعادلة، NADPH Oxydase، الأنواع الأكسجينية النشطة، p47^{PHOX}، فسفرة، إفراز محتوى الحبيبات.

LISTE DES ABREVIATIONS

AD	Domaine d'activation
AIR	Auto-inhibitory region
AR	Arthrite rhumatoïde
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BPI	Bacterial Permeability-Increasing protein
CD	Cluster of differentiation
CGD	Chronic granulomatous disease
CHO	Chinese hamster ovarian cells
CKII	Caséine kinase 2
COX-2	Cyclooxygénase 2
CR	Récepteur du complément
DAG	Diacylglycerol
DC	Cellule dendritique
DFP	Diisopropyl fluorophosphates
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DL₅₀	Dose létale 50
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DUOX	Dual oxidase
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid.
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid.
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
fMLF	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FPR	formyl peptide receptor, récepteur du fMLF
FRO	Formes réactives de l'oxygène
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S transferase

HBP	Heparin-binding protein
HBSS	Hanks balanced salt solution
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFNγ	Interféron gamma
IL	Interleukine
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
INT	Iodophenyl-nitrophenyl-phenyltetrazolium
IP3	Inositol 1,4,5 triphosphate
ITAM	Immunoreceptor tyrosin based activation motif
JNK	Jun N-terminal kinase
kDa	Kilo dalton
LPS	Lipopolysaccharide
LTB₄	Leucotriène B ₄
LXA4	Lipoxine A4
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen extracellular kinase
MFI	Intensité de fluorescence moyenne
MMP	Matrix metalloproteinase
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT	Nitroblue tetrazolium
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural killer
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOX	NADPH oxydase
PAAK	Phosphatidic acid activated kinase
PAK	p21- activated kinase
PAF	Platelet Activating Factor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PB1	Phox and Bem1
PBS	Phosphate Buffered Saline.
PDK-1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PE	Phycoérythrine
PGD2	Prostaglandine D2
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase

PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol myristate acetate
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PMSF	Phenylmethysulfonyl Fluoride
PMT	Photomultiplicateurs
PP1 et 2A	Protein phosphatase 1 et 2A
PRR	Pattern Recognition Receptors
PRR	Prolin rich region
PS	Phosphatidylsérine
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PX	Phox homology
Pyk2	Proline-rich tyrosine kinase 2
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Sérine
SH3	Src homology 3
SNAP	Soluble NSF attachment protein
SNARE	SNAP Receptor proteins
SOD	Superoxyde dismutase
TBHQ	Tert-butylhydroquinone
TBS	Tris Buffered Saline
TGF-β	Transforming growth factor beta
THQ	Thymohydroquinone
TLR	Toll like receptor
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TPR	Tetratricopeptide repeat
TQ	Thymoquinone
XO	Xanthine oxydase
ZOP	Zymosan opsonisé

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

	FIGURES	Page
Figure 1.	Micrographie électronique du neutrophile, montrant son noyau polymorphe et ses nombreuses granules	03
Figure 2.	Les granules des neutrophiles	06
Figure 3.	La cascade d'adhésion des leucocytes	11
Figure 4.	Phagocytose et activation des mécanismes de bactéricidie du neutrophile	15
Figure 5.	Le complexe NADPH oxydase phagocytaire	21
Figure 6.	Structure du flavocytochrome b558	22
Figure 7.	Structure de la p47 ^{PHOX}	23
Figure 8.	Structure de la p67 ^{PHOX}	24
Figure 9.	Structure de la p40 ^{PHOX}	25
Figure 10.	Modèle de régulation de l'activité du flavocytochrome b558 en deux étapes par Rac2	26
Figure 11.	Modèle du complexe p40 ^{PHOX} -p47 ^{PHOX} -p67 ^{PHOX} dans le neutrophile en repos	27
Figure 12.	Evènements majeurs de signalisation induits par le fMLF conduisant à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire	29
Figure 13.	Mécanisme d'activation de la p47 ^{PHOX}	32
Figure 14.	Représentation de l'assemblage de la NADPH oxydase phagocytaire	35
Figure 15.	Réactions d'oxydoréduction de la thymoquinone	39
Figure 16.	Effet de la TQ sur la production des anions superoxydes dans le neutrophile stimulé par le fMLF	56
Figure 17.	Effet de la TQ sur la production des anions superoxydes dans le neutrophile stimulé par le PMA	56
Figure 18.	Effet de la TQ sur la production des FRO dans le neutrophile humain stimulé par le ZOP	58
Figure 19.	Comparaison des effets inhibiteurs de la TQ sur la production totale des FRO induite par le fMLF, le PMA et le ZOP	58
Figure 20.	Effet de la TQ sur la production d'anions superoxydes dans le neutrophile stimulé par le fMLF (A) ; et le PMA (B)	60
Figure 21.	Effet de la TQ sur la viabilité des neutrophiles	62
Figure 22.	Effet de la TQ sur la production d'anions superoxydes par le système xanthine/xanthine oxydase	64

Figure 23.	Effet de la TQ sur l'activité catalytique du complexe NADPH oxydase préassemblé	66
Figure 24.	Effet de la TQ sur la phosphorylation de la p47 ^{PHOX} sur la sérine 304 et la sérine 328 dans le neutrophile stimulé par le fMLF	68
Figure 25.	Effet de la TQ sur la phosphorylation de la p47 ^{PHOX} sur la sérine 304 et la sérine 328 dans le neutrophile stimulé par le PMA	69
Figure 26.	Effet de la TQ sur la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane des neutrophiles stimulés par le fMLF	71
Figure 27.	Effet de la TQ sur la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane des neutrophiles stimulés par le PMA	71
Figure 28.	Effet de la TQ sur la libération des granules spécifiques dans le neutrophile stimulé par le fMLF	74
Figure 29.	Effet de la TQ sur la libération des granules spécifiques dans le neutrophile stimulé par le PMA	75
Figure 30.	Effet de la TQ sur la libération des granules azurophiles induite par le fMLF	77
Figure 31.	Effet de la TQ sur la phosphorylation de la PKC induite par le fMLF	79
Figure 32.	Effet de la TQ sur la phosphorylation induite par le fMLF de ERK1/2 et p38 MAPK	81
Figure 33.	Effet de la TQ sur les changements induits par le fMLF des taux du calcium intracellulaire.	83
Figure 34.	Effet de la TQ sur la pleurésie induite par la λ -carraghénine chez le rat	86
Figure 35.	Voies de la formation des Formes réactives de l'oxygène (FRO) et de l'azote	
Figure 36.	Sources intracellulaires des formes réactives de l'oxygène	
Figure 37.	Génération des FRO dans les neutrophiles stimulés	

TABLEAUX

Tableau I.	Mécanismes d'action des protéines microbicides du neutrophile	16
Tableau II.	Maladies associées au dérèglement des fonctions du neutrophile	19
Tableau III.	Structure et propriétés de la thymoquinone	38

PUBLICATIONS :

1. **Kaouthar BOUDIAF**, Margarita HURTADO-NEDELEC, Sahra Amel BELAMBRI, Jean-Claude MARIE, Yacine Derradji, Mustapha BENBOUBETRA, Jamel EL-BENNA, Pham My-Chan DANG. Thymoquinone strongly inhibits fMLF-induced neutrophils functions and exhibits anti-inflammatory properties *in vivo*. *Biochemical Pharmacology* (2016) **104**: 62-73. <http://www.journals.elsevier.com/biochemical-pharmacology>.
2. Asma MEZITI, Hicham MEZITI, **Kaouthar BOUDIAF**, Mustapha BENBOUBETRA, Hemama BOURICHE. Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of *Nigella Sativa* Seed Extracts *In Vitro* and *In Vivo*. *World Academy of Sciences, Engineering and Technology* (2012) **64**: 24-32. <https://www.waset.org>
3. **BOUDIAF Kaouthar**, HOUCHER Zahira, SOBHI Widad and BENBOUBETRA Mustapha. Evaluation of Antioxidant and Anti-Xanthine Oxidoreductase Activities of *Nigella sativa* Linn seeds' extracts. Khaouthar, Houcher Zahira, Widad Sobhi. *Journal of Applied Biological Sciences* (2010) **4 (1)**: 13-22. <http://gulib.georgetown.edu>
4. **Kaouthar BOUDIAF**, Mustapha BENBOUBETRA. Strategies of antioxidant drug discovery. *Journal of Medical and Biological Sciences* (2014) **1**: 93-101. <http://bioscience.scientific-journal.com/articles/1/17.pdf>

COMMUNICATIONS :

1. **BOUDIAF Kaouthar**, BELAMBRI Sahra Amel, HURTADO-NEDELEC Margarita, BENBOUBETRA Mustapha, EL-BENNA Jamel, DANG Pham My-Chan. Thymoquinone is a potent NOX2 inhibitor in human neutrophils. First Meeting of the Neutrophil Club. April 10th, 2015. FIAP, Paris, France.
2. **BOUDIAF Kaouthar**, HURTADO-NEDELEC Margarita, BELAMBRI Sahra Amel, BENBOUBETRA Mustapha, EL-BENNA Jamel, DANG Pham My-Chan. La thymoquinone est un puissant inhibiteur de la production d'anions superoxydes dans les neutrophiles humains. 9^{ème} Club oxydase : NADPH oxydases de la Biochimie aux pathologies. Le 21 et 22 Mai 2015. Genève, Swiss.
3. **Kaouthar BOUDIAF**, Margarita HURTADO-NEDELEC, Sahra Amel BELAMBRI, Mustapha BENBOUBETRA, Jean-Claude MARIE, Jamel EL-BENNA, Pham My-Chan DANG. Thymoquinone, a natural product from *Nigella sativa* strongly inhibits fMLF-induced neutrophils functions. The 50th Annual Meeting of the European Society for Clinical Investigation (ESCI); workshop "6.Phagocyte Biology". April 27-29, 2016. Paris, France.
4. **Kaouthar BOUDIAF**, Sahra Amel BELAMBRI, Margarita HURTADO-NEDELEC, Mustapha BENBOUBETRA, Jamel EL BENNA and Pham My-Chan DANG. (2015) Thymoquinone is a potent NOX2 inhibitor in human neutrophils. *Front. Immunol.* Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015 - 11th Congress of the Latin American Association of Immunology - 10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología. doi: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00003.

SOMMAIRE

RESUMES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

SOMMAIRE

INTRODUCTION 01

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les polymorphonucléaires neutrophiles 03

I.1.1. Description et production des neutrophiles 03

I.1.2. Les granules des neutrophiles 05

I.1.2.1. Les granules azurophiles (primaires) 05

I.1.2.2. Les granules spécifiques (secondaires) 07

I.1.2.3. Les granules à gélatinase (tertiaires) 08

I.1.2.4. Les vésicules sécrétoires 08

I.1.3. Fonctions du neutrophile 09

I.1.3.1. Recrutement et migration vers le foyer inflammatoire 10

I.1.3.2. La dégranulation 12

I.1.3.3. Phagocytose et mécanismes de bactéricidie 14

a) *Mécanisme bactéricide dépendant de l'oxygène* 15

b) *Mécanisme bactéricide indépendant de l'oxygène* 16

c) *Nouveau mécanisme bactéricide* 17

I.1.3.4. Régulation des réponses immunitaires et production de cytokines ... 17

I.1.3.5. Rôle du neutrophile dans la résolution de l'inflammation 18

I.1.4. Implications du neutrophile dans les pathologies inflammatoires 19

I.2. La NADPH oxydase phagocytaire 20

I.2.1. Structure de la NADPH oxydase phagocytaire 20

I.2.1.1. Les composants membranaires de la NADPH oxydase phagocytaire 21

a) *La gp91^{PHOX}/NOX2* 21

b) *La p22^{PHOX}* 22

I.2.1.2. Les composants cytosoliques de la NADPH oxydase phagocytaire ... 23

a) *La p47^{PHOX}* 23

b) *La p67^{PHOX}* 24

c) *La p40^{PHOX}* 24

d) *La petite protéine G Rac 2* 25

I.2.2. Activation de la NADPH oxydase 26

I.2.2.1. La NADPH oxydase des neutrophiles au repos 26

I.2.2.2. Priming de la NADPH oxydase	27
I.2.2.3. Activation de la NADPH oxydase	28
I.2.2.4. Phosphorylations des composants de la NADPH oxydase phagocytaire	31
a) Phosphorylation de la $p47^{PHOX}$	31
b) Phosphorylation de la $p67^{PHOX}$	33
c) Phosphorylation de la $p40^{PHOX}$	33
d) Phosphorylation de la $p22^{PHOX}$	34
e) Phosphorylation de la $gp91^{PHOX}$	34
I.2.2.5. Assemblage du complexe NADPH oxydase	35
I.2.3. Les pathologies inflammatoires associées au dérèglement de NOX2	36
I.3. La plante médicinale <i>Nigella sativa</i>	37
I.3.1. Propriétés et principaux constituants	37
I.3.2. La thymoquinone	38
I.3.2.1. Structures et propriétés	38
I.3.2.2. Activités biologiques de la thymoquinone	39
a) Activité antioxydante	39
b) Activité antiinflammatoire et immunomodulatrice	40
c) Activité anticancéreuse et chimiopréventive	41
d) Activité antidiabétique	42
I.3.2.3. Toxicité et efficacité thérapeutique de la TQ	43

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Réactifs et animaux	44
II.2. Isolement des neutrophiles humains	45
II.3. Test de production d'anions superoxydes dans les neutrophiles stimulés par le fMLF et le PMA	45
II.4. Test de production des FRO dans les neutrophiles stimulés par le zymosan opsonisé (ZOP)	46
II.4.1. Opsonisation du zymosan au sérum humain	46
II.4.2. Mesure de la production d'anions superoxydes dans les neutrophiles stimulés	46
II.4.3. Mesure de la production des FRO dans les neutrophiles stimulés avec le ZOP par chimioluminescence	47
II.5. Test de viabilité des neutrophiles en présence de la thymoquinone	47
II.5.1. Test au bleu trypan	47
II.5.2. Test de cytotoxicité (Cyto-X)	48
II.6. Effet scavenger d'anions superoxydes produits par la xanthine oxydase	48
II.7. Assemblage du complexe NADPH oxydase du neutrophile	49

II.8. Test de production d'anions superoxyde par le complexe NADPH oxydase préassemblé (système acellulaire)	49
II.9. Analyse de la phosphorylation de la p47 ^{PHOX} dans le neutrophile stimulé par le fMLF et le PMA	50
II.10. Analyse de la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane des neutrophiles	50
II.11. Analyse de l'expression membranaire de la gp91 ^{PHOX} du CD11b par cytométrie en flux	51
II.12. Mesure de la libération de la MPO	51
II.13. Analyse de la phosphorylation de la PKC, ERK1/2 et p38 MAPK dans le neutrophile stimulé par le fMLF	52
II.14. Mesure de la libération du calcium intracellulaire dans le neutrophile stimulé par le fMLF	52
II.15. SDS-PAGE et Western Blot	53
II.16. Effet de la TQ sur la pleurésie induite par la λ -carraghénine chez le rat	53
II.17. Analyse statistique	54

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Effet de la TQ sur la production d'anions superoxydes par le neutrophile humain...	55
III.2. Effet de la TQ sur la viabilité des neutrophiles	61
III.3. Effet de la TQ sur la production d'anions superoxydes produits par la xanthine oxydase	63
III.4. Effet de la TQ sur l'activité catalytique du complexe NADPH oxydase préassemblé	65
III.5. Effet de la TQ sur la phosphorylation de la p47 ^{PHOX} sur les sérines 304 et 328	67
III.6. Effet de la TQ sur la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane du neutrophile	70
III.7. Effet de la TQ sur la dégranulation du neutrophile humain	73
III.8. Effet de la TQ sur les voies de signalisation stimulées par le fMLF dans le neutrophile humain	78
III.9. Effet de la TQ sur la pleurésie induite chez le rat	84
DISCUSSION GENERALE	87
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94
PUBLICATIONS	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation et représentent la première ligne de défense de l'hôte contre les infections microbiennes. En réponse à un signal inflammatoire, les PMN quittent la circulation pour rejoindre le site infectieux suivant un gradient de chimioattractants tels que le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF) ou le composant C5a du complément. Une fois arrivés, les PMN reconnaissent le pathogène opsonisé, via les récepteurs Fc ou les récepteurs du complément, conduisant à sa phagocytose et à sa destruction au sein du phagosome (Lee *et al.*, 2003).

Le mécanisme principal par lequel les neutrophiles tuent les microbes phagocytés est la production massive des formes réactives de l'oxygène (FRO) (Nauseef, 2007). L'anion superoxyde, espèce réactive primaire à partir de laquelle les autres FRO sont générées (Babior, 1999), est produit par un complexe enzymatique appelé NADPH oxydase (ou NOX2). La NADPH oxydase phagocytaire est constituée de deux protéines membranaires, gp91^{PHOX} et p22^{PHOX} formant le flavocytochrome b558, et de sous-unités cytosoliques régulatrices (p40^{PHOX}, p47^{PHOX}, p67^{PHOX} et Rac1/2). L'activité de la NADPH oxydase des PMN est étroitement régulée, ses composantes sont séparées entre les compartiments cytosoliques et membranaires dans les cellules au repos ce qui permet de maintenir NOX2 inactive en l'absence de stimulation. La stimulation des neutrophiles induit la translocation des sous-unités cytosoliques vers la membrane plasmique où elles s'assemblent avec le cytochrome b558 pour former l'enzyme active (Nauseef, 2004). La phosphorylation de la p47^{PHOX} (El Benna *et al.*, 1994; El Benna *et al.*, 1996a) et l'activation de la petite GTPase Rac2 sont deux événements requis pour l'activité de la NADPH oxydase dans les PMN humains (Bokoch, 1994). Au cours de l'activation des PMN, les granules spécifiques, qui contiennent 85% du cytochrome b558, sont mobilisés et fusionnent avec la membrane plasmique ou le phagosome augmentant ainsi l'expression de NOX2 à ces sites ce qui permet la production des FRO à l'intérieur du phagolysosome et à l'extérieur de la cellule. En outre, les granules azurophiles libèrent la myéloperoxydase (MPO) dans le phagosome ou l'espace extracellulaire. La MPO catalyse la formation du HOCl, un oxydant puissant et toxique, à partir du H₂O₂ dérivé de la NADPH oxydase (Nauseef, 2007). Simultanément, les protéines antibactériennes telles que les cathepsines, défensines, lactoferrine et le lysozyme sont libérés de ces granules, et participent avec les FRO à la destruction du pathogène (Sheshachalam *et al.*, 2014). Bien que la génération des FRO et la libération des protéines antibactériennes par les phagocytes sont essentielles pour une défense

antimicrobienne efficace de l'hôte, leur production et leur libération inappropriées peuvent perturber l'équilibre redox cellulaire et endommager les tissus environnants, contribuant ainsi à une grande variété de désordres inflammatoires, tels que la polyarthrite rhumatoïde (PR) et les maladies inflammatoires de l'intestin (Wright *et al.*, 2010). Dans ce contexte, de nombreuses études ont été menées pour identifier des molécules capables d'inhiber les fonctions des phagocytes, notamment la production des FRO, à des fins thérapeutiques.

Nous nous sommes intéressés à la thymoquinone (TQ) (2-isopropyl-5-méthylbenzo-1,4-quinone), la principale composante active de l'huile volatile des graines de *Nigella sativa* (cumin noir). Au cours de ces dernières années, la TQ a suscité un intérêt considérable pour ses activités biologiques remarquables (Woo *et al.*, 2012 ; Darakhshan *et al.*, 2015). Bien que ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires ont été signalées dans un grand nombre d'études, son effet sur les fonctions du neutrophile humain est encore obscur. Dans la présente étude, nous nous sommes fixé comme objectif d'étudier l'effet de la TQ sur les fonctions du neutrophile humain, en particulier la production d'anions superoxydes et la dégranulation et d'analyser les mécanismes sous-jacents. En plus de cette étude *in vitro*, nous avons envisagé d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de la TQ *in vivo* sur un modèle de pleurésie induite par la λ - carraghénine chez le rat.

Ce manuscrit est organisé en deux principales parties. La première présente l'essentiel des données bibliographiques en relation avec ce travail de thèse, notamment le neutrophile et ses fonctions, la NADPH oxydase phagocytaire et la thymoquinone. La seconde partie développe l'ensemble des travaux de recherche réalisés, les résultats obtenus et enfin une discussion générale par rapport aux données de la littérature.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les polymorphonucléaires neutrophiles

I.1.1. Description et production des neutrophiles

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) sont des phagocytes professionnels du système immunitaire innée qui agissent comme une première ligne de défense contre les pathogènes envahissants, principalement les bactéries et les champignons, et également les virus (Cassatella, 2010). Ce sont les principales cellules et les premières à être mobilisées dans le processus de la réaction inflammatoire aigüe.

L'examen microscopique des neutrophiles matures dévoile deux traits caractéristiques : un seul noyau multilobé et dense, et plusieurs granules cytoplasmiques (**Fig. 1**), d'où leur nom de granulocytes polymorphonucléaires. Le neutrophile mature a une forme sphérique de 12 à 15 µm de diamètre avec plusieurs projections membranaires. Le cytoplasme constitue environ 65% du volume total de la cellule et le noyau en occupe 20%. Le cytoplasme est chargé de granules qui occupent environ 15% du volume cellulaire (Edwards, 1994 ; Abbas *et al.*, 2012). Le cytoplasme des neutrophiles contient peu d'appareils de Golgi et de réticulum endoplasmique, ces observations sont aussi à l'origine de la conclusion erronée que les neutrophiles matures soient biosynthétiquement inertes. Il y a également très peu de mitochondries, les neutrophiles matures obtiennent donc l'énergie requise pour leurs fonctions cellulaires de la glycolyse, qui est un processus indépendant de l'oxygène (Borregaard et Herlin, 1982 ; Edwards, 1994). Ainsi, les neutrophiles sont capables de fonctionner efficacement dans un environnement à faible taux d'oxygène du tissu enflammé.

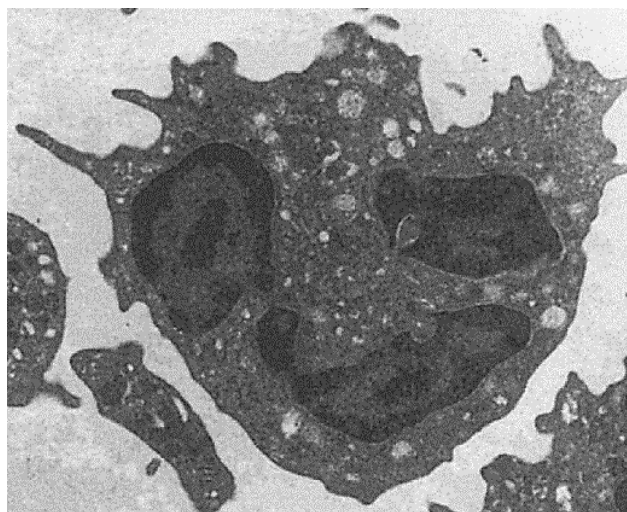


Figure 1. Micrographie électronique du neutrophile, montrant son noyau polymorphe et ses nombreuses granules (Edwards, 1994)

Le noyau comprend typiquement trois à quatre segments, où la chromatine est grossièrement amassée. Cette structure anormale de la chromatine a été longtemps considérée comme preuve de l'inactivité transcriptionnelle du neutrophile (Edwards, 1994). Cependant, et malgré sa chromatine dense et la rareté de ces ARNm et ribosomes, le neutrophile est capable d'augmenter l'expression d'un large groupe de gènes en réponse à divers stimuli (Zhang *et al.*, 2004). Le nombre des lobes du noyau des neutrophiles humains peut changer durant l'activation du neutrophile (2 à 6 lobes) (Campbell *et al.*, 1995 ; Olins et Olins, 2005 ; Fuchs *et al.*, 2007; Hoffmann *et al.*, 2007). La morphologie multilobée du noyau des neutrophiles humains serait impliquée dans l'augmentation de la motilité cellulaire à travers les espaces tissulaires étroits (Hoffmann *et al.*, 2007), et dans le renforcement de la phagocytose comme le noyau segmenté offre théoriquement un espace plus large pour englober le pathogène dans le cytoplasme (Carvalho *et al.*, 2015).

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants du sang, comptant 40 à 60% des globules blancs (Edwards, 1994). Le nombre des neutrophiles varie de 2,5 à 7,5 milliards de cellules par litre de sang (Cassatella, 2010). Ce nombre peut dramatiquement augmenter, jusqu'à dix fois plus, dans le cas d'une infection. Les neutrophiles sanguins ont une durée de vie courte, de 8 à 20 heures, qui peut être prolongée à plusieurs jours si les cellules quittent la circulation et gagnent les tissus (Edwards, 1994). L'abondance des neutrophiles, couplée à leur courte durée de vie dans la circulation, exige un taux de production basal par la moelle osseuse de 5×10^{10} à 10×10^{10} de neutrophiles/jour, l'avantage pour l'organisme de ce renouvellement rapide est incertain (Summers *et al.*, 2010). La production des neutrophiles est quantitativement l'activité majeure de la moelle osseuse ; approximativement les deux tiers de l'activité hématopoïétique est consacrée à la myélopoïèse, un terme utilisé pour la production collective des monocytes et granulocytes (Borregaard, 2010). Les granules sont formés séquentiellement durant la différenciation granulocytaire dans la moelle osseuse. Les granules azurophiles et spécifiques sont formés durant les stades promyélocyte et myélocyte-métamyélocyte respectivement, tandis que les granules à gélatinase apparaissent au stade du granulocyte segmenté (Borregaard, 2010). Au fur et à mesure que les précurseurs myéloïdes se transforment en neutrophiles matures, ils acquièrent des récepteurs et des protéines nécessaires à leur rôle de défense (Faurschou et Borregaard, 2003).

La production des neutrophiles est largement régulée par le taux d'apoptose des neutrophiles dans les tissus. Lorsque les macrophages et les cellules dendritiques phagocytent les neutrophiles apoptotiques dans les tissus, leur taux de production de l'interleukine 23 (IL-23) est réduit (Stark *et al.*, 2005 ; Ley *et al.*, 2006; von Vietinghoff et Ley, 2009). L'IL-23

stimule la production de l'IL-17A par des lymphocytes T spécialisés connus sous le nom des cellules T régulatrices des neutrophiles, largement localisés dans les ganglions lymphatiques mésentériques, et représentés principalement par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et NK-like (Ley *et al.*, 2006). L'IL-17A est un stimulus important de la production du G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) (Schwarzenberger *et al.*, 2000). La production du G-CSF est par conséquent réduite quand le nombre des neutrophiles dans les tissus augmente.

I.1.2. Les granules des neutrophiles

Les PMN contiennent quatre types de granules cytoplasmiques ; les granules azurophiles, les granules spécifiques, les granules à gélatinase et les vésicules sécrétoires. Ces granules, formés à différents stades du développement du neutrophile, diffèrent dans leur contenu (**Fig. 2**). Cette distinction est opérationnelle puisqu'elle reflète aussi des différences de mobilisation, où les granules formés en dernier sont les premiers à être libérés (Borregaard *et al.*, 1995 ; Borregaard et Cowland, 1997). Les granules sont formés par un processus continu, les vésicules bourgeonnent de l'appareil de Golgi et fusionnent, produisant des structures granulaires. Leur contenu est dicté par le programme de transcription actif au moment de leur formation. Alors que le neutrophile altère séquentiellement son profil transcriptionnel, le contenu des granules change, résultant en un continuum d'espèces granulaires avec des cargos chevauchants (Borregaard et Cowland, 1997 ; Amulic *et al.*, 2012).

Les granules des neutrophiles jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse inflammatoire et la digestion du matériel phagocyté grâce aux lysozymes, protéases et molécules bactéricides qu'ils contiennent (Borregaard et Cowland, 1997). Les granules constituent également d'importants réservoirs de protéines membranaires qui sont exprimées à la surface du neutrophile quand ces granules fusionnent avec la membrane plasmique (Borregaard *et al.*, 1983; Todd *et al.*, 1984) de façon à changer la capacité du neutrophile à interagir avec son environnement.

I.1.2.1. Les granules azurophiles (primaires)

Les granules azurophiles, appelés aussi peroxydase-positifs ou encore granules primaires, sont les plus larges des granules du neutrophile, ils mesurent 0,3 μm de diamètre et sont les premiers formés durant la maturation. Ils sont ainsi appelés pour leur capacité de retenir le colorant basique azure A. Les granules azurophiles subissent une exocytose limitée en réponse à la stimulation (Sengelov *et al.*, 1993 ; Faurschou *et al.*, 2002) et contribuent principalement à la destruction des microorganismes phagocytés dans le phagolysosome (Joiner *et al.*, 1989).

Myeloblast	Promyelocyte	Myelocyte	Metamyelocyte	Band cell	PMN
Azurophil granules	Specific granules	Gelatinase granules	Secretory granules		
Neutrophil elastase Cathepsin G Proteinase 3	Collagenase (MMP8) uPA	Gelatinase (MMP9) Arginase 1 Leukolysin (MMP25)	Leukolysin (MMP25) Proteinase 3	Proteases	
Myeloperoxidase (MPO) Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) Defensins Lysozyme	hCAP18 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) B ₁₂ -binding protein Lysozyme Lactoferrin Haptoglobin Pentraxin 3 Prodefensin Gp91 ^{phox} /p22 ^{phox}	Lysozyme Gp91 ^{phox} /p22 ^{phox}	Gp91 ^{phox} /p22 ^{phox}	Antibacterial proteins	
	CD11b/CD18 CD66 CD67	CD11b/CD18 CD67	CD11b/CD18 CD67	Adhesion molecules	
	uPAR Laminin-R Thrombospondin-R		CD35 (CR1) CD16 CD14 C1q-R fMLPR	Receptors	
Sialidase Heparin-binding protein (HBP) β-Glucuronidase Granulophysin (CD63) Presenilin Acid β-glycerophosphatase Acid mucopolysaccharide α ₁ -Antitrypsin α-Mannosidase β-Glycerophosphatase N-acetyl-β-glucosaminidase	Secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) Orosomucoid Histaminase Heparanase β ₂ -Microglobulin CRISP3 SNAP-23 VAMP-2 Stomatin	β ₂ -Microglobulin CRISP3 SNAP-23 VAMP-2 Nrap1	Plasma proteins (including albumin) SNAP-23 VAMP-2 Nrap1 Alkaline phosphatase DAF CD10 CD13 Heparin-binding protein (HBP)	Other classes of functional proteins	
Increasing tendency of granule release					

Figure 2. Les granules des neutrophiles (Cassatella, 2010).

La protéine caractéristique des granules azurophiles est la Myéloperoxydase (MPO) ; une enzyme requise pour une activité antimicrobienne optimale (Klebanoff, 2005). En présence du H₂O₂, la MPO est capable d'oxyder le chlorure, la tyrosine et les nitrites, pour produire l'acide hypochloreux (HOCL), les radicaux tyrosines et des formes réactives de l'azote, qui sont tous capables d'attaquer les membranes des microorganismes (Klebanoff, 1999). Les granules azurophiles sont également caractérisés par leur contenu en α-défensines qui en sont les constituants majeurs. Les défensines sont de petits peptides cationiques qui exercent une activité antimicrobiennes sur un groupe étendu de bactéries, champignons, virus et protozoaires (Ganz *et al.*, 1985 ; Daher *et al.*, 1986; Lehrer *et al.*, 1988). Le BPI (Bacterial Permeability-Increasing protein) est un autre peptide antimicrobien des granules azurophiles qui tue les bactéries Gram⁺ à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Elsbach, 1998).

Les granules azurophiles contiennent trois sérine-protéases microbicides ; la protéinase-3, la cathepsine G et l'élastase, qui possèdent une activité protéolytique contre une variété de composants de la matrice extracellulaire, comme l'élastine, la fibronectine, la laminine, le

collagène type IV et la vitronectine. Ces protéases induisent l'activation des cellules endothéliales et épithéliales, des macrophages, des lymphocytes et des plaquettes, et possèdent des activités antimicrobiennes (Owen et Campbell, 1999). Un analogue des sérine protéases à propriétés antimicrobienne ; l'azurocidine, a été également identifié dans les granules azurophiles des neutrophiles (Campanelli *et al.*, 1990). L'azurocidine est chimiotactique pour les monocytes, fibroblastes et lymphocytes T (Chertov *et al.*, 1996) et augmente la perméabilité vasculaire durant la diapédèse des neutrophiles (Gautam *et al.*, 2001). A l'inverse des autres sérine protéases, l'azurocidine est protéolytiquement inactive (Flodgaard *et al.*, 1991).

I.1.2.2. Les granules spécifiques (secondaires)

Les granules spécifiques ou secondaires, appelés aussi peroxydase-négatifs, représentent la seconde sous-population majeure des granules du neutrophile humain. Ils sont plus petits que les granules azurophiles (mesurant 0,1 μm de diamètre) mais sont 3 fois plus nombreux (Nusse et Lindau, 1988 ; Lacy, 2005). Les granules spécifiques sont formés après les granules azurophiles, ils ne contiennent pas de MPO et sont caractérisés par la présence de lactoferrine et d'autres protéines antimicrobiennes comme le lysozyme, la lipocaline NGAL, et hCAP-18 (Scher *et al.*, 2010). La lactoferrine possède une activité antimicrobienne directe contre les bactéries qui implique la perméabilisation de leurs membranes (Bellamy *et al.*, 1992). De plus, elle séquestre le fer nécessaire à la croissance de plusieurs microorganismes et en même temps fourni le fer requis pour la génération du radical $\cdot\text{OH}$ dans le neutrophile contribuant ainsi à son activité microbicide (Klebanoff et Waltersdorff, 1990). Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs), comme la collagénase-2 (MMP-8), la gélatinase-B (MMP-9) et la leucolysine (MMP-25), constituent une famille particulièrement importante des protéinases rencontrées dans les granules spécifiques. Ces enzymes sont capables de déstabiliser les composants structuraux majeurs des bactéries et membranes cellulaires et sont cruciaux, non seulement à la destruction des bactéries, mais aussi à l'extravasation et la migration des PMN (Owen et Campbell, 1999; Scher *et al.*, 2010).

En plus des molécules solubles, les granules spécifiques possèdent une large gamme de protéines membranaires et constituent ainsi un dépôt de stockage des protéines qui peuvent être orientées aussi bien vers la membrane des vacuoles phagocytaires que vers la surface cellulaire (Scher *et al.*, 2010). Les granules spécifiques abritent des molécules d'adhésion (CD11b/CD18) (Bainton *et al.*, 1987), des récepteurs pour les éléments de la matrice extracellulaire (Fibronectin-R, Laminin-R, vitronectin-R) (Singer *et al.*, 1989) ou encore des récepteurs pour les chimioattractants comme le récepteur au peptide bactérien formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF) appelé FPR (Fletcher *et al.*, 1982). Les granules spécifiques expriment

le pool cellulaire le plus important (80%) du flavocytochrome b558 (gp91^{PHOX} /p22^{PHOX}), le composant membranaire de la NADPH oxydase phagocytaire (Borregaard *et al.*, 1983; Jesaitis *et al.*, 1990).

I.1.2.3. Les granules à gélatinase (tertiaires)

Les granules à gélatinase ou tertiaires, également MPO-négatifs, sont plus petits que les granules spécifiques et ne contiennent pas de lactoferrine. Les granules à gélatinase sont les derniers formés durant la maturation des neutrophiles (Borregaard, 2010) et sont caractérisés par leur richesse en gélatinase (Kjeldsen *et al.*, 1993). Le collagène type IV, un constituant majeur de la membrane basale, ainsi que le collagène type V des tissus interstitiels sont des substrats de la collagénase. L'exocytose de la gélatinase des granules tertiaires est essentiel à la migration des neutrophiles à travers les membranes basales (Borregaard *et al.*, 1997).

Bien que les granules secondaires et tertiaires ont plusieurs propriétés communes, ils diffèrent significativement les uns des autres par leur contenu et leurs propriétés sécrétoires. Alors que les granules spécifiques sont riches en substances bactéricides, les granules à gélatinase ne le sont pas (**Fig. 2**). Inversement, les granules à gélatinase sont plus facilement libérés (Sengelov *et al.*, 1995). Ces caractéristiques reflètent l'importance de ces granules comme des réservoirs d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire et de récepteurs membranaires requis durant l'extravasation et la diapédèse, tandis que les granules spécifiques participent essentiellement à la microbicidie du neutrophile par la mobilisation de leur arsenal de substances antimicrobiennes vers le phagosome ou l'espace extracellulaire (Faurschou et Borregaard, 2003).

I.1.2.4. Les vésicules sécrétoires

Les vésicules sécrétoires sont communément considérées comme une partie du système granulaire des neutrophiles. À la différence des granules classiques, ces vésicules ne bourgeonnent pas de l'appareil de Golgi, mais sont plutôt formés par endocytose durant les stades finaux de la maturation du neutrophile (Borregaard *et al.*, 2007). Par conséquent, la majeure partie de leur contenu est représentée par des protéines dérivées du plasma comme l'albumine (Borregaard *et al.*, 1992). Il est à noter que les vésicules sécrétoires ne font pas partie du système constitutif d'endocytose/exocytose, une fois mobilisées elles ne sont pas reformées (Borregaard et Cowland, 1997). L'importance des vésicules sécrétoires réside dans leur membrane, qui est le principal réservoir de récepteurs (comprenant les β 2-integrines ou CD18, le récepteur du complément CR1, le récepteur FPR, le CD14, et le récepteur Fc γ III ou CD16), qui, une fois mobilisés à la membrane cellulaire, permettent au neutrophile d'interagir avec son

environnement et de répondre aux différentes stimulations. En plus de ces molécules membranaires, les vésicules sécrétoires hébergent une protéine liant l'héparine ou HBP (pour heparin-binding protein) dont la libération durant le stade précoce de l'extravasation des neutrophiles serait essentielle à l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le neutrophile (Cassatella, 2010).

Le contenu et l'ordre de mobilisation des différents granules reflète leurs fonctions : *i)* Les vésicules sécrétoires sont mobilisées en premier lorsque le contact primaire entre le neutrophile et les cellules endothéliales activées est établi via les sélectines et leurs ligands ; *ii)* Les molécules membranaires des vésicules sécrétoires ainsi intégrées à la membrane cellulaire du neutrophile lui permettent de s'adhérer fermement à l'endothélium ; *iii)* La libération séquentielle de la gélatinase contenue dans les granules tertiaires induit la dégradation du collagène IV des membranes basales permettant au neutrophile de tracer son chemin vers le foyer inflammatoire ; *iv)* La mobilisation des granules spécifiques augmente le potentiel phagocytaire du neutrophile en fournissant le CR3 (complement receptor 3 ou CD11/CD18) ; *v)* et enfin, la fusion des granules azurophiles et spécifiques avec le phagosome crée un environnement favorable pour la bactéricidie dépendante et indépendante de l'oxygène (Borregaard et Cowland, 1997).

I.1.3. Fonctions du neutrophile

Chez le sujet sein, les neutrophiles existent dans un état de repos, assurant que leur contenu granulaire toxique ne soit pas accidentellement libéré pour endommager le tissu hôte. Les neutrophiles deviennent activés via un processus en deux étapes ; *i)* les neutrophiles au repos peuvent devenir primés par des agents incluant des produits bactériens, des cytokines ou des chimiokines (ex. TNF α , GM-CSF, IL-8, IFN γ) (Hallett et Lloyds, 1995) et *ii)* les neutrophiles primés sont par la suite mobilisés vers le site de l'agression, où ils rencontrent les signaux d'activation qui déclenchent la phagocytose et la destruction du microbe (Wright *et al.*, 2010).

La destruction optimale des microbes requiert la production des FRO toxiques générées par le complexe multienzymatique NADPH oxydase, elle implique également des événements indépendants de l'oxygène, en particulier la libération dans le phagosome des enzymes protéolytiques, des défensines et des peptides antibactériens contenus dans les granules intracellulaires (Nauseef, 2007 ; El-Benna *et al.*, 2009). Si les neutrophiles détectent le TNF α (tumor necrosis factor α) mais ne rencontrent pas directement de particules microbiennes dans le tissu, ils libèrent leurs granules dans le milieu extracellulaire dans une tentative de créer un

environnement inhospitalier aux pathogènes se trouvant à proximité (Nathan, 2006). Le contenu de ces granules n'est pas uniquement toxique pour les organismes microbiens mais engendre des lésions significatives du tissu et des cellules de l'hôte. Cette toxicité, ni aléatoire ni accidentelle, sert à contenir l'infection durant la phase précoce, le temps que la réponse immunitaire soit proprement développée (Barton, 2008). Les neutrophiles fortement activés peuvent éliminer les microbes extracellulaires par libération des NETs (neutrophil extracellular traps) ; il s'agit de fibres de chromatine auxquelles sont associées des protéines (comme la lactoferrine et les cathepsines), et des enzymes (comme la MPO et l'élastase) provenant des granules des neutrophiles (Brinkmann *et al.*, 2004). Les NETs immobilisent les pathogènes, les empêchant ainsi de se disperser tout en facilitant leur phagocytose (Kolaczkowska et Kubes, 2013). Alors que les fonctions des neutrophiles ont longtemps été restreintes à leur rôle de cellules phagocytaires « tueuses », il est maintenant bien reconnu qu'ils jouent un rôle beaucoup plus complexe, participant à l'engagement et à la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives, ainsi qu'à l'homéostasie tissulaire (Nathan, 2006 ; Mantovani *et al.*, 2011).

I.1.3.1. Recrutement et migration vers le foyer inflammatoire

Le recrutement des neutrophiles circulants vers le site de l'agression est fondamentalement important. Ce processus comporte une séquence d'évènements où les neutrophiles sensibilisés passent par les étapes de roulement, arrêt, adhésion ferme et diapédèse (**Fig. 3**), suivies par le chimiotactisme qui assure leur migration vers le foyer inflammatoire en suivant un gradient croissant de chimioattractants (Borregaard, 2010).

En réponse aux pathogènes envahissants, les macrophages et mastocytes résidents du tissu sécrètent le TNF, l'IL-1 β et plusieurs autres cytokines qui activent les cellules endothéliales, ces cellules expriment alors des molécules d'adhésion et capturent les neutrophiles circulants (Schramm et Thorlacius, 2004 ; Kolaczkowska et Kubes, 2013). La capacité des neutrophiles circulants à s'adhérer à l'endothélium est une étape importante et requise pour leur concentration et leur orientation vers le site de l'inflammation (Scher *et al.*, 2010). Les neutrophiles sont capturés par intermédiaire des sélectines qui activent les neutrophiles, les polarisent et induisent l'externalisation des CD11a et CD18 contenus dans les réserves intracellulaires (Nauseef et Borregaard, 2014). Le débit sanguin, ralenti suite à la vasodilatation, facilite l'interaction neutrophile-endothélium via les P- et L-sélectines sur les neutrophiles et les E-sélectines sur les cellules endothéliales. Cette interaction étant réversible et transitoire fait que le neutrophile se déplace en roulant le long de la surface endothéliale (Scher *et al.*, 2010) (**Fig. 3**).

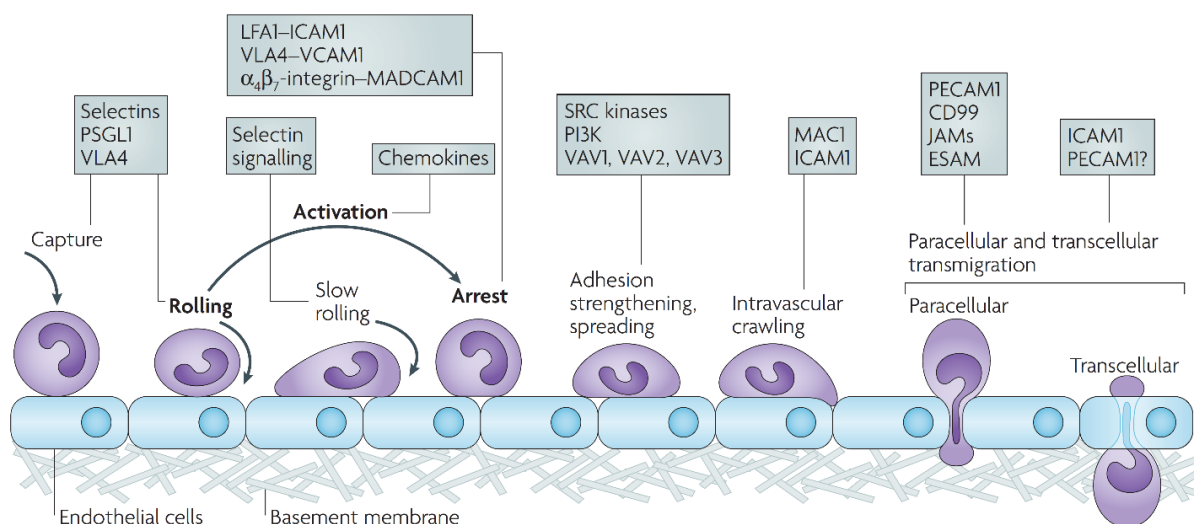


Figure 3. La cascade d'adhésion des leucocytes (Ley *et al.*, 2007).

En réponse à l'IL-8 sécrétée par les macrophages du tissu et activement transportée par les cellules endothéliales (Middleton *et al.*, 1997), aux fragments du complément ou aux peptides formylés générés dans le foyer inflammatoire, les intégrines exprimés à la surface des neutrophiles subissent des changements conformationnels qui leur permettent d'interagir avec leur ligands ; ICAM-1 et ICAM-2 exprimés par les cellules endothéliales (Diacovo *et al.*, 1996). La liaison des intégrines aux ICAMs résulte en l'arrêt des neutrophiles et leur adhésion ferme aux cellules endothéliales et dirige leur mouvement vers la traversée de l'endothélium par diapédèse par voie paracellulaire ou transcellulaire (**Fig. 3**) (Borregaard, 2010; Kolaczowska et Kubes, 2013). La sécrétion des MMPs dégrade la membrane basale et permet aux neutrophiles de tracer leur chemin à travers la matrice extracellulaire. Les MMPs peuvent également améliorer la migration dirigée des neutrophiles en générant les fragments de collagène à propriétés chimiotactiques (Wolf et Friedl, 2011). Une fois dans le compartiment interstitiel, les neutrophiles migrent tout au long d'un gradient croissant de chimioattractants vers le site de la lésion ou de l'infection (Baggiolini et Clark-Lewis, 1992). Un des chimioattractants les plus puissants des neutrophiles est l'interleukine-8.

L'IL-8 est produit par plusieurs types cellulaires comme les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les fibroblastes les cellules endothéliales et les neutrophiles (Kobayashi *et al.*, 2005). Les bactéries produisent aussi des molécules qui recrutent directement les PMN (comme les peptides *N*-formylés) (Showell *et al.*, 1976 ; Schmeling *et al.*, 1979). Le processus de migration altère l'état fonctionnel des PMN ; les neutrophiles tissulaires exhibent une activité NADPH oxydase augmentée en réponse aux agonistes comme les peptides formylés, produisent plus de cytokines pro-inflammatoires et deviennent plus résistants aux stimulations anti-apoptotiques (Kuhns et Gallin, 1995 ;

Christenson *et al.*, 2011; Nauseef et Borregaard, 2014). La reprogrammation des neutrophiles durant leur transformation de cellules circulantes en phagocytes tissulaires façonne le phénotype et l'activité des neutrophiles pour répondre aux besoins fonctionnels, comme la phagocytose, la bactéricidie, la cicatrisation des plaies et la modulation de la réponse immunitaire (Theilgaard-Monch *et al.*, 2004 ; Mantovani *et al.*, 2011).

I.1.3.2. La dégranulation

Au fur et à mesure que le neutrophile poursuit son activation, ses granules sont mobilisés et fusionnent soit avec la membrane plasmique ou le phagosome. Dans les deux cas, la membrane des granules devient une partie permanente de la membrane cible altérant ainsi sa composition moléculaire (Borregaard et Cowland, 1997). A cause de leurs tendances de mobilisation variées, chaque type de granule a été associé à un stade particulier d'activation du neutrophile (Amulic *et al.*, 2012). Après le contact neutrophile-endothélium, la stimulation via les sélectines et les chimioattractants induit la mobilisation des vésicules sécrétoires dont la membrane est riche en récepteurs et molécules d'adhésion, ce qui favorise l'adhésion ferme par intermédiaire des $\beta 2$ -intégrines. Au fur et à mesure que le neutrophile traverse l'endothélium, il reçoit davantage de signaux d'activation qui initient la mobilisation des granules à gélatinase et donc la libération des MMPs qui permettent au neutrophile de traverser la membrane basale. Arrivant au site de l'inflammation, l'activation complète du neutrophile s'ensuit, incitant l'explosion oxydative et la mobilisation des granules spécifiques et azurophiles. La fusion de ces granules avec le phagosome déclenche les mécanismes de bactéricidie et contribue à la création d'un environnement antimicrobien favorisant la dégradation du matériel phagocyté.

Les mécanismes qui contrôlent la mobilisation différentielle des granules du neutrophile ne sont pas entièrement élucidés, néanmoins, la régulation des taux de calcium intracellulaire joue un rôle important (Sengelov *et al.*, 1993). Les granules spécifiques, à gélatinase et les vésicules sécrétoires sont plus sensibles et se mobilisent plus facilement que les granules azurophiles en réponse aux stimuli chimiotactiques et à l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire. Ces différences sont causées par les différentes molécules de signalisation impliquées dans l'exocytose de chaque granule. Ainsi, le calcium est impliqué dans l'interaction des v-SNARE (VAMP) de la surface de la granule avec le t-SNARE (Syntaxin, SNAP) de la membrane plasmique (Borregaard *et al.*, 1993; Sengelov *et al.*, 1993). L'élévation des concentrations cytosoliques du Ca^{2+} est induite par divers stimuli incluant l'engagement des L-sélectines, des CD11b/CD18 et du récepteur fMLF (Ng-Sikorski *et al.*, 1991; Sengelov *et al.*, 1993 ; Laudanna *et al.*, 1994). L'engagement des $\beta 2$ intégrines induit l'activation des tyrosines kinases (Fuortes

et al., 1993 ; Berton *et al.*, 1994), qui phosphorylent et activent des protéines comme la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) et la phospholipase D (PLD) (Fallman *et al.*, 1992; Hellberg *et al.*, 1996). Les phospholipases activées génèrent l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3), le diacylglycérol (DAG) et l'acide phosphatidique (PA), qui activent la protéine kinase C (PKC) et induisent la libération du Ca²⁺ des réserves intracellulaires et l'influx du Ca²⁺ à travers la membrane plasmique (Agwu *et al.*, 1989; Fallman *et al.*, 1992; Suchard *et al.*, 1994 ; Hellberg *et al.*, 1996 ; Berton et Lowell, 1999). La stimulation via le récepteur fMLF couplé à la protéine G augmente rapidement les concentrations cytosoliques de l'IP3 à des taux suffisants pour mobiliser le Ca²⁺ des réserves intracellulaires (Bradford et Rubin, 1986). La stimulation du neutrophile via le récepteur fMLF entraîne la phosphorylation d'une large gamme de kinases qui activent leurs voies effectrices respectives. Les tyrosines kinases de la famille Src sont impliquées dans l'exocytose dans le neutrophile, où différentes populations de granules semblent être contrôlées par différentes Src kinases (Lacy, 2006). Mocsai *et al.* (2000) ont montré que le traitement des neutrophiles humains par le PP1, un inhibiteur spécifique de la famille Src, entraîne l'inhibition de la libération des granules primaires, secondaires et des vésicules sécrétoires induite par le fMLF. De même, dans les neutrophiles isolés des souris déficientes en Src kinases Hck, Fgr et Lyn, une défaillance de libération des granules secondaires est observée. Cette déficience est corrélée à une réduction de l'activité de la p38 MAPK (Fumagalli *et al.*, 2007). En effet, le SB203580, un inhibiteur des p38 MAPK, entraîne la réduction de la libération des granules primaires et secondaires en réponse au fMLF, alors qu'elle est insensible au blockage de la voie ERK par le PD98059. Le blockage de l'activité de la p38 MAPK par le PP1 ainsi que par la triple mutation *hck*^{-/-} *fgr*^{-/-} *lyn*^{-/-} suggère que les kinases Src agissent en amont de la p38 MAPK (Mocsai *et al.*, 2000).

Le rôle des PKC dans la régulation de la dégranulation dans le neutrophile n'est pas très clair, toutefois, leur implication dans ce processus a été démontrée par l'utilisation d'activateurs non-physiologiques de la PKC, comme le Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) qui provoque la libération des granules spécifiques (Esaguy *et al.*, 1991; Zaman *et al.*, 1994). Le PMA n'affecte pas les niveaux basals du Ca²⁺ intracellulaire même à des concentrations élevés (Pontremoli *et al.*, 1986) et il est un faible inducteur de la libération des granules azurophiles (Nagaji, 1999). Le neutrophile humain exprime différentes isoformes de PKC (α , β I, β II, δ , et ζ) (Majumdar *et al.*, 1991; Smallwood et Malawista, 1992 ; Dang *et al.*, 1994; Kent *et al.*, 1996) dont trois auraient des rôles plus ou moins importants dans la dégranulation. Dans les neutrophiles isolés de souris knock-out pour le gène de PKC- δ , une réduction importante de la libération de lactoferrine en réponse au fMLF ou au PMA est observée (Chou *et al.*, 2004).

Popa-Nita *et al.* (2009) ont rapporté l'implication des isoformes classiques des PKC (cPKC) dans la dégranulation induite par les cristaux d'urate, et ont démontré une translocation à la membrane des isoformes classiques α et β après activation des neutrophiles par ces cristaux *in vitro*. Il est à noter que les réponses exocytotiques aux divers stimuli physiologiques montrent une faible sensibilité aux inhibiteurs pharmacologiques de la PKC. Bien que la dégranulation induite par le fMLF ou le leucotriène B₄ (LTB₄) soit réduite par le K252a, l'exocytose des granules en réponse au zymosan opsonisé n'en est que marginalement sensible (Smith *et al.*, 1988 ; Nagaji, 1999). Le rôle des PKC serait donc d'améliorer la réponse sécrétoire plutôt que l'induction de la fusion exocytique (Lacy, 2005).

Récemment, le rôle d'une autre kinase, Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) dans le processus de la dégranulation a été décrit (Kamen *et al.*, 2011). Suite à l'engagement des intégrines, Pyk2 subit une autophosphorylation Ca^{2+} -dépendante permettant son association aux Src kinases. Pyk2 agit en phosphorylant la paxilline et Vav. Cette dernière est un activateur direct de la petite protéine G Rac qui remodèle l'actine et facilite la dégranulation (C Kim *et al.*, 2003), alors que la paxilline sert de protéine d'échafaudage et exerce un effet direct sur l'assemblage des microtubules qui peut contribuer à la motilité polarisée des granules (Efimov *et al.*, 2008).

I.1.3.3. Phagocytose et mécanismes de bactéricidie

Arrivés au site de l'infection, les PMN reconnaissent, phagocytent et détruisent les pathogènes envahissants. La phagocytose est initiée par la reconnaissance de motifs microbiens appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) par les TLRs (Toll like receptors) (Ozinsky *et al.*, 2000; Underhill et Ozinsky, 2002) et d'autres PRRs (Pattern Recognition Receptors) exprimés par le neutrophile. L'engagement des TLRs, en particulier TLR2 et 4, active des voies de signalisation qui prolongent la survie cellulaire, facilitent l'adhésion (Sabroe *et al.*, 2003) et la phagocytose (Hayashi *et al.*, 2003), induisent la libération des cytokines, des chimiokines et des FRO (Kurt-Jones *et al.*, 2002 ; Hayashi *et al.*, 2003; Sabroe *et al.*, 2003) et promeut la dégranulation (Bellocchio *et al.*, 2004; Lotz *et al.*, 2004) contribuant ainsi à l'activité microbicide des neutrophiles. Quoique les PRRs jouent un rôle important dans la reconnaissance des microbes, l'efficacité de la phagocytose est nettement améliorée par l'opsonisation des pathogènes par les immunoglobulines et les fragments C3b du complément. L'opsonisation des bactéries par les immunoglobulines joue un rôle particulier dans la réponse des neutrophiles aux bactéries encapsulées comme leur capsule les aide à évader la phagocytose directe (Ravetch et Kinet, 1991).

Le neutrophile détruit les pathogènes par divers mécanismes qui impliquent la fusion des granules cytoplasmiques, la production des FRO, l'activation des enzymes protéolytiques et l'activité des protéines antimicrobiennes (**Fig. 4**). Le phagosome fusionne avec les granules du neutrophile pour former le phagolysosome, un espace riche en molécules microbicides nécessaires à la destruction des pathogènes (Scher *et al.*, 2010).

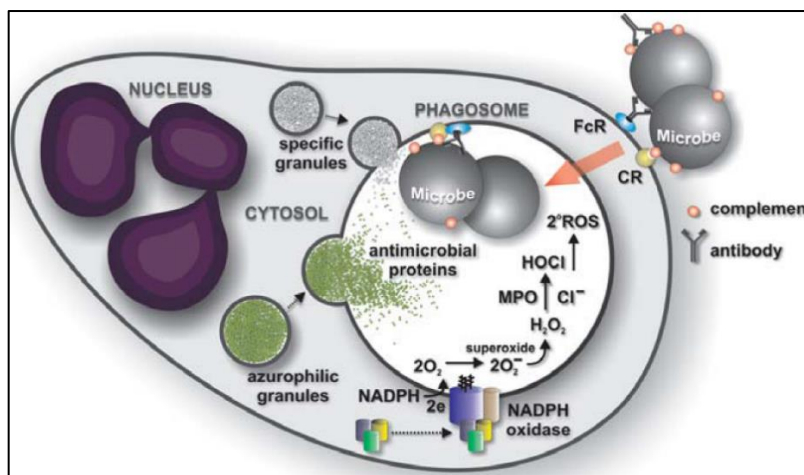


Figure 4. Phagocytose et activation des mécanismes de bactéricidie du neutrophile (Kobayashi *et al.*, 2005).

Le PMN utilise deux mécanismes principaux, dépendants et indépendants de l'oxygène, pour tuer les microbes ingérés, le mécanisme prédominant dépend de l'espèce microbienne et du microenvironnement métabolique (aérobie ou anaérobie) (Rosen et Michel, 1997).

a) Mécanisme bactéricide dépendant de l'oxygène

Le mécanisme dépendant de l'oxygène repose sur la production rapide des FRO, appelée « explosion oxydative », en réponse à divers stimuli inflammatoires. Ce phénomène, accompagné d'une augmentation de la consommation de l'oxygène, permet la réduction de l' O_2 en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) à travers l'activation d'un système enzymatique unique aux cellules phagocytaires : la NADPH oxydase (Cassatella, 2010). Une fois libéré dans le phagosome, le $O_2^{\cdot-}$ est converti par la superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 . En présence des ions Cl^- , le H_2O_2 est converti par la MPO en HOCl qui détient un fort potentiel antimicrobien (Hampton *et al.*, 1998). Le $O_2^{\cdot-}$ peut également être converti en d'autres formes réactives à propriétés microbicide comme le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) et l'oxygène singulet (1O_2) (Klebanoff, 2005 ; Kobayashi *et al.*, 2005). L'anion superoxyde peut également servir de substrat aux réactions avec les autres radicaux ; à titre d'exemple, il peut réagir avec l'oxyde nitrique (NO) pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) hautement cytotoxique. Dans le phagosome, les

concentrations élevées des FRO sont très toxiques et contribuent ultimement à la destruction des microbes phagocytés (Cassatella, 2010).

b) Mécanisme bactéricide indépendant de l'oxygène

Le mécanisme de bactéricidie dit « indépendant de l'oxygène » repose sur la libération dans le phagosome d'enzymes de dégradation et de molécules antimicrobiennes contenues dans les granules cytosoliques du neutrophiles (**Tableau I**) (Cassatella, 2010). Bien que les protéines antibactériennes comme les BPI, les défensines et les cathelicidines, sont structuralement différentes, mais elles sont toutes cationiques. Les charges positives servent probablement à la liaison initiale des microorganismes, comme les surfaces bactériennes et fongiques sont généralement anioniques. Une fois liées, les protéines antimicrobiennes perturberaient l'intégrité de la membrane bactérienne (Brinkmann et Zychlinsky, 2007).

Tableau I. Mécanismes d'action des protéines microbicides du neutrophile (Amulic *et al.*, 2012)

Molécule antimicrobienne	Mécanisme de microbicidie^a
Peptides antimicrobiens cationiques	
A-défensines (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4)	▪ Perméabilise les bicouches membranaires contenant des phospholipides négativement chargés ▪ Inhibe la biosynthèse d'ADN, d'ARN et des protéines ▪ Inhibe la synthèse de la paroi bactérienne
LL-37	Formation des pores transmembranaires
BPI	Augmente la perméabilité bactérienne et l'hydrolyse des phospholipides bactériens en se fixant aux LPS
Histones	Mécanismes inconnus
Enzymes protéolytiques	
Lysozyme	Dégrade la paroi cellulaire
Protéinase 3	Mécanisme indépendant de l'activité protéolytique par fixation à la membrane bactérienne
Elastase du neutrophile, Cathépsine G	▪ Clive les facteurs de virulence bactériens et les protéines de la membrane externe ▪ Mécanisme indépendant de l'activité protéolytique par fixation à la membrane bactérienne
Azurocidine	Mécanisme indépendant de l'activité protéolytique par fixation à la membrane bactérienne
Protéines chélatrices de métaux	
Lactoferrine	▪ Altère la croissance bactérienne en séquestrant le fer ▪ Lie le lipide A des LPS causant la libération des LPS de la paroi cellulaire et l'augmentation de la perméabilité membranaire
Calprotectine	Altère la croissance bactérienne en séquestrant le manganèse et le zinc

a : ce tableau cite les activités antimicrobiennes directes uniquement.

LPS : Lipopolysaccharide ; HNP : human neutrophil peptid; BPI: bactericidal/permeability-increasing protein.

c) Nouveau mécanisme bactéricide

En 2004, Brinkmann et ses collaborateurs ont décrit un nouveau mécanisme bactéricide mis en œuvre par les neutrophiles, qui émettent dans le milieu extracellulaire des filaments appelées NETs (neutrophil extracellular traps) composés de chromatine et de protéines comme l'élastase, la cathepsine G, la lactoferrine et la gélatinase, issues des granulations primaires et secondaires. Les auteurs ont montré que ces filaments se lient aux bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les piègent et exercent une activité bactéricide extracellulaire à distance sans même les englober (Brinkmann *et al.*, 2004). La formation des NETs dépend des FRO, de la MPO et de l'élastase du neutrophile (Papayannopoulos *et al.*, 2010 ; Metzler *et al.*, 2011). Ils sont libérés lorsque la cellule meurt, sa membrane se rompant brusquement. Cette mort, ou NETose, par analogie avec d'autres formes de mort cellulaire, la nécrose et l'apoptose, peut ainsi être comparée à un suicide cellulaire permettant au neutrophile d'être une dernière fois utile grâce à son filet antimicrobien (Fuchs *et al.*, 2007). Les NETs sont considérés donc comme un mécanisme de défense innée, indépendant de la phagocytose, qui prévient la dissémination bactérienne ou fongique, permet d'établir des concentrations importantes de substances microbicides dans le voisinage des PMN et de tuer les agents pathogènes (Gougerot-Pocidalo *et al.*, 2007).

I.1.3.4. Régulation des réponses immunitaires et production de cytokines

En plus de ses fonctions de défense antimicrobienne, le neutrophile contribue au développement et à la régulation fine des réponses immunitaires et inflammatoires. Les FRO dérivés du neutrophile modulent la signalisation intracellulaire, régulant les fonctions des cellules environnantes comme leur apoptose, les réponses prolifératives et la production de cytokines (Droge, 2002). Les neutrophiles produisent de nombreux médiateurs de l'inflammation (Hoesel *et al.*, 2005), ainsi que des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Tecchio *et al.*, 2014). Une originalité du neutrophile est de pouvoir libérer rapidement par exocytose des médiateurs et cytokines dès son arrivée sur le site inflammatoire et de relayer dans un deuxième temps cette production par une synthèse *de novo*. Même si la production de cytokines par les neutrophiles est inférieure à celle des monocytes, les neutrophiles sont les premières cellules infiltrant massivement le foyer inflammatoire, suggérant que leur production de cytokines peut être déterminante à ce stade précoce de la réponse immunitaire (Mantovani *et al.*, 2011). Ces molécules coordonnent potentiellement les fonctions précoces des monocytes, macrophages, cellules dendritiques (DC) et lymphocytes. Les neutrophiles produisent le TNF et d'autres cytokines qui induisent l'activation et la différenciation des macrophages et des DC

(Bennouna *et al.*, 2003; Nathan, 2006) et génèrent des chimiokines pour la plupart des cellules immunitaires et en particulier pour les DC participant de ce fait à l'engagement des réponses immunitaires adaptatives. De plus, les neutrophiles interagissent directement avec les DC leur transférant l'antigène et régulant leur maturation (Nathan, 2006 ; Mantovani *et al.*, 2011). Les neutrophiles possèdent une certaine capacité de présenter l'antigène aux lymphocytes T, notamment par présentation croisée (Beauvillain *et al.*, 2007). Les neutrophiles migrent dans les ganglions lymphatiques et sont donc susceptibles d'interagir avec les cellules immunitaires qui y sont présentes (Gougerot-Pocidalo, 2012). Ils contribuent en effet à la prolifération et à la maturation des lymphocytes B en sécrétant le BLyS (Scapini *et al.*, 2005), ainsi qu'à la différenciation des lymphocytes T et à l'activation des macrophages par leur production d'interféron- γ (IFN γ) (Ethuin *et al.*, 2004).

I.1.3.5. Rôle du neutrophile dans la résolution de l'inflammation

Les neutrophiles sont impliqués dans l'induction de la résolution de l'inflammation à travers la production des médiateurs lipidiques résolutifs. Durant les phases finales des réponses inflammatoires aiguës, les PMN commutent leur biosynthèse d'eicosanoïdes du LTB₄ au lipoxine A₄ (LXA₄) qui peut inhiber le recrutement des PMN (Serhan *et al.*, 2008). Les neutrophiles peuvent également contribuer à la biosynthèse des résolvines et de la protectine. Ces médiateurs lipidiques pro-résolutifs inhibent la migration transendothéliale des neutrophiles et leur infiltration tissulaire (Schwab *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008; 2009; Spite *et al.*, 2009). Le rôle des neutrophiles dans la résolution de l'inflammation inclue également le blocage et la séquestration des chimiokines et des cytokines. Les médiateurs lipidiques pro-résolutifs (comme la LXA₄, la résolvine E₁ et la protectine D₁) augmentent l'expression du CCR5 par les neutrophiles apoptotiques qui peuvent donc agir comme piègeurs fonctionnels du CCL3 et CCL5 (Ariel *et al.*, 2006). De plus, les neutrophiles expriment le récepteur leurre D6 capable de piéger virtuellement toutes les CC-chimiokines inflammatoires (McKimmie *et al.*, 2008). Les neutrophiles produisent des taux élevés du récepteur leurre d'IL-1 type 2 dont l'expression est davantage augmentée par les signaux anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes. Ce récepteur leurre lie l'IL-1 et empêche son interaction avec son récepteur IL-1R1 (Bourke *et al.*, 2003). D'autre part, les neutrophiles, particulièrement ceux stimulés par la cytokine anti-inflammatoire IL-10, sont une source majeure de l'antagoniste du récepteur d'IL-1 (IL-1ra) (Bazzoni *et al.*, 2010). Enfin, la reconnaissance et l'ingestion des neutrophiles apoptotiques par les macrophages façonne leur phénotype fonctionnel (Fox *et al.*, 2010). Les macrophages développent un phénotype M2-like IL-10^{hi} IL-12^{lo} qui régule négativement l'inflammation et promeut la réparation du tissu (Bystrom *et al.*, 2008; Filardy *et al.*, 2010).

I.1.4. Implications du neutrophile dans les pathologies inflammatoires

Le recrutement et l'activation des neutrophiles sont soigneusement contrôlés. Néanmoins, la dérégulation de ces mécanismes finement orchestrés peut conduire à une infiltration tissulaire persistante par des neutrophiles, à leur activation prolongée induisant des lésions tissulaires, sous l'action des enzymes lytiques et des FRO, contribuant ainsi à la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires. Les neutrophiles, à travers la libération de leurs produits cytotoxiques, jouent un rôle majeur dans la pathologie de l'arthrite rhumatoïde. Ils contribuent également au développement de cette pathologie inflammatoire par la sécrétion de cytokines et chimiokines pouvant réguler les fonctions de diverses cellules immunitaires, la présentation des antigènes aux lymphocytes T, l'activation des cellules NK via des interactions cellulaires, et la libération de protéases qui peuvent activer ou désactiver les cytokines et chimiokines (Wright *et al.*, 2014).

Les enzymes de l'explosion oxydative du neutrophile (MPO et NADPH oxydase) participent au développement de l'athérosclérose via la production des FRO, ceci est illustré par l'atténuation de la progression de l'athérosclérose par l'inhibition pharmacologique de ces deux enzymes (Liu *et al.*, 2012 ; Kinkade *et al.*, 2013). De plus, l'implication des NETs dans cette pathologie a été récemment rapporté (Knight *et al.*, 2014). Des exemples d'autres pathologies associées aux neutrophiles sont résumés dans le **tableau II**.

Tableau II. Maladies associées au dérèglement des fonctions du neutrophile (adapté de Cassatella, 2010)

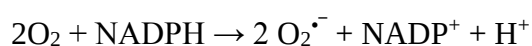
Maladies	Exemples
Maladies causées par des lésions d'ischémie/reperfusion	Infarctus de myocarde, transplantation
Infections bactériennes	Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte, choc endotoxique, ostéomyélite, endocardite, pyélonéphrite aigüe et chronique
Maladies médiées par les cytokines	Arthrite rhumatoïde, maladies inflammatoires de l'intestin
Maladies causées par le dépôt des cristaux	Goûte, chondrocalcinose articulaire
Maladies médiées par le complexe immunitaire	Vascularite, Lupus, syndrome de Goodpasture
Vascularites associées aux anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques	Granulomatose de Wegener, glomérulonéphrite paucimunitaire
Maladies des voies respiratoires	Maladie pulmonaire obstructive chronique, bronchiectasie, bronchiolite, fibrose kystique et certaines formes d'asthme

I.2. La NADPH oxydase phagocytaire

La NADPH oxydase (NOX) a été initialement décrite en 1964 dans les cellules phagocytaires par Rossi et Zatti comme l'enzyme responsable de l'explosion respiratoire (Rossi et Zatti, 1964). Neuf ans plus tard, Babior *et al.* (1973) ont apporté la première preuve que cette enzyme catalyse la formation de l'anion superoxyde à partir de l'oxygène moléculaire, au dépens du NADPH (Kleniewska *et al.*, 2012). De nos jours, il est connu que les NADPH oxydases constituent une famille comptant sept membres ; cinq NOX et deux DUOX (pour dual oxydase). Ces enzymes ont été identifiées dans différents tissus et présentent des similarités avec la sous unité catalytique gp91^{PHOX} (^{PHOX} pour phagocyte oxydase) de la NADPH phagocytaire (appelée aussi NOX2) (Panday *et al.*, 2015). NOX1, 2, 3 et 5 réduisent l'oxygène moléculaire en O₂^{•-} (Miller *et al.*, 2006), alors que NOX4, DUOX1 et DUOX2 produisent directement le H₂O₂ (Chen *et al.*, 2008). La fonction essentielle des NOX est de générer les FRO qui participent à la défense anti-infectieuse de l'hôte, à la signalisation cellulaire, à l'activation des facteurs de transcription et la mobilisation des systèmes de transport d'ions (Lambeth *et al.*, 2008). La NADPH oxydase phagocytaire joue un rôle central dans la défense anti-infectieuse de l'hôte. Ce rôle est bien illustré par la granulomatose septique chronique (CGD), un déficit immunitaire sévère causé par une mutation au niveau des gènes qui codent pour l'un des composants de la NADPH oxydase et caractérisé par des infections bactériennes et fongiques graves et récidivantes (Roos *et al.*, 1996).

I.2.1. Structure de la NADPH oxydase phagocytaire

La NADPH oxydase phagocytaire est composée de deux protéines membranaires ; gp91^{PHOX} et p22^{PHOX}, de trois protéines cytosoliques p40^{PHOX}, p47^{PHOX} et p67^{PHOX} et de la petite protéine G Rac. La sous unité catalytique gp91^{PHOX} (ou NOX2) forme avec la p22^{PHOX} un hétérodimère dénommé flavocytochrome b558 (Leusen *et al.*, 1996 ; Babior, 1999). Les sous unités régulatrices p40^{PHOX}, p47^{PHOX} et p67^{PHOX} forment un complexe cytosolique qui, suite à une stimulation appropriée, migrent vers la membrane pour s'associer au flavocytochrome b558 et former l'oxydase active. Le flavocytochrome b558 s'associe aussi avec une petite protéine G rap1A, mais le rôle de cette interaction n'est pas connu (El-Benna *et al.*, 2005). L'activation du complexe requiert également la petite protéine G Rac2 (Diebold et Bokoch, 2001) qui se libère de son inhibiteur Rho-GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) pour rejoindre les autres composants à la membrane (**Fig. 5**). La NADPH oxydase ainsi activée catalyse le transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde :



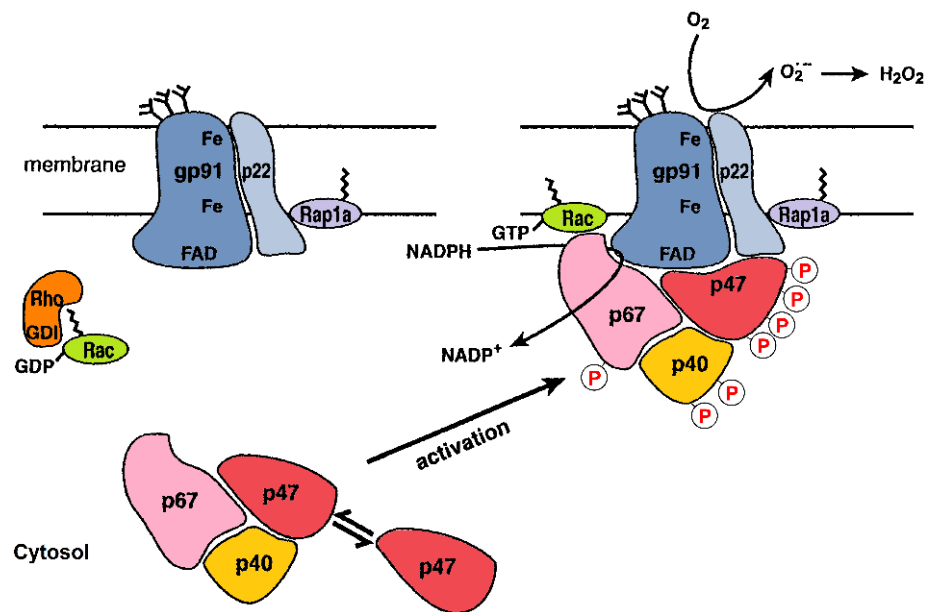


Figure 5. Le complexe NADPH oxydase phagocytaire (modifié de Heyworth *et al.*, 1999)

Au repos (à gauche) les sous-unités de la NADPH oxydase sont réparties entre le cytosol et la membrane. L'activation du phagocyte (à droite) entraîne translocation des sous-unités cytosoliques $p47^{PHOX}$, $p67^{PHOX}$, $p40^{PHOX}$ et Rac2 vers la membrane, ce qui permet l'assemblage de l'oxydase active.

I.2.1.1. Les composants membranaires de la NADPH oxydase phagocytaire

Le flavocytochrome b558, constitué des composants membranaires $gp91^{PHOX}$ et $p22^{PHOX}$, représente le centre catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire. Il s'agit d'un complexe hétérodimérique transmembranaire qui doit son nom à son spectre d'absorption comprenant une bande à 558 nm (Cross *et al.*, 1984). La $gp91^{PHOX}$ et la $p22^{PHOX}$ sont assemblées de façon non-covalente selon une stœchiométrie 1:1 (Wallach et Segal, 1996) formant une hémoflavoprotéine qui contient le système de transport des électrons du NADPH vers l'accepteur oxygène. Le cytochrome b558 a un potentiel d'oxydoréduction très bas (-245 mV) ce qui lui permet de réduire directement l'oxygène de l'air (Rotrosen *et al.*, 1992). Au cours de l'activation du phagocyte, le cytochrome b558 constitue un point d'ancrage sur lequel se fixent les autres composants cytosoliques, en particulier la $p47^{PHOX}$ (Rotrosen *et al.*, 1990), la $p67^{PHOX}$ et Rac2 (Babior *et al.*, 2002). Dans le neutrophile au repos, 85% du cytochrome b558 est concentré dans les granules spécifiques (Borregaard et Tauber, 1984).

a) La $gp91^{PHOX}/NOX2$

La $gp91^{PHOX}$ (appelée aussi sous unité β du cytochrome b558) est une glycoprotéine de 570 acides aminés et un poids moléculaire de 65,3 kDa, mais donne un smear d'approximativement 91 kDa sur les gels de SDS-PAGE à cause de son profil hétérogène de glycosylation sur les résidus asparagine 132, 149 et 420 (Harper *et al.*, 1985; Kleinberg *et al.*,

1989; Wallach et Segal, 1996). Les 300 acides aminés en N-terminal forment six hélices transmembranaires, alors que la partie C-terminal est cytosolique et contient les sites de liaison au FAD et au NADPH (**Fig. 6**) (Rotrosen *et al.*, 1992; Sumimoto *et al.*, 1992 ; Groemping et Rittinger, 2005).

La gp91^{PHOX} est associée à deux groupes hème non identiques qui sont coordonnés d'une manière non-covalente par deux paires d'histidine (Cross *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1998 ; Biberstine-Kinkade *et al.*, 2001). La gp91^{PHOX} contient donc tous les cofacteurs requis pour la réaction de transfert d'électrons qui se produit en deux étapes : lors de la première étape catalytique appelée diaphorase, les électrons sont transférés du NADPH aux groupements héminiques via la flavine FAD, puis durant la seconde étape, les électrons sont transférés à l'oxygène moléculaire pour former le O₂⁻ (Raad *et al.*, 2009).

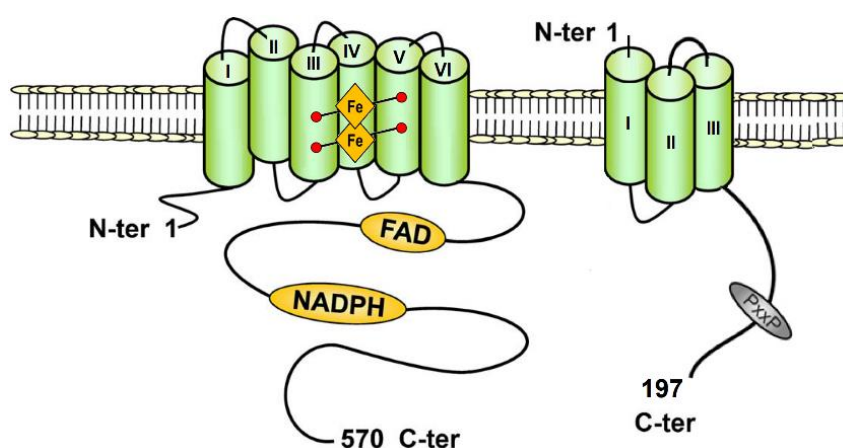


Figure 6. Structure du flavocytochrome b558 (modifié d'El-Benna *et al.*, 2010).

La gp91^{PHOX}/NOX2 (à gauche) est constituée de six hélices transmembranaires. Les deux domaines transmembranaires III et V contiennent chacun deux histidines en coordination avec deux hèmes asymétriques. La longue queue cytoplasmique en C-terminal contient les sites de liaison au FAD et au NADPH. La p22^{PHOX} (à droite) est formée par trois hélices transmembranaires et une queue cytosolique en C-terminale contenant un motif PxxP.

b) La p22^{PHOX}

La p22^{PHOX} (sous unité α du flavocytochrome b558) est une protéine non-glycosylée de 22 kDa comprenant 195 acides aminés (Yu *et al.*, 1997). La partie N-terminale de la p22^{PHOX} contient deux hélices α transmembranaires, la partie C-terminale contient une région riche en résidus proline (PRR ou prolin rich region) reconnaissable par le motif PxxP (**Fig. 6**).

Le domaine PRR de la p22^{PHOX} interagit avec les domaines SH3 (Src homology 3) de la p47^{PHOX} lorsque cette dernière est phosphorylée (Leto *et al.*, 1994). La p22^{PHOX} s'associe à la gp91^{PHOX} d'une façon équimoléculaire, elle est indispensable à la maturation et la stabilisation du cytochrome b558, aussi bien qu'à l'assemblage de la NADPH oxydase (DeLeo *et al.*, 2000).

I.2.1.2. Les composants cytosoliques de la NADPH oxydase phagocytaire

L'activité catalytique de NOX2 est régulée par les sous unités cytosoliques p47^{PHOX}, p67^{PHOX} et Rac1/2. Les p47^{PHOX} et p67^{PHOX} des cellules au repos forment dans le cytosol un complexe hétéromérique d'une stoechiométrie 1:1:1 en association avec la p40^{PHOX} (Wientjes *et al.*, 1993; Wientjes *et al.*, 1996; Zhan *et al.*, 1996 ; Lapouge *et al.*, 2002). Quoique la p40^{PHOX} fasse partie du complexe, sa fonction dans l'assemblage de l'oxydase n'est pas clairement définie (Nauseef, 2004).

a) La p47^{PHOX}

La p47^{PHOX} est la sous unité organisatrice du complexe NADPH oxydase phagocytaire ; elle assure l'association du complexe cytosolique p40^{PHOX}-p47^{PHOX}-p67^{PHOX} au cytochrome b558 au cours de l'activation de l'oxydase. La p47^{PHOX} est une protéine de 44,7 kDa composée de 390 acides aminés. Elle contient un domaine PX (Phox homology, aa : 4-121), deux domaines SH3 en tandem (SH3A, aa : 159-214 et SH3B, aa : 229-284), une région d'auto-inhibition AIR (auto-inhibitory region, a : 292-340), et une région riche en proline (PRR, aa : 363-368) (**Fig.7**) (El-Benna *et al.*, 2009). La partie C-terminale de la p47^{PHOX} est riche en résidus sérine et arginine et confère à la protéine son caractère basique.

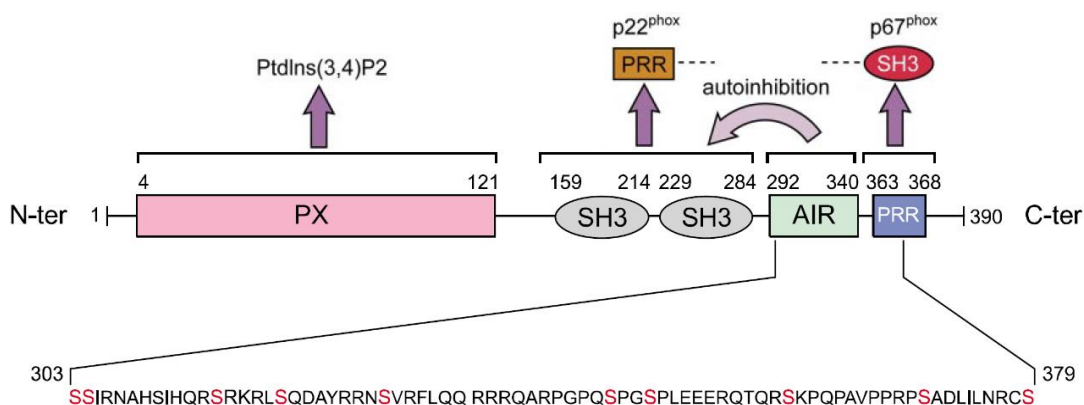


Figure 7. Structure de la p47^{PHOX} (modifié d'El-Benna *et al.*, 2009)

La p47^{PHOX} est composée de 390 acides aminés avec un domaine PX (phox homology, aminoacides 4 à 121), deux domaines SH3 (src homology 3, aminoacides 159 à 214 (SH3A) et aminoacides 229 à 284 (SH3B)), une région AIR (autoinhibitory region, aminoacides 292 à 340) et une région PRR (proline-rich region, aminoacides 363 à 368). La région C-terminale contient plusieurs sérines phosphorylables (en rouge).

La p47^{PHOX} existe au repos sous forme libre ou associée à la p67^{PHOX} et à la p40^{PHOX} constituant un complexe de 250-300kDa (Lapouge *et al.*, 2002). Dans le neutrophile au repos, les deux domaines SH3 de la p47^{PHOX} interagissent intra-moléculairement avec la région AIR de la protéine non-phosphorylée maintenant la p47^{PHOX} dans un état d'auto-inhibition (de Mendez *et al.*, 1997; Groemping *et al.*, 2003). Les deux domaines SH3 servent également à

l'interaction avec la p22^{PHOX} dans l'oxydase activée. La p47^{PHOX} interagit, par son domaine PRR, avec le domaine SH3 en C-terminal de la p67^{PHOX} (Bedard et Krause, 2007). Le domaine PX reconnaît préférentiellement le phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P2) et permet donc l'ancrage de la p47^{PHOX} à la membrane lors de l'assemblage de l'oxydase (Kanai *et al.*, 2001). Durant l'activation de la NADPH oxydase, la p47^{PHOX} est phosphorylée sur plusieurs résidus sérine situés dans la partie C-terminale (**Fig. 7**) (El Benna *et al.*, 1994).

b) La p67^{PHOX}

La p67^{PHOX} (ou sous-unité activatrice de NOX2) est une protéine de 59,8 kDa (526 acides aminés) constituée d'un domaine contenant quatre motifs TPR (tetratricopeptide repeat), d'un domaine PRR et de deux domaines SH3 séparés par un domaine PB1 (Phox and Bem1) (**Fig. 8**) (Groemping et Rittinger, 2005). La partie N-terminale de la p67^{PHOX} contenant les TPR est responsable de l'interaction avec Rac d'une manière GTP-dépendante (Koga *et al.*, 1999). La p67^{PHOX} contient en outre un domaine activateur (AD, aa : 199-210) essentiel à la production du O₂⁻ par NOX2. On pense que cette région pourrait interagir directement avec le flavocytochrome participant ainsi à la régulation du transfert d'électrons (Babior *et al.*, 2002; Nisimoto *et al.*, 1999). Le domaine SH3 en C-terminal de la p67^{PHOX} sert à l'interaction avec le domaine PRR de la p47^{PHOX}, alors que le rôle de l'autre domaine SH3 situé au centre de la protéine n'est pas claire (Bedard et Krause, 2007; Yang *et al.*, 2011). En plus de son interaction inter moléculaire avec la p47^{PHOX}, la p67^{PHOX} interagit, par domaine PB1, avec le domaine PB1 de la p40^{PHOX} (Kuribayashi *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2003).



Figure 8. Structure de la p67^{PHOX} (modifié de Dahan et Pick, 2012)

La p46^{PHOX} contient quatre motifs TPR en N-terminal servant à l'interaction avec Rac, un domaine d'activation régulant l'activité de la gp91^{PHOX} (NOX2), un domaine PB1 d'interaction avec la p40phox, et deux domaines SH3 dont celui en C-terminal interagit avec le domaine PRR de la p47^{PHOX}.

c) La p40^{PHOX}

La p40^{PHOX} (ou sous unité adaptatrice de la NADPH oxydase phagocytaire) est une protéine nonglycosylée de 40 kDa, elle est composée d'un domaine PX, un domaine SH3 et un domaine PB1 (**Fig. 9**) (Kawahara et Lambeth, 2007). Le domaine PX lie le

phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P) et contribue à l'assemblage de l'oxydase à la membrane du phagosome (Ellson *et al.*, 2001; Kanai *et al.*, 2001). Le domaine PB1 est responsable de l'association de la p40^{PHOX} à la p67^{PHOX} (interaction PB1-PB1) et facilite de ce fait la localisation membranaire de la p67^{PHOX} (Honbou *et al.*, 2007). La p40^{PHOX} est absente dans les patients CGD déficients pour la p67^{PHOX} (Tsunawaki *et al.*, 1994) suggérant que cette protéine est uniquement stable après sa liaison à la p67^{PHOX} (Bedard *et al.*, 2007).

Il a été proposé que la p40^{PHOX} joue un rôle dans la stabilisation du complexe cytosolique p47^{PHOX}-p67^{PHOX}-p40^{PHOX} avec lequel elle co-transloque durant l'activation du neutrophile (Wientjes *et al.*, 1993). La p40^{PHOX} est également impliquée dans la régulation de NOX2. A part l'étude de Sathyamoorthy *et al.* (1997) qui lui attribue une fonction inhibitrice de NOX2, la plupart des travaux suggèrent l'implication de la p40^{PHOX} dans l'activation de l'oxydase. Bien qu'elle soit dispensable à l'activation de l'oxydase phagocytaire *in vitro* (Honbou *et al.*, 2007), la p40^{PHOX} contribue à l'activation de la NADPH oxydase en facilitant la localisation membranaire de la p67^{PHOX} (et de sa protéine associée p47^{PHOX}) (Kuribayashi *et al.*, 2002), en augmentant l'affinité de la p47^{PHOX} au flavocytochrome b (Cross, 2000) et en stimulant la production du O₂⁻ via un signal PI3P qui augmente après internalisation du phagosome (Tian *et al.*, 2008).

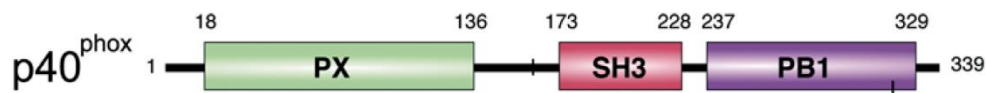


Figure 9. Structure de la p40^{PHOX} (Groemping et Rittinger, 2005).

d) La petite protéine G Rac2

La petite protéine G Rac (21 kDa) est un membre de la superfamille Ras-GTPases indispensable à l'activation de la NADPH oxydase (Pick, 2014). Les protéines Rac sont clairement impliquées dans la régulation de NOX2, toutefois, elles ne sont pas des sous unités de la NADPH oxydase dans le sens propre du terme puisqu'elles régulent d'autres fonctions cellulaires, en particulier le cytosquelette (Bedard *et al.*, 2007). Il existe deux isoformes de Rac dans les cellules phagocytaires : Rac1 et Rac2. Les deux isoformes comptent 192 acides aminés et présentent 92% d'homologie de séquence (Kwong *et al.*, 1993). Les neutrophiles humains expriment majoritairement l'isoforme Rac2 (>96%) qui se trouve associée à son inhibiteur Rho-GDI dans le cytosol dans les cellules au repos (Bokoch *et al.*, 1994; Heyworth *et al.*, 1994). L'activation du neutrophile entraîne la dissociation de Rac2 de son inhibiteur et sa translocation à la membrane (Abo *et al.*, 1994), simultanément avec la translocation de p47^{PHOX}/p67^{PHOX} et

l'activation de l'oxydase (Quinn *et al.*, 1993). Rac transloque indépendamment des autres composants cytosoliques de la NADPH oxydase (Heyworth *et al.*, 1994), mais son activation peut induire l'assemblage du complexe enzymatique (Price *et al.*, 2002), probablement par un mécanisme indirect impliquant l'activation de la p21-activated kinase (PAK) qui entraîne la phosphorylation de la p47^{PHOX} (Knaus *et al.*, 1995; Quinn et Gauss, 2004).

Rac est absolument requise à l'activité de la NADPH oxydase (Bokoch, 1994 ; Babior, 1999); elle interagit avec la p67^{PHOX} pour l'accomplissement du transfert d'électrons au flavocytochrome b558. Rac exerce également un effet régulateur direct sur le flavocytochrome b558 en interagissant avec cette protéine via son domaine d'insertion (**Fig. 10**) (Diebold et Bokoch, 2001).

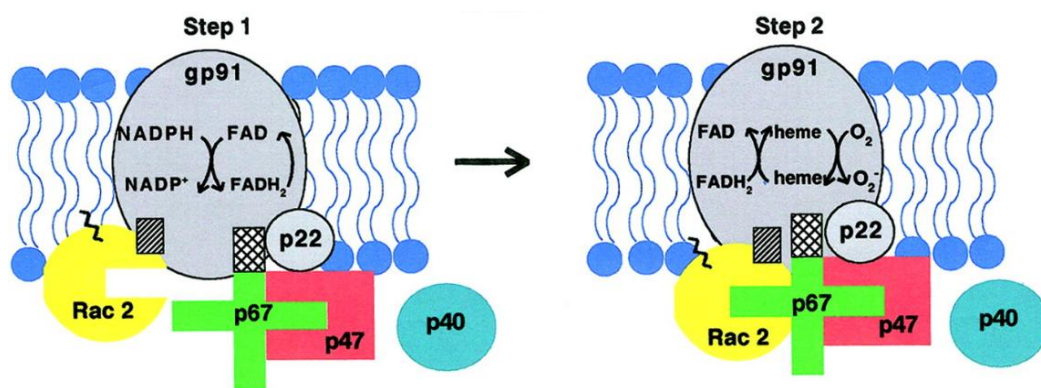


Figure 10. Modèle de régulation de l'activité du flavocytochrome b558 en deux étapes par Rac2 (Bokoch et Diebold, 2002).

Dans l'étape 1, Rac2 migre à la membrane et interagit avec le cytochrome b558 par l'intermédiaire de son domaine d'insertion (rectangle hachuré), elle contribue à l'activation du flux d'électrons du NADPH au FAD, sans interagir avec p67^{PHOX}. La p67^{PHOX} participe à la régulation de ce premier flux d'électrons via son domaine d'activation représenté par un rectangle quadrillé. Dans l'étape 2, Rac2 s'associe à la p67^{PHOX} et induit un changement de conformation de p67^{PHOX} qui permet la poursuite du flux d'électrons du FADH₂ à l'oxygène via les hèmes.

I.2.2. Activation de la NADPH oxydase

La NADPH oxydase existe dans trois états d'activation différents ; repos, primé et activé. Le contrôle strict de l'activation de ce complexe prévient la surproduction du superoxyde et assure, avec les systèmes antioxydants abondants, la protection des structures cellulaires contre les lésions oxydatives (El-Benna *et al.*, 2008).

I.2.2.1. La NADPH oxydase des neutrophiles au repos

Dans les neutrophiles au repos, les composants de la NADPH oxydase sont distribués entre le cytosol et la membrane permettant de la maintenir dans un état inactif. La membrane plasmique de ces cellules contient très peu de flavocytochrome b558, qui est concentrée dans la membrane des granules spécifiques (Borregaard et Tauber, 1984; El-Benna *et al.*, 2008). Les

sous unités cytosoliques existent sous forme d'un complexe trimoléculaire $p40^{PHOX}$ - $p47^{PHOX}$ - $p67^{PHOX}$ où la $p67^{PHOX}$ joue un rôle de « pont » entre la $p47^{PHOX}$ et la $p40^{PHOX}$ (**Fig. 11**) (Sheppard *et al.*, 2005) ; elle interagit avec le domaine PRR de la $p47^{PHOX}$ par son domaine SH3-B, et avec le domaine PB1 de la $p40^{PHOX}$ via son domaine PB1 (Groemping et Rittinger, 2005).

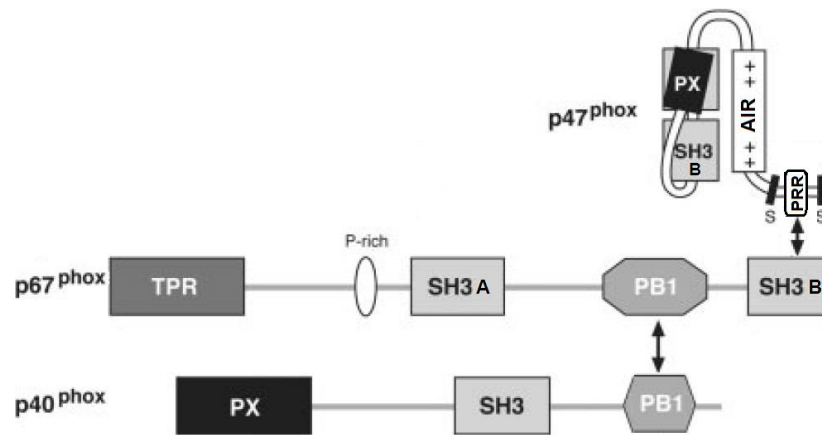


Figure 11. Modèle du complexe $p40^{PHOX}$ - $p47^{PHOX}$ - $p67^{PHOX}$ dans le neutrophile au repos (Modifié de Lapouge *et al.* (2002)).

La $p47^{PHOX}$ du neutrophile au repos n'est pas phosphorylée et adopte une conformation autoinhibée repliée sur elle-même (**Fig.11**) (Yuzawa *et al.*, 2004 ; Marcoux *et al.*, 2010). Cette conformation est maintenue par des interactions intermoléculaires entre les domaines SH3, PX et AIR. La région AIR masque les domaines SH3 (SH3A et SH3B), empêchant de ce fait leur interaction avec le domaine PRR de la $p22^{PHOX}$. La queue C-terminale de la $p47^{PHOX}$ joue un rôle clé dans l'interaction AIR-SH3 et le maintien d'une conformation repliée au repos (Meijles *et al.*, 2014). L'interaction intramoléculaire SH3A-PX prévient la liaison de ce dernier avec les phosphatidylinositol membranaires et inhibe la translocation des composants cytosoliques de la NADPH oxydase à la membrane (Marcoux *et al.*, 2010). Rac2 est aussi localisée dans le cytosol où se trouve liée à son inhibiteur Rho-GDI (Kwong *et al.*, 1993).

I.2.2.2. Priming de la NADPH oxydase

Le priming (ou pré-activation) de la NADPH oxydase est opérationnellement défini comme l'augmentation de la génération du $O_2^{\bullet -}$ en réponse à un second stimulus activateur (Sheppard *et al.*, 2005). Le priming de la NADPH oxydase peut être induit par différents agents incluant des cytokines pro-inflammatoires (comme le $TNF-\alpha$, le GM-SCF et l'IL-8) (Downey *et al.*, 1995; Hallett et Lloyds, 1995) et certains agonistes des TLRs (comme les lipopolysaccharides ou LPS) (Forehand *et al.*, 1989 ; El-Benna *et al.*, 2008). Des activateurs puissants de la NADPH oxydase comme le fMLF et le C5a peuvent exercer un effet primant à

faible concentration (El-Benna *et al.*, 2008). L'adhésion du neutrophile à l'endothélium vasculaire et à la matrice extracellulaire durant sa migration peut primer la NADPH oxydase (Sareila *et al.*, 2011). Les agents primants comme le TNF ou le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) induisent l'activation de la PLD (Bourgoin *et al.*, 1990), le priming de la phospholipase A2 (PLA2) (Bauldry *et al.*, 1991) ou l'activation de la voie PI3K (Phosphoinositide 3 kinases) (Cadwallader *et al.*, 2002).

Le priming de la NADPH oxydase phagocytaire est caractérisé par des changements de la localisation subcellulaire ou de la conformation des gp91^{PHOX}/p22^{PHOX} et p47^{PHOX}. Durant le priming, la p47^{PHOX} est partiellement phosphorylée avec une relaxation de sa conformation d'auto-inhibition. La phosphorylation de la p47^{PHOX} sur la sérine 345 est un événement crucial du priming de la production des FRO par les neutrophiles (El-Benna *et al.*, 2008). La Ser345 est localisée dans une séquence (-PXSP-) reconnue et phosphorylée par les MAPKinases (mitogen activated protein kinases). En effet, les MAPKinases ERK1/2 (extracellular-regulated kinase 1/2) phosphorylent la p47^{PHOX} sur la Ser345 dans les PMN traités par le GM-CSF, alors que cette même sérine est phosphorylée par les p38 MAPKinases lorsque les PMN sont traités par le TNF- α (Dang *et al.*, 2006). La Ser345 phosphorylée de la p47^{PHOX} dans le neutrophile traité par le TNF- α constitue un site de liaison pour Pin1, une *cis-trans* prolyl isomérase, qui induit des changements conformationnels de la p47^{PHOX} facilitant sa phosphorylation ultérieure par la PKC (Boussetta *et al.*, 2010).

1.2.2.3. Activation de la NADPH oxydase

L'activation de la NADPH oxydase phagocytaire requiert la translocation des composants cytosoliques p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p40^{PHOX} et Rac à la membrane plasmique ou phagolysosomale et l'assemblage de l'oxydase active. Ce processus nécessite l'activation de Rac et la phosphorylation des sous unités cytosoliques p47^{PHOX}, p67^{PHOX} et p40^{PHOX}, ainsi que de p22^{PHOX} et gp91^{PHOX} (Groemping et Rittinger, 2005; Raad *et al.*, 2009). Ces événements sont induits par divers stimuli via différentes voies de signalisation qui peuvent se recouper ou agir en synergie.

L'activation de la NADPH oxydase peut être induite par une multitude de facteurs solubles ou particuliers, tels que les bactéries opsonisées, le zymosan opsonisé (ZOP), les particules en latex, le fragment du complément C5a, les peptides formylés (fMLF), le LTB4, le PAF, le DAG, les calcium ionophores (inomycine) ainsi que les activateurs des PKCs comme les esters de phorpol tel que le PMA (El-Benna *et al.*, 2005 ; Belambri, 2014). Ces agents

stimulent l'explosion oxydative au sein du neutrophile en activant différentes voies de signalisation dépendantes ou non des récepteurs membranaires.

L'activation de la NADPH oxydase emprunte différentes voies de transduction du signal intracellulaire par intermédiaire des récepteurs à motif ITAM (ex. récepteurs Fc) qui reconnaissent les particules opsonisées (Chuang *et al.*, 2000), ou des récepteurs couplés à la protéine G en réponse aux agents chimioattractants comme le fMLF (Migeotte *et al.*, 2006). La stimulation des neutrophiles par le fMLF (**Fig. 12**) conduit à l'activation des protéines G hétérotrimériques ($G\alpha\beta\gamma$) associées au récepteur à sept domaines membranaires. Il s'ensuit une activation de la phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$) qui réalise l'hydrolyse du $PI(4,5)P_2$ en DAG et IP_3 . L' IP_3 induit la libération du calcium intracellulaire alors que le DAG active les isoformes de PKC (Migeotte *et al.*, 2006). Le DAG produit par la $PLC\beta$ peut être converti en acide phosphatidique par une diacylglycérol kinase (Ishitoya *et al.*, 1987) ou par la PLD activée par les MAPK (Pai *et al.*, 1988 ; Djerdjouri *et al.*, 1999). L'acide phosphatidique stimule la $PKC\zeta$ (Erickson *et al.*, 1999), capable de phosphoryler la $p47^{PHOX}$ dans des cellules stimulées par le fMLF (Dang *et al.*, 2001).

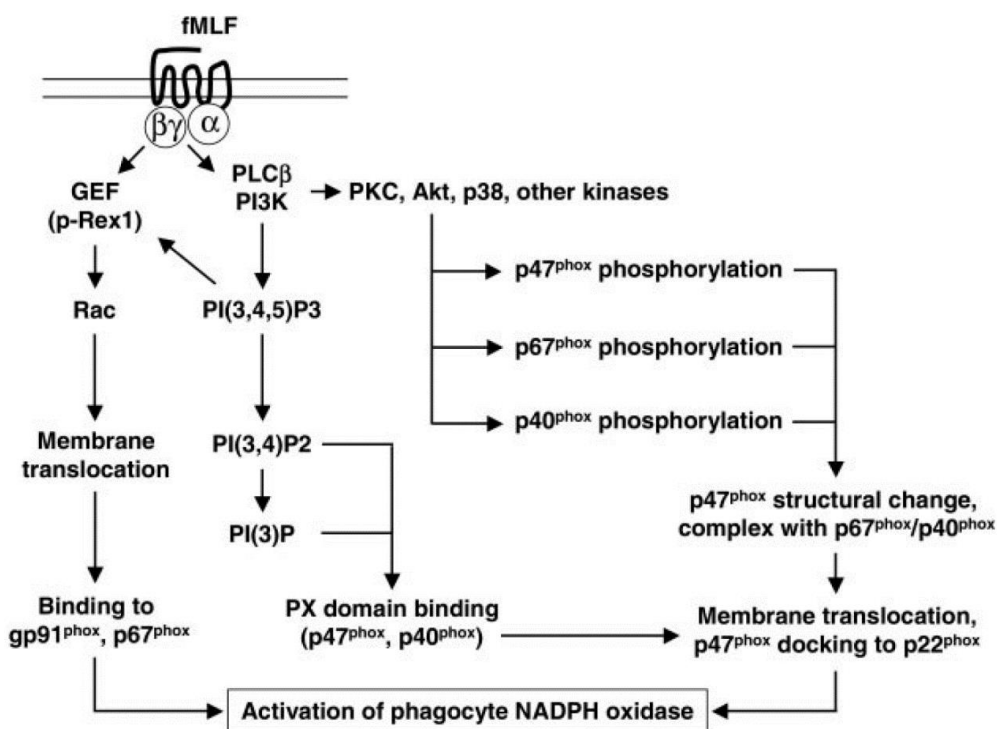


Figure 12. Evènements majeurs de signalisation induits par le fMLF conduisant à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire (Ye *et al.*, 2009).

Ce schéma simplifié représente les voies de signalisation majeures activées dans le neutrophile en réponse au fMLF. Suite à l'activation des protéines $G\alpha\beta\gamma$, la libération des sous unités $G\beta\gamma$ induit l'activation de la $PI3K$ résultant en la production du PIP_3 et de ses produits de dégradation. Le GEF (GDP/GTP exchange factor) alors activé par le PIP_3 catalyse la conversion de Rac-GDP en Rac-GTP qui transloque à la membrane pour s'associer à la $gp91^{PHOX}$. Les protéines $G\beta\gamma$ sont également responsables de l'activation de la $PLC\beta_2$ dont les produits (DAG et IP_3) stimulent l'activation des PKCs. Différentes kinases, incluant les isoformes de PKC ($PKC\delta$, $PKC\zeta$, $PKC\beta_{II}$, et $PKC\alpha$), les MAPK (p38 et ERK1/2) et Akt, sont capables de catalyser la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$ dans le neutrophile stimulé par le fMLF, et induire de ce fait la translocation des facteurs cytosoliques à la membrane. L'association à la membrane est également facilitée par le domaine PX de la $p47^{PHOX}$.

Les protéines kinase C jouent un rôle particulièrement important dans la cascade d'activation de la NADPH oxydase. Comme mentionné plus loin dans ce chapitre, les neutrophiles humains expriment cinq isoformes de PKC : trois isoformes conventionnelles (cPKC) α , β I et β II, qui requièrent le Ca^{2+} , le DAG et la phosphatidylsérine (PS) pour leur activation ; une nouvelle isoforme (nPKC) δ , qui requiert la PS et le DAG mais est Ca^{2+} -indépendante ; et une isoforme atypique (aPKC) ζ , insensibles au calcium et au DAG, mais activée par la PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) et le PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) (Bertram et Ley, 2011). L'activation des PKCs dans les neutrophiles est également accompagnée de leur translocation à la membrane au niveau de la NADPH oxydase (Dang *et al.*, 1995; Sergeant et McPhail, 1997). Les PKCs participent aussi bien à la transduction du signal d'activation qu'à la phosphorylation finale des facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase. Elles stimulent les ERK1/2 et p38 MAPKinases, comme elles phosphorylent les composants p22^{PHOX} , p40^{PHOX} , p47^{PHOX} et p67^{PHOX} de la NADPH oxydase (Voir section I.2.2.4).

L'activation des protéines $\text{G}\beta\gamma$ induit en outre l'activation de la voie des PI3K, en particulier la $\text{PI3K}\gamma$ qui participe à l'activation de la NADPH oxydase (Karlsson *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000) et à la phosphorylation de la p47^{PHOX} (Kodama *et al.*, 1999). Les PI3K phosphorylent le phosphoinositol (PI) pour produire le PI(3)P , PI(3,4)P_2 , et le PI(3,4,5)P_3 . Ces molécules peuvent réguler l'activité de l'oxydase en activant Rac (Welch *et al.*, 2003) ou en augmentant la liaison à la membrane de la p40^{PHOX} par son domaine PX (Ellson *et al.*, 2001). La PI3K, directement activée par la protéine G du récepteur FPR, peut activer des phospholipases et des kinases phosphatidylinositide-dépendantes, telles que la PLC, la PDK1, Akt, ERK1/2 et p38 MAPK (Rane *et al.*, 1997 ; Le Good *et al.*, 1998). La PDK1 phosphoryle et contribue à l'activation de Akt (Rane *et al.*, 2001), cette dernière joue un rôle important dans l'activité de la NADPH oxydase en contrôlant la phosphorylation et la translocation de la p47^{PHOX} (Chen *et al.*, 2010). ERK1/2 et p38 MAPK sont impliqués dans la phosphorylation de la p47^{PHOX} et de la p67^{PHOX} (Dewas *et al.*, 2000 ; Dang *et al.*, 2003) et l'activation de la NADPH oxydase (El Benna *et al.*, 1996a; El Benna *et al.*, 1996b; Krump *et al.*, 1997) dans le neutrophile stimulé par le fMLF.

Une autre voie d'activation de la NADPH oxydase est celle de l'acide arachidonique (AA) et d'autres acides gras insaturés. L'activation de la phospholipase A2 cytosolique via des récepteurs couplés à la protéine G permet la libération d'AA qui participe à la stimulation de l'activité de diverses molécules de signalisation impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase telles que les PKCs (McPhail *et al.*, 1984 ; Huang *et al.*, 1997 ; Hii et Ferrante, 2007).

Il agit également de façon synergique avec ces kinases en modifiant la conformation de la $p47^{PHOX}$ facilitant ainsi son interaction avec la $p22^{PHOX}$ (Shiose et Sumimoto, 2000).

I.2.2.4. Phosphorylations des composants de la NADPH oxydase phagocytaire

La phosphorylation est l'un des événements clés de l'activation de la NADPH oxydase, et la plupart des composants de l'oxydase (à part Rac) sont phosphorylés durant le processus d'activation.

a) Phosphorylation de la $p47^{PHOX}$

La $p47^{PHOX}$ est la plus intensément phosphorylée des sous unités de la NADPH oxydase, avec un total de 11 sites de phosphorylation (comprenant les résidus sérines 303, 304, 310, 315, 320, 328, 345, 348, 359, 370 et 379). Toutes ces sérines sont localisées en C-terminale du domaine SH3B (El Benna *et al.*, 1994; El Benna *et al.*, 1996a; El Benna *et al.*, 1996b; Inanami *et al.*, 1998 ; Dang *et al.*, 2001; Fontayne *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003;). En fonction du stimulus, une combinaison de différentes kinases peut contribuer à la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$. La PKC joue un rôle dominant avec ses isoformes ζ (Dang *et al.*, 2001), β (Dekker *et al.*, 2000; Korchak et Kilpatrick, 2001), et δ (Brown *et al.*, 2003; Bey *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007), mais aussi la PAK (p21- activated kinase) (Martyn *et al.*, 2005), les MAP kinases ERK1/2 et p38 (Dewas *et al.*, 2000 ; Dang *et al.*, 2006) et Akt (Chen *et al.*, 2003), contribuent à la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$ et réguleraient positivement l'activité de la NADPH oxydase. Alors que d'autres kinases, comme la PKA ou la caséine kinase 2 (CKII), auraient un effet régulateur négatif (Bengis-Garber et Gruener, 1996; Park *et al.*, 2001).

La $p47^{PHOX}$ du neutrophile au repos adopte une conformation d'auto-inhibition où la protéine est repliée sur elle-même grâce aux interactions intermoléculaires entre les domaines SH3, AIR et PX. La phosphorylation de la partie C-terminale de la $p47^{PHOX}$ libère le tandem SH3 et le domaine PX qui deviennent capables d'interagir avec la région PRR de la $p22^{PHOX}$ et les phosphatidylinositol membranaires respectivement (**Fig. 13**). La phosphorylation de seulement 3 sérines 303, 304 et 328, situées dans une séquence substrat de PKC (El Benna *et al.*, 1994), est requise pour induire ce changement conformationnel et initier l'assemblage de l'oxydase (Shiose et Sumimoto, 2000). Des études par mutagénèse dirigée et par activation de la NADPH oxydase dans un système acellulaire ont montré que la phosphorylation de ces trois sérines, localisées dans la région AIR, est particulièrement importante à l'activité de l'oxydase (El Benna *et al.*, 1994; El Benna *et al.*, 1996a; El Benna *et al.*, 1996b; Ago *et al.*, 1999; Fontayne *et al.*, 2002 ; Ago *et al.*, 2003). La Ser303 forme des liaisons hydrogène avec le résidu

Glu241, et la phosphorylation de cette sérine conduit donc à une répulsion de charges. De plus, les résidus arginine de la région polybasique proximale pourraient interagir avec les Ser303 et 304 phosphorylées les éloignant de ce fait du tandem SH3 et offrant un site vacant pour la fixation de la p22^{PHOX}. La Ser328 est engagée dans des interactions hydrogène avec la chaîne latérale de l'Arg267 du domaine SH3B, sa phosphorylation induit la rupture de ces liaisons et à l'ouverture de la structure repliée de la p47^{PHOX} (Groemping et Rittinger, 2005). Les sérines 345 et 348 localisées dans la séquence consensus des MAPK sont phosphorylées durant l'activation de l'oxydase (El Benna *et al.*, 1994). La Ser345 a été identifiée comme un site de priming de la NADPH oxydase, sa phosphorylation serait nécessaire au priming de l'explosion oxydative induite par le GM-CSF et le TNF α (Dang *et al.*, 2006).

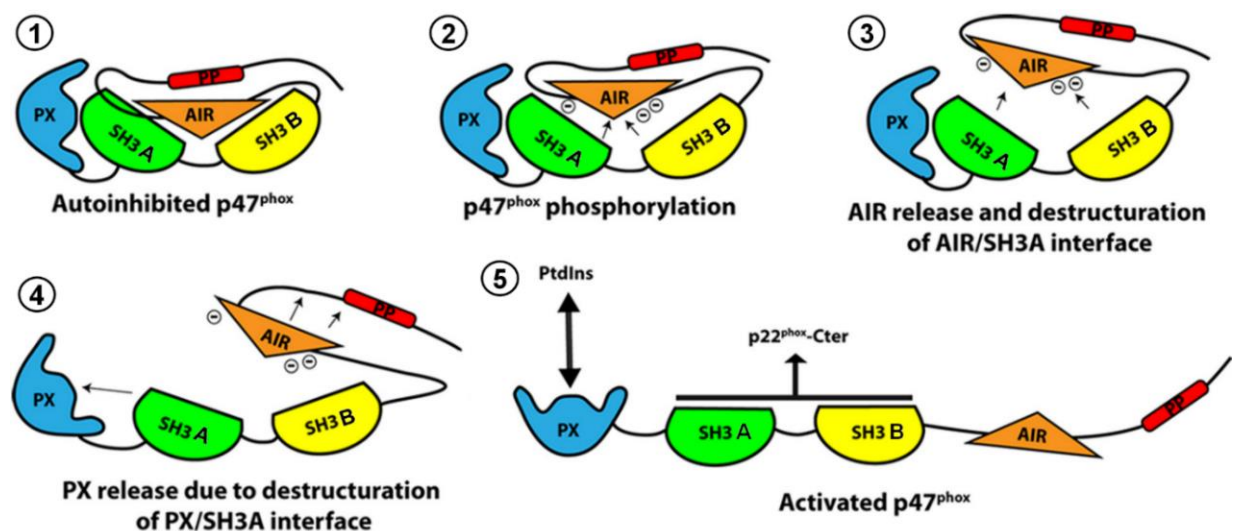


Figure 13. Mécanisme d'activation de la p47^{PHOX} (Marcoux *et al.*, 2010).

La p47^{PHOX} du neutrophile au repos adapte une conformation d'auto-inhibition où la protéine est repliée sur elle-même grâce aux interactions intermoléculaires entre les domaines SH3, AIR et PX (1). La phosphorylation de la région AIR (2) entraîne la déstabilisation des Interactions AIR-SH3-PX (3) le domaine PX est dès lors libéré (4) pour interagir avec les PtdIns membranaires (5). Les domaines SH3 maintenant accessibles interagissent à leur tour avec la p22^{PHOX}.

En plus de la phosphorylation des résidus sérines localisés dans la région polybasique de la p47^{PHOX}, trois autres sites de phosphorylations, incluant les sérines 359, 370 et 379 localisées dans le site d'interaction avec la p67^{PHOX}, ont été identifiés. La substitution des sérines 359 et 370 en alanine réduit gravement la phosphorylation des autres résidus sérine, altère la translocation des composants cytosoliques de la NADPH oxydase à la membrane et réduit sévèrement la production du superoxyde (Johnson *et al.*, 1998). Les Ser359 et Ser370 font partie l'interface d'interaction avec la p67^{PHOX} loin de la région d'auto-inhibition, et plutôt qu'intervenir dans l'initiation de l'activation de l'oxydase, elles participeraient dans la régulation de l'interaction avec la p67^{PHOX} (Groemping et Rittinger, 2005). La mutation

individuelle de chaque sérine de la région C-terminale de la $p47^{PHOX}$ a montré que seule la mutation de la Ser379 en alanine entraîne la perte totale de l'activité de la NADPH oxydase (Faust *et al.*, 1995). Meijles *et al.* (2014) ont récemment démontré que la phosphorylation de la Ser379 est un switch moléculaire qui initie les changements conformationnels de la $p47^{PHOX}$ et la production du superoxyde par la NADPH oxydase. Dans les cellules au repos, la Ser379 forme des liaisons hydrogène avec la Ser215 (localisée dans la charnière qui sépare les deux domaines SH3) et la Ser315 localisée au cœur de la région AIR. Ces liaisons hydrogène connectent le tandem SH3 et la région AIR ensembles et stabilisent la conformation auto-inhibitrice de la $p47^{PHOX}$. Quand la Ser379 est phosphorylée, les liaisons hydrogènes sont immédiatement rompues par les charges négatives générées et la queue C-terminale est disloquée. Ceci expose partiellement le tandem SH3 et libère la région AIR qui devient maintenant accessible à la phosphorylation (Meijles *et al.*, 2014).

b) Phosphorylation de la $p67^{PHOX}$

La $p67^{PHOX}$ est phosphorylée durant l'activation du neutrophile par différents agonistes comme le PMA, le fMLF et le zymosan opsonisé (Dusi et Rossi, 1993; El Benna *et al.*, 1997; Forbes *et al.*, 1999). Forbes *et al.* (1999) ont identifié la Thr223, située dans la région PRR, comme le site majeur de phosphorylation. L'équipe d'El-Benna a montré plus tard l'existence d'autres sites de la $p67^{PHOX}$ phosphorylés chez les neutrophiles quiescents ou stimulés par le fMLF ou le PMA. La signalisation responsable de cette phosphorylation emprunterait des voies PKC-dépendante, ainsi que des voies PKC-indépendantes impliquant ERK2 et p38 MAPK (Dang *et al.*, 2003). La même équipe a montré que la $p67^{PHOX}$ est constitutivement phosphorylée dans le neutrophile au repos ; elle entreprend des cycles répétés de phosphorylation et de déphosphorylation contrôlés par les tyrosine kinases et MEK1/2 (Mitogen extracellular kinase 1/2) ainsi que les phosphatases de type 1 et 2A (PP1/2A) qui pourraient ainsi jouer un rôle dans la régulation de la production des FRO par les neutrophiles au niveau du site inflammatoire (Dang *et al.*, 2011).

c) Phosphorylation de la $p40^{PHOX}$

Comme pour les autres composants cytosoliques de la NADPH oxydase, la $p40^{PHOX}$ est phosphorylée durant l'activation de l'oxydase (Fuchs *et al.*, 1997; Bouin *et al.*, 1998; Someya *et al.*, 1999). Bouin *et al.* (1998) ont identifié sur la $p40^{PHOX}$ deux sites de phosphorylation dépendante de la PKC ; la Thr154 (située tout près du domaine SH3 central) et la Ser315 (localisée dans la partie C-terminale du domaine PB1). Ces phosphorylations pourraient inhiber l'interaction intramoléculaire du domaine PX (résidus 24-143) avec le domaine PB1 (résidus

237-329) qui prévient la liaison de la $p40^{PHOX}$ au PI(3)P dans la membrane du phagosome (Ueyama *et al.*, 2007). Plus récemment, Chessa *et al.* (2010) ont montré que seule la phosphorylation de la Thr154 était requise à l'activation de l'oxydase en réponse à différents stimuli physiologiques, et que cette phosphorylation effectuée par la PKC δ était nécessaire à la translocation de la $p47^{PHOX}$ vers le phagosome.

d) Phosphorylation de la $p22^{PHOX}$

La $p22^{PHOX}$ peut être phosphorylée *in vitro* sur un résidu thréonine par une kinase activée par l'acide phosphatidique (PAAK ou phosphatidic acid activated kinase) et les isoformes conventionnelles de PKC α et β (Regier *et al.*, 1999). Dans les neutrophiles intacts, différents agonistes (PMA, zymosan opsonisé et fMLF) induisent la phosphorylation de la $p22^{PHOX}$. Cette phosphorylation est corrélée à l'activité de la NADPH oxydase et implique des mécanismes dépendants et indépendants de la PLD (Regier *et al.*, 2000). Une étude par mutagenèse dirigée dans des cellules CHO (Chinese hamster ovarian cells) a révélé que la mutation de la Thr147 en alanine inhibe à 70% la production du superoxyde *in vivo*, bloque la phosphorylation de la $p22^{PHOX}$ *in vitro* par les deux isoformes α et δ de la PKC, et prévient l'interaction $p22^{PHOX}$ - $p47^{PHOX}$ dans les cellules intactes. L'activité de la NADPH oxydase et l'interaction $p22^{PHOX}$ - $p47^{PHOX}$ dans la membrane ont été rétablies en introduisant un résidu aspartyl à la place de la Thr147 pour mimer sa phosphorylation *in vivo* (Lewis *et al.*, 2010).

e) Phosphorylation de la $gp91^{PHOX}$

L'équipe d'El Benna a présenté en 2009 la première preuve de la phosphorylation de la $gp91^{PHOX}$ dans le neutrophile humain stimulé par le fMLF, le PMA et le zymosan opsonisé. Cette phosphorylation est PKC-dépendante et se produit dans la région cytosolique C-terminale de la $gp91^{PHOX}$ au niveau des séquences 321-405 et 466-570. Ces séquences contiennent trois sites potentiels de phosphorylation par la PKC : Thr309, Ser333 et Ser550. Les deux premiers sites se situent à proximité du domaine de liaison du FAD tandis que le dernier se situe au niveau du site de liaison du NADPH. La phosphorylation de ces résidus augmente l'activité diaphorase du domaine cytosolique de la flavoprotéine $gp91^{PHOX}$ et améliore l'interaction aux protéines cytosoliques Rac2, $p47^{PHOX}$ et $p67^{PHOX}$. La phosphorylation de la $gp91^{PHOX}$ régulerait donc l'activité catalytique et l'assemblage de la NADPH oxydase phagocytaire (Raad *et al.*, 2009).

I.2.2.5. Assemblage du complexe NADPH oxydase

L'activation de la NADPH oxydase se produit à travers une série complexe d'interactions protéine/protéine (**Fig. 14**). Dans les membranes des neutrophiles au repos, la gp91^{PHOX} est associée à la p22^{PHOX} qui contribue à sa maturation et sa stabilisation (Parkos *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1997). L'hétérotrimère p40^{PHOX}-p67^{PHOX}-p47^{PHOX} et la protéine Rac sont maintenues dans le cytosol via des interactions intramoléculaires inhibitrices, et la protéine inhibitrice RhoGDI respectivement. Au cours de l'activation du neutrophile, les interactions intramoléculaires sont levées par des événements de phosphorylation qui entraînent des changements conformationnels permettant aux composants cytosoliques de transloquer vers le complexe gp91^{PHOX}/p22^{PHOX}. La phosphorylation de la p47^{PHOX} expose le tandem SH3, qui interagit alors avec le domaine PRR C-terminal de la p22^{PHOX} (Marcoux *et al.*, 2010). Le rôle de cette interaction serait de ramener la p47^{PHOX} et la p67^{PHOX} à proximité de la gp91^{PHOX} et l'établissement d'un contact p67^{PHOX}-gp91^{PHOX}-p47^{PHOX} (Dahan et Pick, 2012). L'accès de ces deux facteurs cytosoliques à la gp91^{PHOX} est important à l'activité de l'oxydase puisque la p67^{PHOX} et la p47^{PHOX} sont requises au transfert d'électrons du NADPH au centre flavine, et du centre flavine à l'hème respectivement (Cross et Curnutte, 1995). Le contact p47^{PHOX}-gp91^{PHOX} et p67^{PHOX}-gp91^{PHOX} est davantage amélioré par la phosphorylation de la gp91^{PHOX} avec une augmentation de l'activité diaphorase du complexe (Raad *et al.*, 2009).

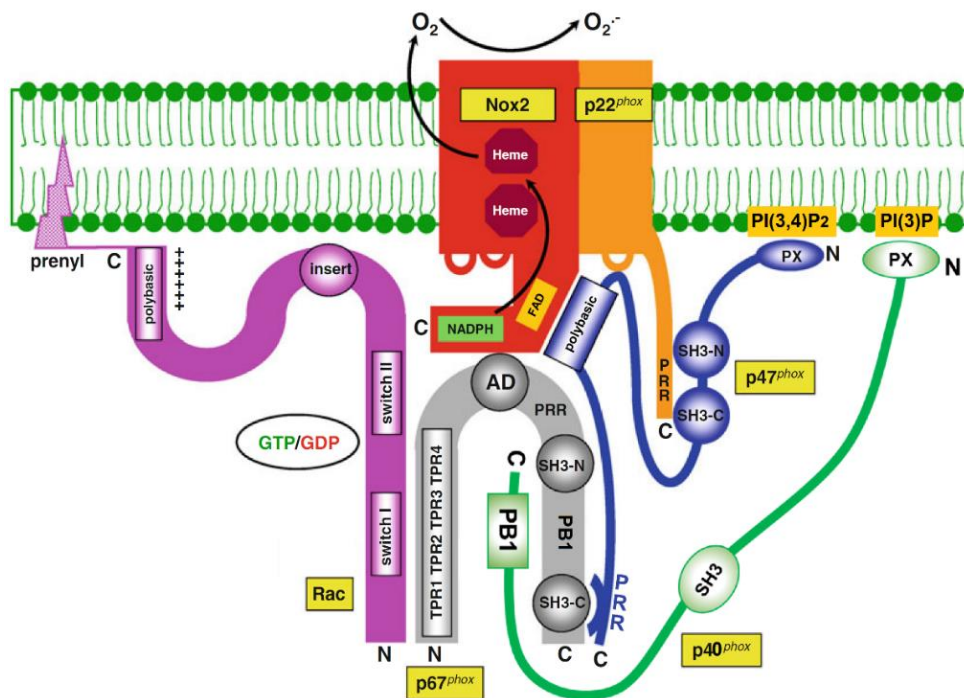


Figure 14. Représentation de l'assemblage de la NADPH oxydase phagocytaire (modifié de Dahan et Pick, 2012)

AD: activation domain; SH3: src homology 3; TPR: tetratricopeptide repeat; PB1: Phox and Bem1; PRR: proline-rich region; PX: phox homology.

Une étape cruciale dans l'assemblage de l'oxydase est l'interaction entre la $p67^{PHOX}$ et la forme active de Rac (Rac-GTP) via leurs domaines respectifs TPR et Switch 1, après que ces deux protéines aient transloqué indépendamment à la membrane. La $p67^{PHOX}$ est dépourvue d'un signal d'attachement à la membrane, elle requiert l'assistance de la $p47^{PHOX}$, mais aussi de Rac, pour rentrer en contact avec la $gp91^{PHOX}$. Toutefois, seule Rac est capable d'induire des changements conformationnels qui activent la $p67^{PHOX}$ (Sarfstien *et al.*, 2004). Rac s'accroche à la membrane par une interaction entre sa queue C-terminale isoprénylée et les phospholipides anioniques de la face cytosolique de la membrane. La présence d'une région polybasique en C-terminale de Rac, et les forces hydrophobes, représentés par le groupe geranylgeranyl attaché à une cystéine, augmentent l'affinité de la queue cytosolique de Rac à la membrane (Dahan et Pick, 2012). Une autre catégorie de contacts assurant l'assemblage de l'oxydase implique les domaines PX en N-terminal des $p47^{PHOX}$ et $p40^{PHOX}$. Libérés par phosphorylation, ces domaines interagissent avec les phosphoinositides membranaires (PI(3,4)P2 et PI(3)P pour la $p47^{PHOX}$ et la $p40^{PHOX}$ respectivement) dont les concentrations augmentent dans les phagocytes stimulés (Dahan et Pick, 2012). Le domaine PX de la $p47^{PHOX}$ assure un rôle crucial dans l'assemblage de la NADPH oxydase au niveau de la membrane (Ago *et al.*, 2003).

I.2.3. Les pathologies inflammatoires associées au dérèglement de NOX2

L'hyperproduction des FRO par les neutrophiles est responsable d'une large étendue de maladies inflammatoires, parmi lesquels la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le syndrome de détresse respiratoire aigüe, le sepsis, les complications diabétiques, les maladies cardiovasculaires, les dommages tissulaires ischémiques et les maladies neurodégénératives (Babior, 2000; Lambeth, 2007 ; El-Benna *et al.*, 2010). Le liquide synovial des patients arthritiques contient un nombre considérable de neutrophiles. L'activité NOX2 de ces neutrophiles ainsi que la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$ sont largement augmentées (El Benna *et al.*, 2002 ; Dang *et al.*, 2006). Ainsi, les protéines oxydées par les FRO sont abondantes dans le liquide synovial des patients arthritiques (Chapman *et al.*, 1989). L'augmentation de la NETose dans les PMN des patients arthritiques en comparaison aux contrôles sains suggère un rôle des FRO dérivés de NOX2 dans cette pathologie par leur capacité de promouvoir la formation des NETs (Khandpur *et al.*, 2013). La NADPH oxydase phagocytaire constitue donc une cible thérapeutique importante et la modulation de son activité permettrait d'affaiblir la réponse excessive des neutrophiles associée aux pathologies inflammatoires.

I.3. La plante médicinale *Nigella sativa*

I.3.1. Propriétés et principaux constituants

Nigella sativa L., communément appelée « nigelle », est une plante médicinale originaire d'Asie, spécifiquement de la Syrie et de l'Iraq (Kacem, 2011), elle est largement cultivée dans les pays de la région méditerranéenne et dans l'Afrique sub-saharienne, ainsi qu'en Europe centrale, en Russie et en Amérique du Nord (Malhotra, 2012). Les graines noires de la nigelle, auxquelles elle doit son nom, sont depuis des milliers d'années utilisées comme épice et conservateur alimentaire, ainsi qu'en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies et maux comme l'asthme, la toux, la bronchite, les maux de tête, le rhumatisme, la fièvre et l'eczéma. Elles sont également utilisées comme diurétique, lactagogue et vermifuge (Chopra, 1956; Nadkarni, 1976 ; Burits et Bucar, 2000; Ramadan, 2007).

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en divers composés dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que des méthodes d'analyse. Elles contiennent plus de 30% d'huile fixe et environ 0,5% d'huile volatile. L'analyse qualitative par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) a permis l'identification de 67 constituants appartenant à différents groupes fonctionnels (Aboutabl *et al.*, 1986 ; Malhotra, 2012). Burits et Bucar (2000) ont analysé l'huile volatile de la nigelle par GC-MS et ont pu caractériser plusieurs composés dont la TQ est majoritaire (27,8% - 57,0%), suivie par la *p*-cymène, et le carvacrol. D'autres études plus récentes ont caractérisé la *p*-cymène comme étant le composé majoritaire de l'huile volatile (Ashraf *et al.*, 2006 ; Wajs *et al.*, 2008 ; Jrah Harzallah *et al.*, 2011). Aussi intéressant qu'il puisse paraître, une étude analysant toute la plante *N. sativa* a révélé que les cals des feuilles contiennent 12 fois plus de TQ que les extraits des graines (Alemi *et al.*, 2013). Les graines de *N. sativa* contiennent aussi des alcaloïdes (Attar-Rahman *et al.*, 1985; 1995), des flavonoïdes, des saponines, des phospholipides (Merfort *et al.*, 1997; Ramadan et Mörsel, 2002a) et des vitamines (Nergiz et Ötleş, 1993 ; Ramadan et Mörsel, 2002b).

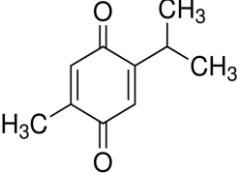
Les graines de *N. sativa* ont fait l'objet d'innombrables études qui lui ont attribué diverses propriétés pharmacologiques intéressantes (pour revue voir Gali-Muhtasib *et al.*, 2006a; Butt et Sultan, 2010; Malhotra, 2012 ; Majdalawieh et Fayyad, 2015; Amin et Hosseinzadeh, 2016). Un nombre considérable de ces travaux révèle que les activités observées soient dues aux quinones, principalement à la TQ, que l'on considère comme étant le composé actif majeur de la nigelle.

I.3.2. La thymoquinone

I.3.2.1. Structures et propriétés

La thymoquinone (TQ) est un monoterpène isolé pour la première fois à partir des graines de *N. sativa* en 1963 par El-Dakhakhny (1963) par biais de chromatographie en couches minces. Un nombre d'études ultérieures a signalé sa présence dans d'autres plantes comme *Eupatorium ayapana* (Trang *et al.*, 1993), *Calocedrus decurrens* (Manter *et al.*, 2007), *Satureja spicigera* (Gohari *et al.*, 2012), *Nepeta distans* Raul (Hussain *et al.*, 2010), *Thymus vulgaris* L. (Grosso *et al.*, 2010) et diverses populations d'*Origanum syriacum* L. (Lukas *et al.*, 2009). La TQ contient un noyau quinone attaché à des chaînes latérales isopropyl et méthyl en position 2 et 5 respectivement (**Tableau III**). La TQ existe en solution sous deux formes tautomériques différentes ; énol et céto. Cette dernière (~90%) est responsable des propriétés pharmacologiques de ce composé (Alkharfy *et al.*, 2011).

Tableau III. Structure et propriétés de la thymoquinone (Darakhshan *et al.*, 2015).

	Nom systématique/IUPAC	2-Isopropyl-5-méthyl-1,4-benzoquinone
	Formule moléculaire	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
	Masse molaire	164,20 g.mol ⁻¹
	Aspect	Jaune/Cristallin
	Nombre CAS	490-91-5
	PubChem CID	10281

La TQ réagit avec les groupements amino ou thio des acides aminés (Cremer *et al.*, 1987), et peut aussi subir une série de réactions enzymatiques d'oxydoréduction résultant en la formation de la thymohydroquinone (THQ). Différentes enzymes cellulaires (NADPH Cyt P450 réductase et NADH Cyt-b5 réductase microsomales, NADH ubiquinone oxydoréductase mitochondriale) catalysent la réduction monoélectronique de la TQ en semiquinone et subséquemment en THQ (**Fig. 15**). Alternativement, la TQ peut être directement convertie en THQ par la NADPH quinone oxydoréductase. La TQ peut également subir une réduction non enzymatique par le glutathion pour former le glutathionyl-dihydrothymoquinone (Khalife et Lupidi, 2007) (**Fig. 15**). Les produits de la réduction de la TQ sont connus pour leurs propriétés antioxydantes qui dépassent largement celles de la TQ (Tesarova *et al.*, 2011 ; Khalife et Lupidi, 2007 ; 2008).

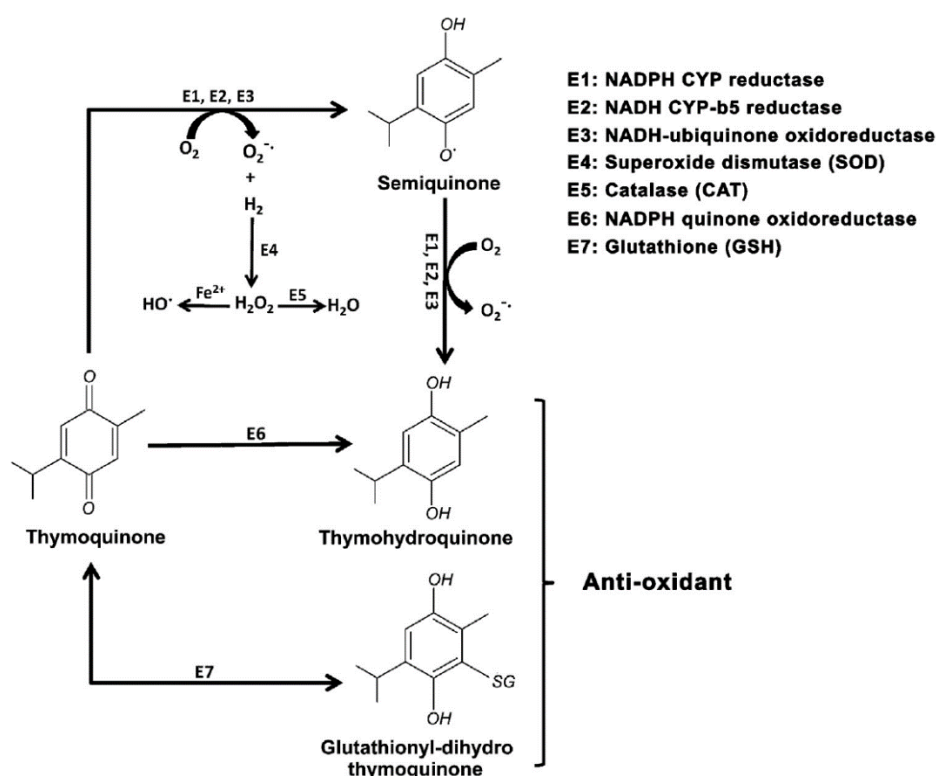


Figure 15. Réactions d'oxydoréduction de la thymoquinone (Darakhshan *et al.*, 2015).

Quoique la TQ exerce des effets antioxydants à faible dose, un nombre de rapports affirment ses propriétés pro-oxydantes à forte dose, en particulier dans l'environnement tumorale (Zubair *et al.*, 2013 ; El-Najjar *et al.*, 2010) où elle induit la production des FRO et la réduction des taux de GSH (Schneider-Stock *et al.*, 2014). Dans l'environnement tumorale, caractérisé par l'absence des enzymes antioxydantes SOD et catalase, le superoxyde généré de la conversion $TQ \rightarrow \text{semiquinone} \rightarrow THQ$ n'est pas proprement détoxifié. L'accumulation du superoxyde et de ses dérivés contribue ainsi aux effets pro-oxydants de la TQ (Darakhshan *et al.*, 2015).

I.3.2.2. Activités biologiques de la thymoquinone

Depuis son isolement dans les années soixante, la TQ a fait l'objet de nombreuses études pour ses activités biologiques multiples. Dans ce qui suit sont décrites les plus éminentes :

a) *Activité antioxydante*

En utilisant des systèmes chimiques, Mansour *et al.* (2002) ont rapporté que la TQ peut agir comme un puissant piègeur du $O_2^{\cdot-}$ et d'autres radicaux libres générés photochimiquement. De leur côté, Badary *et al.* (2003) ont montré que la TQ exerce un effet scavenger du $O_2^{\cdot-}$ et inhibiteur de la peroxydation lipidique supérieur à celui obtenu avec le tert-butylhydroquinone (TBHQ), tandis que son pouvoir scavenger des radicaux DPPH et $OH^{\cdot}$ est faible. Les capacités

antioxydantes de la TQ *in vitro* sont controversées. En effet, Staniek et Gille (2010) attestent que la TQ est un très faible antioxydant, contrairement à sa forme réduite, la thymohydroquinone, qui exerce un pouvoir scavenger puissant, comparable au pentamethyl-chromanol, un analogon de tocophérols. Ils suggèrent que les propriétés antioxydantes de la TQ dans la cellule soient favorisées par la chaîne respiratoire mitochondriale qui la convertit en hydroquinone.

Des études *in vivo* révèlent que la TQ renforce le statut antioxydant en induisant l'expression et/ou l'activité de la glutathion S transférase (GST) (Badary et Gamal El-Din, 2001; Kanter *et al.*, 2005 ; Elbarbry *et al.*, 2012), la glutathion peroxydase (GPX) (Elbarbry *et al.*, 2012), la SOD (Mansour *et al.*, 2002 ; Badary *et al.*, 2003; Kanter *et al.*, 2005) et la glutathion réductase (Elbarbry *et al.*, 2012). Elle active l'expression des gènes codant la GST, la GPX et la catalase permettant de surmonter le stress oxydant induit dans un modèle d'hypercholestérolémie chez le rat (Ismail *et al.*, 2010). De même, Sankaranarayanan et Pari (2011) ont rapporté que les niveaux de différentes enzymes antioxydantes (GPX, GST, catalase) et du glutathion, réduits dans le foie et le rein dans un modèle de diabète induit par la streptozotocine chez le rat, sont restaurés par la TQ. En outre, Mohamed *et al.* (2003) ont montré que la TQ améliore l'encéphalomyélite expérimentale chez le rat par augmentation du niveau du glutathion et suggèrent son rôle dans le traitement de la sclérose en plaques. Grâce à ses propriétés antioxydantes, la TQ est capable de protéger différents organes contre les lésions oxydatives induites par une variété de substances et médicaments générateurs de radicaux libres (pour revue voir Darakhshan *et al.*, 2015).

b) Activité antiinflammatoire et immunomodulatrice

Dans leur étude datant d'une vingtaine d'années, Houghton *et al.* (1995) ont démontré que la TQ exerce un effet anti-inflammatoire en inhibant la génération des eicosanoïdes (thromboxane B2 et leucotriène B4) par les leucocytes du rat stimulés par le calcium ionophore A23187. Quelques années plus tard, El-Dakhakhny *et al.* (2002) et Mansour et Tornhamre (2004) viennent confirmer ces observations en montrant que la TQ inhibe fortement la formation, induite par le A23178, des produits de la 5-lipoxygénase par les PMN murins et humains respectivement. Par suite de sa capacité d'inhiber l'expression de la 5-lipoxygénase et la biosynthèse des leucotriènes, la TQ est en mesure d'atténuer l'inflammation dans un modèle d'asthme allergique chez la souris (El Gazzar *et al.*, 2006b). Par ailleurs, elle réduit l'inflammation allergique en inhibant l'expression de la cyclooxygénase 2 (COX-2) et la production de la prostaglandine D2 (PGD2) et des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13),

ainsi que l'accumulation des éosinophiles dans les voies respiratoires (El Gazzar *et al.*, 2006a; El Mezayen *et al.*, 2006). Ammar *et al.* (2011) ont par la suite montré qu'en plus de l'inhibition de l'accumulation des cellules inflammatoires dans le lavage broncho-alvéolaire et les tissus pulmonaires des souris asthmatiques, la TQ réduit significativement les taux d'IgE ainsi que l'expression du TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) et de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS).

L'efficacité de la TQ a été observée dans d'autres pathologies inflammatoires, notamment l'arthrite rhumatoïde (AR). La TQ est capable de contrôler le score arthritique et les niveaux d'IL-1 β et de TNF α dans l'arthrite induite par adjuvant chez le rat (Tekeoglu *et al.*, 2007). En utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* d'AR, Vaillancourt *et al.* (2011) ont montré que la TQ atténue significativement les facteurs cataboliques connus pour leur implication dans la pathologie de la maladie. En effet, la TQ réprime la production de l'IL-1 β , du TNF α , de COX-2 et de la métalloprotéinase-13 dans les synoviocytes fibroblaste-like humains isolés de patients arthritiques, et réduit les taux sériques d'IL-1 β , du TNF α et de la prostaglandine E2 (PGE2) dans les rats arthritiques. De même, Umar *et al.* (2012) ont rapporté que la TQ réduit significativement les signes cliniques de l'arthrite induite par le collagène chez le rat en réduisant le taux de la PGE2, de l'IFN- γ et des cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-1 β , et IL-6, en faveur de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. La même équipe a révélé que la TQ prévient l'élévation des taux des peroxydes lipidiques, de l'oxyde nitrique et de l'activité de la MPO, améliore l'activité des enzymes antioxydantes et diminue l'infiltration des PMN dans l'articulation (Umar *et al.*, 2015). L'effet protecteur de la TQ contre l'arthrite serait via l'inhibition des voies de signalisation induites par le LPS (p38 MAPK, ERK1/2 et NF- κ B) (Vaillancourt *et al.*, 2011) et par le TNF α (ASK1, c-Jun, p38 MAPK et JNK) (Umar *et al.*, 2015).

c) Activité anticancéreuse et chimiopréventive

Il y a actuellement un intérêt croissant pour le potentiel thérapeutique de la TQ, en particulier dans la thérapie anti-cancéreuse. Un nombre considérable d'études ont démontré que la TQ exerce une activité anticancéreuse remarquable et qu'elle inhibe la prolifération et induit l'apoptose des lignées cellulaires humaines des cancers du côlon, du sein, du cerveau, du pancréas, du poumon, du foie, de la prostate, des ovaires et bien d'autres (Gali-Muhtasib *et al.*, 2004a; Rooney et Ryan, 2005; Chehl *et al.*, 2009; Jafri *et al.*, 2010; Koka *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2011; Odeh *et al.*, 2012; Attoub *et al.*, 2013; Taha *et al.*, 2016). Il semble que l'inhibition de la prolifération cellulaire par la TQ soit spécifique aux cellules cancéreuses alors que sa

toxicité est minimale vis-à-vis des cellules normales (Worthen *et al.*, 1998 ; Shoieb *et al.*, 2003; Gali-Muhtasib *et al.*, 2004a&b ; El-Najjar *et al.*, 2010).

La TQ induit l'apoptose d'un grand nombre de lignées cancéreuses principalement par activation de la voie apoptotique intrinsèque. Elle provoque la mort cellulaire d'une manière p53-dépendante (Gali-Muhtasib *et al.*, 2004a) ou p53-indépendante par activation des caspases et augmentation du ratio Bax/Bcl-2 (El-Mahdy *et al.*, 2005; Roepke *et al.*, 2007). Des études récentes ont démontré l'induction de l'apoptose des cellules tumorales par la TQ à travers la génération des FRO (El-Najjar *et al.*, 2010) et la déplétion des niveaux du GSH (Koka *et al.*, 2010 ; Dergarabetian *et al.*, 2013). Zubair *et al.* (2013) ont montré que la TQ est capable de lier à la fois l'ADN et les ions de cuivre Cu(II) et de réduire ces derniers en Cu(I), un processus à travers lequel les radicaux hydroxyles sont générés provoquant des cassures dans l'ADN. L'inhibition de l'apoptose, induite par la TQ, des lignées cellulaires du cancer de prostate par des agents scavenger et chélateurs supporte ce mécanisme cytotoxique pro-oxydant de la TQ (Zubair *et al.*, 2013).

La TQ protège différents organes des lésions induites par la chimiothérapie et améliore l'efficacité de ces médicaments même contre des cancers résistants (Gali-Muhtasib *et al.*, 2006b). Les différents travaux publiés sur l'effet protecteur de la TQ contre la toxicité induite par les médicaments anti-cancéreux suggèrent un rôle possible de la TQ comme adjuvant dans l'amélioration de la qualité de vie des patients cancéreux (Woo *et al.*, 2012 ; Attoub *et al.*, 2013).

d) Activité antidiabétique

En plus des activités décrites ci-haut, la TQ détient des propriétés anti-diabétiques. Dans un modèle de diabète induit par la streptozotocine chez le rat, El-Mahmoudy *et al.* (2005) ont montré que la TQ abroge les réponses hyperglycémiques et hypo-insulinémiques. Ces effets impliqueraient l'inhibition des p44/42 (ERK1/2) et p38 MAPK qui contribuent à la machinerie transcriptionnelle de la iNOS et à la production du NO (El-Mahmoudy *et al.*, 2005). La TQ atténue la plupart des effets toxiques de la streptozotocine et préserve l'intégrité des cellules bêta en diminuant le stress oxydatif (Abdelmeguid *et al.*, 2010). Elle améliore les fonctions cardiovasculaires et atténue l'inflammation, le stress oxydatif et l'apoptose en interférant avec la voie PI3K/Akt (Liu *et al.*, 2016). L'amélioration de la neuropathie (Kanter, 2008) et de la néphropathie (Kanter, 2009; Omran, 2014) dans le modèle de diabète induit par la streptozotocine chez le rat suggère un rôle potentiel de la TQ dans l'amélioration des complications associées au diabète (Woo *et al.*, 2012).

I.3.2.3. Toxicité et efficacité thérapeutique de la TQ

La toxicité de la TQ a été évaluée dans différents modèles animaux ainsi que dans des essais cliniques de phase I. Chez la souris, les DL₅₀ obtenues suivant une administration orale et intrapéritonéale de la TQ étaient de 870,9 mg/kg et 104,7 mg/kg respectivement, et chez le rat de 794,3 mg/kg et 57,5 mg/kg respectivement (Al-Ali *et al.*, 2008). Une seule étude clinique a été effectuée sur l'efficacité anti-cancéreuse de la TQ chez des patients en situation de récurrence ou après échec de thérapies standards (Al-Amri et Bambosa, 2009). Malgré l'absence de réponse thérapeutique chez ces patients, la TQ a été bien tolérée à des doses allant jusqu'à 2600mg/jour et ce après une période de traitement s'étalant à 20 semaines (Al-Amri et Bambosa, 2009). Il est à noter que les propriétés anti-cancéreuses de la TQ ont été observées à des doses beaucoup plus faibles (5 à 20 mg/kg) que les DL₅₀ correspondantes (Gali-Muhtasib *et al.*, 2008; Jafri *et al.*, 2010).

CHAPITRE II

MATERIEL & METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Réactifs et animaux

Des rats males de type Wistar dont le poids varie de 180 à 220 g sont procurés de l'institut Pasteur d'Alger.

Les réactifs suivants : Thymoquinone, fMLF, PMA, zymosan, Cytochrome C, Superoxyde dismutase (SOD), xanthine, xanthine oxydase, FAD, ATP, GTP γ S, sucrose, λ -carraghénine, DFP, BSA, inhibiteurs des protéases et des phosphatases, tampons et solutions salines, proviennent de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le réactif Cyto-X est acheté chez Cell Applications Inc. (San Diego, CA, USA). Le RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) est fourni par Gibco. La NADPH provient de Roche Life Science (Indianapolis, IN, USA). Le Dextran T500 provient de Pharmacosmos (Holbaek, Denmark) et le Ficoll de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden). Le Fura-2/AM est fourni par Bioprobe (Paris, France). Les réactifs pour la SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) et Western blot sont procurés chez Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

Les anticorps monoclonaux anti-CD11b humain conjugués à la phycoérythrine (PE) sont de Beckman Coulter (Marseille, France), les anticorps monoclonaux anti-flavocytochrome b558 (7D5) conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) sont de MBL Medical and Biological Laboratories (Naka-Ku Nagoya, Japan). Les anticorps anti-Rac1/2 proviennent de BD Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), les anticorps anti-(P)ERK1/2 et anti-(P)p38 MAPK sont procurés de R&D Systems (Minneapolis, USA), les anticorps anti-p38 MAPK et anti-Phospho-PKC (pan) (β II Ser660) proviennent de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), les anticorps anti-MPO sont fournis par Abcam (Cambridge, UK), les anticorps anti-p22^{PHOX}, anti-ERK1/2, anti-PKC, anti-IgG de lapin et de souris conjugués à la peroxydase et anti-IgG de lapin et de souris conjugués à la phosphatase alcaline sont achetés chez Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany), les anticorps monoclonaux de souris anti- β -Actine proviennent de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les kits ECL (Enhanced Chemiluminescence) proviennent de Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, USA).

Les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la p47^{PHOX}, p47^{PHOX} phospho-Ser304 et p47^{PHOX} phospho-Ser328 ont été généreusement offerts par Dr. El-Benna Jamel (INSERM U1149, ERL 8252 CNRS, Centre de Recherche sur l'Inflammation, Paris, France).

II.2. Isolement des neutrophiles humains

Les neutrophiles ont été isolés dans des conditions stériles à partir du sang frais de donneurs sains, fourni par l'Etablissement Français du Sang (Hôpital Necker-Cabanel, Paris 15ème et Hôpital Bichat-Claude Bernard- Paris 18ème), suivant les étapes décrites par El-Benna et Dang (2007). Un volume de sang collecté sur citrate est mélangé à un volume de Dextran T500 dissout dans du NaCl 0,9% stérile afin de sédimenter les globules rouges. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le surnageant est récupéré pour être centrifugé à 400g pendant 10 minutes et à 20°C. Les culots sont récupérés et resuspendus dans du PBS, puis la suspension cellulaire est délicatement déposée sur Ficoll à raison de 2 volumes de cellules par volume de Ficoll. Après 30 minutes de centrifugation à 400g et à 20°C, l'anneau des monocytes/lymphocytes formé à l'interface PBS-Ficoll est éliminé, et le culot contenant les neutrophiles et les hématies contaminants est dispersé puis soumis à une hémolyse par ajout de 15 ml d'eau distillée froide. Au bout de 30 secondes, l'isotonie est rétablie par ajout du même volume de NaCl 1,8% froid. Après une centrifugation de 10 minutes à 400g et à 4°C, le culot des neutrophiles est récupéré dans du PBS, et les cellules sont comptées en utilisant un hémocytomètre Malassez après coloration des cellules par la solution de Türk (contenant 25 mg de violet de Gentiane et 2 ml d'acide acétique dans 100 ml d'eau distillée).

II.3. Test de production d'anions superoxydes dans les neutrophiles stimulés par le fMLF et le PMA

La production d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) est mesurée par la méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD à 550 nm dans un spectrophotomètre double faisceau Uvikon 860 thermostaté à 37°C (Markert *et al.*, 1984). Cette technique simple et hautement reproductible est basée sur la réduction, par le $O_2^{\cdot-}$ produit par la NADPH oxydase du neutrophile stimulé, du cytochrome C qui est incapable de traverser la membrane plasmique (Bylund *et al.*, 2014). Ainsi, cette technique est conçue pour mesurer exclusivement les FRO libérés dans le milieu extracellulaire.

Les neutrophiles (1×10^6 /ml) resuspendus dans le tampon Hanks (HBSS) sont incubés avec le cytochrome C (100 μ M concentration finale) en présence ou absence (contrôle) de différentes concentrations de la thymoquinone (0,005 à 0,5 μ g/ml dissoute dans le DMSO) pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite stimulées ou pas par le fMLF (10^{-6} M) ou par le PMA (100 ng/ml) et la variation de l'absorbance est enregistrée pendant 5 et 15 minutes respectivement.

Pour pouvoir analyser le mécanisme d'action de la TQ sur la production du $O_2^{\bullet-}$ et les autres fonctions du neutrophile, nous avons adapté les conditions du test de réduction du cytochrome C pour qu'elles soient compatibles avec celles utilisées dans les tests de la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$ et de la dégranulation décrits plus loin. Brièvement, les neutrophiles (5×10^6 /ml dans de HBSS) sont incubés avec le cytochrome C (200 μ M) en présence ou absence de la TQ (0,1 à 2,5 μ g/ml) pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite stimulées par le fMLF (10^{-6} M) ou le PMA (100 ng/ml) et l'augmentation de l'absorbance à 550 nm est suivie pendant 5 et 15 minutes respectivement. La SOD (75 U) est utilisée pour contrôler la spécificité de la réaction.

La production du $O_2^{\bullet-}$ est exprimée en nmoles de cytochrome C réduit/min/ 10^6 cellules ($\epsilon_{Cyt\ C\ (550\ nm)} = 21,1\ mM^{-1}.cm^{-1}$). La concentration finale du DMSO était inférieure à 0,1% et n'a aucun effet discernable sur la production du $O_2^{\bullet-}$ par les PMN.

II.4. Test de production des FRO dans les neutrophiles stimulés par le zymosan opsonisé (ZOP)

II.4.1. Opsonisation du zymosan au sérum humain

2 ml de zymosan (10 mg/ml dans du HBSS) sont mélangés à 2 ml de sérum humain AB, le tout est incubé 30 min à 37°C sous agitation. Le zymosan opsonisé est récupéré après une centrifugation de 10 min à 3500 rpm à température ambiante, lavé à 2 reprises en HBSS et repris dans un volume final de 1 ml de HBSS. Le ZOP est aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

II.4.2. Mesure de la production d'anions superoxydes dans les neutrophiles stimulés avec le ZOP par la méthode de réduction du cytochrome C

La production du $O_2^{\bullet-}$ par les neutrophiles stimulés par le ZOP est mesurée par la méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD. La réaction est conduite dans du tampon HBSS, contenant $0,5 \times 10^6$ cellules et 100 μ M de cytochrome C, en présence de la TQ (0,005 à 0,5 μ g/ml dans du DMSO) avec laquelle les cellules sont préalablement incubées pendant 15 minutes à 37°C. La production du $O_2^{\bullet-}$ est initiée par ajout de 500 μ g/ml de zymosan opsonisé. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, suivie d'une centrifugation rapide de 30 secondes à 13000 rpm (Centrifugeuse Eppendorf 5415D, Hamburg, Germany), l'absorbance des surnageants est mesurée à 550 nm. La production totale de superoxyde est exprimée en nmoles

de cytochrome C réduit/ 10^6 cellules ($\epsilon_{\text{Cyt C}}(550 \text{ nm}) = 21,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La SOD (75 U) est utilisée pour contrôler la spécificité de la réaction.

II.4.3. Mesure de la production des FRO dans les neutrophiles stimulés avec le ZOP par chimioluminescence

La production des FRO par les neutrophiles stimulés par le ZOP est également mesurée par chimioluminescence amplifiée par le luminol selon les étapes décrites par Makni-Maalej *et al.* (2013). Les membranes cellulaires sont perméables au luminol qui réagit avec différentes FRO ce qui permet leur détection aussi bien dans le milieu extracellulaire qu'intracellulaire (Bylund *et al.*, 2014). Brièvement, $0,5 \times 10^6$ de neutrophiles, resuspendus dans 500 μl de tampon HBSS contenant 10 μM de luminol, sont incubées en présence ou en absence de différentes concentrations de la TQ (0,005 à 0,5 $\mu\text{g/ml}$ dans du DMSO) pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont stimulées par 500 $\mu\text{g/ml}$ de zymosan opsonisé et l'émission de luminescence est enregistrée pendant 30 minutes dans un luminomètre thermostaté (Biolumat LB937; Berthold). L'émission de la luminescence est exprimée en unité relative de luminescence (RLU).

II.5. Test de viabilité des neutrophiles en présence de la thymoquinone

La viabilité des neutrophiles humains en présence des diverses concentrations de la TQ est évaluée par deux méthodes différentes :

II.5.1. Test au bleu trypan

La viabilité des neutrophiles est d'abord déterminée par la méthode d'exclusion au bleu trypan. Le bleu trypan est le colorant le plus communément utilisé pour distinguer les cellules viables des cellules non-viables. Ce colorant a tendance à entrer dans les cellules. Les cellules vivantes sont capables d'engager un mécanisme d'exclusion actif expulsant la molécule dans le milieu extracellulaire. Ainsi, les cellules vivantes ont une apparence réfractile et blanche au microscope. Inversement, les cellules mortes sont incapables d'expulser le colorant et apparaissent bleues et asymétriques.

Les neutrophiles ($5 \times 10^6/\text{ml}$ suspendus dans 500 μl de HBSS) sont incubés en présence de différentes concentrations de TQ (dissoute dans du DMSO) pendant 15 minutes à 37°C. Après une stimulation de 5 minutes par le fMLF (10^{-6}M), ou de 15 minutes par le PMA (100 ng/ml), les cellules sont centrifugées à 400g pendant 10 minutes et à 4°C. Le culot est

resuspendu dans 100 µl de bleu trypan et les cellules sont comptées dans un hémocytomètre de Malassez.

Le taux de viabilité est calculé comme suit :

$$\% \text{ Viabilité} = (\text{nombre des cellules vivantes} / \text{nombre total des cellules}) \times 100.$$

II.5.2. Test de cytotoxicité (Cyto-X)

La viabilité des neutrophiles en présence des concentrations croissantes de la TQ est par la suite déterminée par le Kit Cyto-X de Prolifération/Cytotoxicité cellulaire (Cell Applications, inc. San Diego, CA) suivant les instructions du fabricant. Le réactif Cyto-X est réduit, par les déshydrogénases dans les cellules vivantes, en formazan soluble de couleur orange qui absorbe à 450 nm. La teneur du formazan produit est directement proportionnelle au nombre des cellules vivantes.

Les neutrophiles (2×10^5 dans 100 µl de RPMI), préalablement incubés avec différentes concentrations de la TQ pendant 15 minutes à 37°C et stimulés ou pas par le fMLF (10^{-6} M) ou le PMA (100 ng/ml) pour 5 et 15 minutes respectivement, sont mélangés à 10 µl du réactif Cyto-X dans une microplaque de 96 puits. La plaque est incubée 2 heures dans un incubateur humidifié à 37°C avec 5% de CO₂. L'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm dans un lecteur de microplaques (Molecular Devices ThermoMax Microplate Reader).

La viabilité des neutrophiles est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle non traité par la TQ.

II.6. Effet scavenger d'anions superoxydes produits par la xanthine oxydase

L'effet scavenger de l'anion superoxyde par la TQ est déterminé dans le système acellulaire xanthine/xanthine oxydase en suivant la réduction du cytochrome C à 550 nm (McCord et Fridovich, 1969). Le mélange réactionnel, préparé dans du HBSS, contient 0,02 U de xanthine oxydase et 100 µM de cytochrome C en présence ou absence de différentes concentrations de la TQ. La production du O₂^{•-} est initiée par ajout de 500 µM de xanthine et la variation de l'absorbance à 550 nm est suivie pendant 10 minutes à 37°C dans un spectrophotomètre (UVIKON®860, KONTRON Instruments). La SOD (75 U) est utilisée pour contrôler la spécificité de la réaction. La quantité du O₂^{•-} produit est exprimée en nmoles de cytochrome C réduit/min/0,02U XO ($\epsilon_{\text{Cyt C (550 nm)}} = 21,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

II.7. Assemblage du complexe NADPH oxydase du neutrophile

Les membranes des neutrophiles, contenant le complexe NADPH oxydase préassemblé et actif, sont préparées comme suit :

Suivant l'isolement, les neutrophiles sont traités par 2,7 mM de Diisopropyl fluorophosphate (DFP) pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues dans du HBSS pour atteindre une concentration finale de 25×10^6 cellules/ml, avant d'être stimulées par 200 ng/ml de PMA pendant 30 minutes à 37°C. La stimulation est arrêtée par ajout de 40 ml de PBS glacé et les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot cellulaire résultant est resuspendu dans 1 ml de tampon de relaxation (100 mM KCl; 3 mM NaCl; 3,5 mM $MgCl_2$; 10 mM PIPES) contenant 1 mM d'ATP et 1,25 mM d'EGTA et les cellules sont lysées par sonication (4×10 sec sur la glace). Les cellules non cassées et les débris cellulaires sont sédimentés par une centrifugation de 10 minutes à 400 g. Le surnageant contenant le lysat cellulaire est déposé sur un gradient discontinu de sucrose (40% et 15% dans le tampon de relaxation + 1 mM ATP), puis soumis à une ultracentrifugation dans un rotor libre (sw55Ti, Beckman XL-90 Ultracentrifuge) à 35 000 rpm pendant 45 minutes à 4°C. La fraction cytosolique (phase supérieure) et la fraction membranaire (à l'interface entre les deux milieux de sucrose 40% et 15%) sont récupérées. La fraction membranaire contenant le complexe NADPH oxydase préassemblé est lavée dans le tampon de relaxation + 1 mM d'ATP, et les membranes sont ensuite resuspendues dans le même tampon contenant 1 mM d'ATP, 1,25 mM d'EGTA et 0,34 M de sucrose, à une concentration finale de $12,5 \times 10^8$ de cellule équivalent par millilitre. Les membranes sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

II.8. Test de production d'anions superoxyde par le complexe NADPH oxydase préassemblé (système acellulaire)

L'activité du complexe NADPH oxydase préassemblé est déterminée par la méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD en présence et en absence de la TQ à 37°C. Le mélange réactionnel, préparé dans du HBSS (500 μ l volume final), contient $1,5 \times 10^7$ de cellule équivalent des membranes précédemment préparées, 10 μ M de $GTP\gamma S$, 10 μ M de FAD, et 100 μ M de cytochrome C. La réaction est initiée par ajout de 200 μ M de NADPH. Le taux de $O_2^{\bullet -}$ produit est mesuré en suivant la réduction du cytochrome C à 550 nm. La spécificité de la réaction est contrôlée par la SOD (75 U).

II.9. Analyse de la phosphorylation de la p47^{PHOX} dans le neutrophile stimulé par le fMLF et le PMA

Les neutrophiles (5×10^6 suspendus dans 500 de HBSS) sont traités ou pas par différentes concentrations de la TQ (0,2 à 2,5 µg/ml dans du DMSO) pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont stimulées pendant 10 secondes par le fMLF (10^{-6} M) ou 5 minutes par le PMA (100 ng/ml) à 37°C. La stimulation est arrêtée par ajout de 125 µl de tampon Laemmli 5 fois concentré (Laemmli, 1970) contenant 12,5 mM de Na₃VO₄, 25 mM de NaF, 6,25 mM de p-NPP, 12,5 mM d'EDTA, 12,5 mM d'EGTA, 50 µg/ml de leupeptine, 50 µg/ml de pepstatine et 50 µg/ml d'aprotinine. Les échantillons sont ensuite dénaturés à 100°C pendant 5 minutes puis conservés à -80°C pour être analysés ultérieurement par Western Blot.

II.10. Analyse de la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane des neutrophiles

L'analyse de la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane plasmique est effectuée en analysant la distribution de ces composantes entre le cytosol et la membrane suivant une stimulation appropriée des neutrophiles.

Les neutrophiles (50×10^6 dans 1 ml de HBSS) sont incubés à 37°C pour 15 minutes avec la TQ et 5 minutes avec la cytochalasine B (5 µg/ml). Les cellules sont ensuite stimulées par le fMLF (10^{-6} M) pour 30 secondes à 37°C, et la stimulation est arrêtée par ajout de 40 ml de PBS glacé. Après une centrifugation de 10 minutes à 400 g et à 4°C, le culot cellulaire est récupéré dans 1 ml de tampon de relaxation décrit précédemment, contenant 1 mM d'ATP, 1,25 mM d'EGTA, 10 µg/ml de pepstatine, d'aprotinine et de leupeptine, et 1 mM de PMSF. Les cellules sont soumises à une lyse par sonication (3 × 10 secondes sur la glace). Les cellules non cassées et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation de 400 g pendant 10 minutes à 4°C. Le fractionnement subcellulaire est effectué en centrifugeant le lysat cellulaire à 45000 rpm pendant 1 heure à 4°C (rotor angulaire TL1003, Beckman Coulter Optima TLX Ultracentrifuge). La fraction cytosolique (surnageant) est récupérée, mélangée avec le tampon Laemmli (décrit précédemment), puis dénaturée à 100°C pendant 5 minutes. Le culot (contenant les membranes) est lavé dans le tampon de relaxation additionné d'ATP, d'EGTA et des anti-protéases (pepstatine, aprotinine et leupeptine), et les membranes sont enfin récupérées dans le tampon Laemmli puis dénaturées à 100°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à analyse par Western Blot.

La translocation des composants cytosoliques est également analysée dans les neutrophiles stimulés par la PMA. Les neutrophiles ($50 \times 10^6/\text{ml}$ de HBSS) sont pré-incubés pendant 15 min et à 37°C avec différentes concentration de TQ avant d'être stimulés pendant 5 minutes par le PMA (100 ng/ml) à 37°C . Après arrêt de la stimulation par du PBS glacé, les cellules sont lysées puis soumises à un fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur un gradient discontinu de sucrose comme décrit plus haut. Les fractions cytosoliques et membranaires récupérées sont dénaturées à 100°C pendant 5 minutes dans du tampon Laemmli et conservés à -80°C jusqu'à analyse ultérieure par Western Blot.

II.11. Analyse de l'expression membranaire de la gp91^{PHOX} du CD11b par cytométrie en flux

Les neutrophiles ($5 \times 10^6/\text{ml}$ dans du HBSS) sont incubés avec la TQ à 37°C pendant 15 minutes avant d'être stimulés par du fMLF (10^{-6} M) pendant 5 minutes, ou avec du PMA (100 ng/ml) pendant 15 minutes à 37°C . La stimulation est arrêtée en transférant les tubes sur la glace. $100 \mu\text{l}$ de chaque échantillon sont marqués par $10 \mu\text{l}$ d'anticorps monoclonaux anti-CD11b humaine conjugués à la phycoérythrine (PE) (Beckman Coulter, Marseille, France), ou d'anticorps monoclonaux 7D5 anti-flavocytochrome b558 humaine conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (MBL Medical and Biological Laboratories, Naka-Ku Nagoya, Japan), pendant 15 minutes dans un bain de glace. $350 \mu\text{l}$ de PBS glacé sont ensuite ajoutés et les échantillons sont immédiatement analysés par cytométrie en flux (FACS Canto II, BD Biosciences, Oxford, UK). Les interactions non spécifiques des anticorps sont contrôlées en utilisant des anticorps du même isotype (contrôle isotypique). L'intensité de fluorescence moyenne (MFI) des cellules CD11b positives et des cellules 7D5 positives est déterminée dans les neutrophiles après l'identification de la population des neutrophiles et l'élimination les autres types cellulaires et les débris par Forward et side scatter. Cinq milles évènements par échantillon sont analysés et tous les résultats sont obtenus avec une valeur constante du gain des PMT (photomultiplicateurs).

II.12. Mesure de la libération de la MPO

Les neutrophiles ($5 \times 10^6/\text{ml}$ dans $250 \mu\text{l}$ de HBSS) sont incubés à 37°C pour 15 minutes avec la TQ (0 à $2,5 \mu\text{g/ml}$) et 5 minutes avec la cytochalasine B ($5 \mu\text{g/ml}$). Les cellules sont stimulées par le fMLF (10^{-6} M) pendant 2 minutes à 37°C . Après une centrifugation rapide de 30 secondes à 13000 rpm (Centrifugeuse Eppendorf 5415D, Hamburg, Germany), le surnageant contenant la MPO libérée dans le milieu extracellulaire est récupéré, puis dénaturée par ajout

de tampon Laemmli 5 fois concentré et chauffage à 100 °C pendant 5 minutes. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à analyse par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques anti-MPO (1 :5000).

II.13. Analyse de la phosphorylation de la PKC, ERK1/2 et p38 MAPK dans le neutrophile stimulé par le fMLF

Les neutrophiles (5×10^6 dans 500 μ l de HBSS), préalablement incubés ou pas avec différentes concentrations de la TQ (0,2 à 2,5 μ g/ml dans du DMSO) pendant 15 minutes à 37°C, sont stimulés pendant 3 minutes à 37°C par 10^{-6} M de fMLF. La stimulation est arrêtée par ajout de 125 μ l de tampon Laemmli 5 fois concentré et les échantillons sont dénaturés à 100 °C pendant 5 minutes, puis conservé à -80°C jusqu'à analyse par Western blot.

II.14. Mesure de la libération du calcium intracellulaire dans le neutrophile stimulé par le fMLF

Les variations des taux du calcium intracellulaire sont mesurées par Fura-2/AM (acétoxyméthylester), un indicateur fluorescent sélectif du calcium intracellulaire. Fura-2 est une sonde à double longueur d'onde d'excitation et une seule longueur d'onde d'émission. Le Fura-2 non complexé au calcium possède un pic d'excitation à 380 nm, alors que le Fura-2 complexé au calcium présente une excitation maximale à 340 nm. La sonde est alternativement excitée à 340 nm puis à 380 nm tout au long de l'expérience. La longueur d'onde d'émission est mesurée à 510 nm dans les deux cas. De ce fait, une augmentation de la fluorescence émise lors d'une excitation à 340 nm (F340) accompagnée d'une diminution de la fluorescence émise lors d'une excitation à 380 nm (F380) traduit une augmentation du calcium cytoplasmique. Les variations du rapport F340/F380 reflètent donc les variations en calcium intracellulaire (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Les neutrophiles ($2,5 \times 10^6$ cellules/ml de HBSS), sont incubés avec 5 μ M de Fura-2/AM contenant 0,01% d'acide pluronique pendant 45 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées dans du HBSS et les changements des taux du Ca^{2+} intracellulaire induits par le fMLF (10^{-6} M) sont suivis en présence et en absence de la TQ (1 μ g/ml). La fluorescence est mesurée dans un fluorimètre à double longueur d'onde excitation, à 340 et 380nm pour l'excitation et à 510nm pour l'émission.

II.15. SDS-PAGE et Western Blot

Les échantillons sont soniqués pendant 10 secondes puis soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence du SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Les protéines dans les échantillons sont séparées par un gel de 10% dans un tampon de migration contenant 0,025 M de Tris-Base, 0,192 M de Glycine et 0,1% de SDS. Après séparation électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert liquide pendant 90 minutes à 70V, dans un tampon contenant 0,05 M de Tris-Base, 0,095 M de Glycine, 0,1% de SDS et 20% de Méthanol (Towbin *et al.*, 1979). Après 1 heure de saturation dans du lait écrémé 5% préparé dans du TBS-Tween 0,1% (contenant 25mM de Tris-HCl pH 7,5, 150mM de NaCl et 0,1% de tween 20), les membranes sont incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires : anti-p67^{PHOX} (1:5000), anti-Rac2 (1:5000), anti-p47^{PHOX} (1:5000), anti-phospho-Ser304-p47^{PHOX} (1:2500), anti-phospho-Ser328-p47^{PHOX} (1:5000), anti-phospho-PKC (pan) (βII ser660) (1:1000), anti-β-actine (1:5000), anti-PKC (1:500), anti-phospho-ERK1/2 (1:1000), anti-ERK1 (1:1000), anti-ERK2 (1:1000), anti-phospho-p38 MAPK (1:1000), anti-p38 MAPK (1:1000) ou anti-MPO (1:5000). Après 3 lavages de 5 minutes par du TBS-Tween 0,1%, les membranes sont incubées, pendant 1 heure à température ambiante, avec les anticorps secondaires correspondants : anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqués à la peroxydase (1 :30 000), anticorps de chèvre anti-IgG de souris marqués à la peroxydase (1:10 000), anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqués à la phosphatase alcaline (1:10 000), ou anticorps de chèvre anti-IgG de souris marqués à la phosphatase alcaline (1:10 000).

Les bandes protéiques sont révélées en utilisant le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Santa Cruz, CA, USA) lorsque les anticorps marqués à la peroxydase sont utilisés, où une caméra (Fusion Fx7) est utilisée pour détecter le signal. Dans le cas où l'anticorps secondaire est conjugué à la phosphatase alcaline, la révélation est effectuée par ajout d'un substrat chromogène contenant 0,015% de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) et 0,3 mg/ml de NBT (nitroblue tetrazolium) dans 0,1 M de tampon carbonate contenant 1 mM de MgCl₂. Les bandes protéiques obtenues sont quantifiées en utilisant le logiciel Image J 1.43u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

II.16. Effet de la TQ sur la pleurésie induite par la λ-carraghénine chez le rat

L'activité anti-inflammatoire de la TQ *in vivo* est évaluée dans un modèle d'inflammation aigüe induite par la λ-carraghénine chez le rat. Des groupes de 6 rats Wistar males dont le poids varie de 180 à 220 g sont formés. Les animaux sont traités par la TQ (10 et 50 mg/kg) ou par de l'eau physiologique stérile (groupe contrôle) par injection intrapéritonéale

une heure avant l'induction de l'inflammation. Les concentrations de la TQ choisies sont inférieures à la DL₅₀ de 57,5 mg/ml déterminée par injection intrapéritonéale chez le rat (Al-Ali *et al.*, 2008). L'inflammation pleurale est induite selon la méthode décrite par Cuzzocrea *et al.* (2000) et Moore (2003) avec quelques modifications. Chez les rats légèrement anesthésiés par exposition au dichlorométhane, une petite incision dermique est effectuée sur le côté gauche des animaux pour exposer les muscles intercostaux. 0,2 ml d'eau physiologique stérile (groupe placebo) ou de λ - carraghénine 1% sont injectés dans la cavité pleurale au niveau du sixième espace intercostal. L'incision dermique est refermée par des points de suture et les animaux sont réanimés. Après 4 heures de l'injection, les animaux sont sacrifiés, la cage thoracique est ouverte, et 1 ml de solution physiologique stérile est introduit dans la cavité pleurale. L'exsudat est récupéré par aspiration et le volume total est mesuré. Les neutrophiles présents dans l'exsudat sont comptés en utilisant un hémocytomètre Malassez après coloration des cellules par la solution de Türk.

II.17. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM d'au moins trois expériences indépendantes. L'analyse de variance par One-way ANOVA suivie par le test de Tukey pour les comparaisons multiples est effectuée en utilisant la version 5.0 de GraphPad Prism pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Le seuil de signification est fixé à $p < 0.05$.

CHAPITRE III

RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Effet de la TQ sur la production d'anions superoxydes par le neutrophile humain

La thymoquinone, un produit naturel des graines du cumin noir, a fait l'objet de nombreuses études qui lui ont attribué des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires intéressantes. Toutefois, son effet sur les fonctions du neutrophile humain, notamment la production des formes réactives de l'oxygène, n'a jamais été examiné. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'effet de la TQ sur la production des anions superoxydes dans le neutrophile humain en réponse à trois stimuli ; le fMLF, le PMA et le zymosan opsonisé (ZOP). Chacun de ces agonistes induit une signalisation différente au sein du neutrophile, mais aboutissent tous à l'activation du complexe NADPH oxydase et à la production du $O_2^{\bullet-}$.

Le fMLF et le PMA induisent l'assemblage de la NADPH oxydase à membrane plasmique du neutrophile et une production extracellulaire du superoxyde pouvant être détectée par méthode de réduction du cytochrome C. Le fMLF induit une production rapide et transitoire du superoxyde, avec un temps de latence très court (environ 10 sec), alors que le PMA induit une activation intense et prolongée de la NADPH oxydase ce qui explique sa popularité entre les expérimentateurs malgré sa nature artificielle. Comme pour le PMA, le ZOP produit une réponse forte avec un temps de latence prolongé, mais une durée courte d'explosion oxydative. La plupart du superoxyde produit en réponse au ZOP est intraphagosomale, mais il y a aussi une fraction extracellulaire détectable par réduction du cytochrome C (DeCoursey et Ligeti, 2005).

La production du $O_2^{\bullet-}$ par les neutrophiles pré-incubés avec la TQ pendant 15 minutes, et stimulés par le fMLF, le PMA ou le ZOP, a été déterminée par la méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD. Cette méthode permet de mesurer spécifiquement les anions $O_2^{\bullet-}$ libérés dans le milieu extracellulaire (Elferink, 1984). Les résultats présentés dans les **figures 16** et **17** montrent que la TQ inhibe fortement la production de $O_2^{\bullet-}$ dans le neutrophile humain stimulé par le fMLF et le PMA d'une manière dépendante de la concentration. Cette inhibition est très significative et est plus prononcée dans le cas du neutrophile stimulé par le fMLF (**Fig 16**) où elle est presque complète à une concentration de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de TQ contre 0,5 $\mu\text{g/ml}$ dans le neutrophile stimulé par le PMA (**Fig 17**).

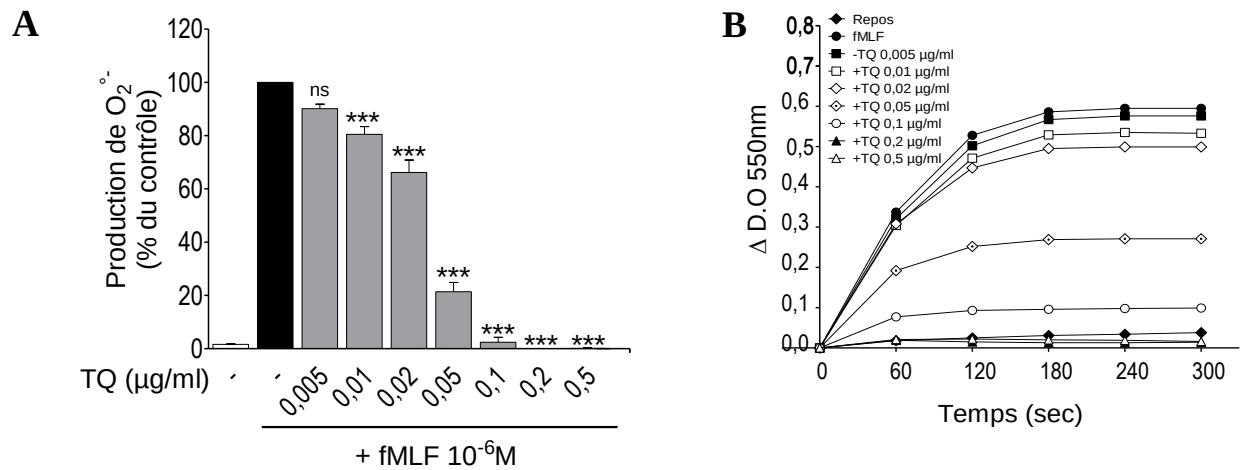


Figure 16. Effet de la TQ sur la production des anions superoxydes dans le neutrophile stimulé par le fMLF.

La production de O₂^{•-} est déterminée par la méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD. Les neutrophiles (10⁶/ml) sont pré-incubés avec différentes concentrations de TQ pendant 15 minutes à 37°C avant d'être stimulés par le fMLF (10⁻⁶M). **(A)** Vélocities initiales de réduction du cytochrome C exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non traité par la TQ. Production du contrôle = 10,35 ± 3,59 nmoles/min/10⁶ cellules. **(B)** Cinétique de réduction du cytochrome C en présence des concentrations croissantes de TQ, graphes représentatifs de 4 expériences indépendantes. Les valeurs sont une moyenne de 4 lectures ± SEM, ***: *p* < 0,005, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

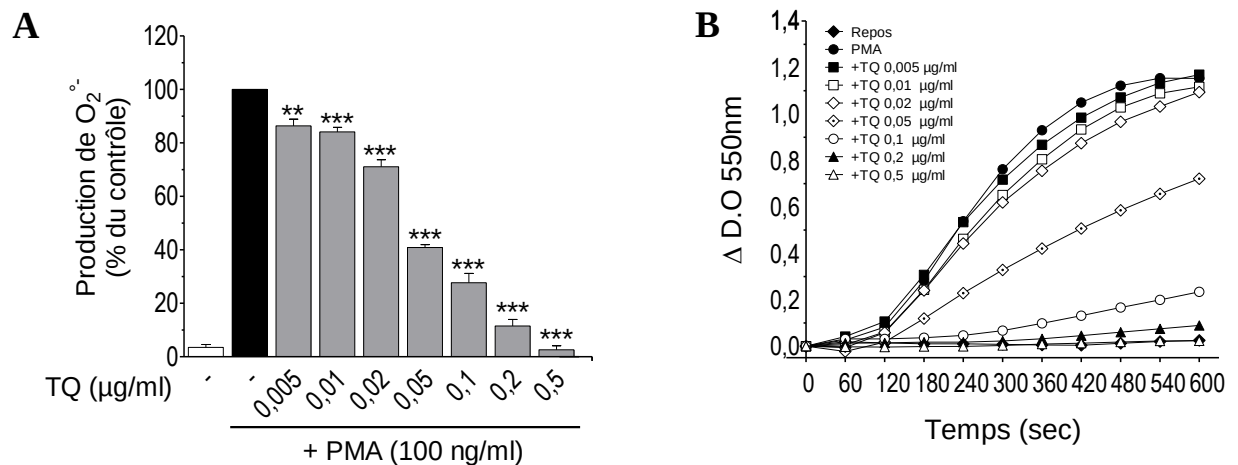


Figure 17. Effet de la TQ sur la production des anions superoxydes dans le neutrophile stimulé par le PMA.

La production de O₂^{•-} est déterminée par la méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD. Les neutrophiles (10⁶/ml) sont pré-incubés avec différentes concentrations de TQ pendant 15 minutes à 37°C puis stimulés par le PMA (100 ng/ml). **(A)** Vélocities initiales de réduction du cytochrome C exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non traité par la TQ. Production du contrôle = 6,69 ± 2,84 nmoles/min/10⁶ cellules. **(B)** Cinétique de réduction du cytochrome C en présence des différentes concentrations de TQ, une représentation de 4 expériences indépendantes. Les valeurs sont une moyenne de 4 lectures ± SEM, **: *p* < 0,01 ; ***: *p* < 0,005, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

Dans le neutrophile stimulé par le ZOP, la TQ semble inhiber la réduction du cytochrome C de manière assez efficace, où les 3 dernières concentrations de la TQ ont réussi à réduire l'absorbance enregistrée à des niveaux inférieurs à la basale (**Fig 18.A**). Toutefois, il s'avère que ce système expérimental ne soit pas adéquat pour la mesure de la production de l'anion superoxyde induite par le zymosan et que l'inhibition observée soit sur-estimée. En effet, le cytochrome C ne détecte que l'anion superoxyde libéré extracellulairement, or la production de l'anion superoxyde induite par le ZOP est principalement intracellulaire (Makni-Maalej *et al.*, 2013). D'autre part, le ZOP stimule les neutrophiles et induit la phagocytose avec internalisation d'une fraction non négligeable de cytochrome C réduit. La diminution de la quantité du cytochrome C extracellulaire (dans le surnageant) résulterait donc en une surestimation de l'inhibition de la production du $O_2^{\bullet-}$ par la TQ dans ce système.

Pour avoir une idée plus correcte de l'effet de la TQ sur la production des FRO par le neutrophile en réponse au ZOP, nous avons eu recours à une autre méthode qu'est la chimioluminescence. Bien que cette méthode ne soit pas spécifique au superoxyde, et qu'elle mesure la production extra et intracellulaire des FRO, elle permet de donner une estimation de l'effet de la TQ sur l'activité oxydative globale du neutrophile.

Les résultats obtenus dans le test de chimioluminescence révèlent que dans les neutrophiles stimulés par le ZOP, la TQ arrive à inhiber la génération des FRO mais uniquement à partir de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (**Fig 18.B**). Cette même concentration inhibe à 75% la production des FRO dans le neutrophile stimulé par le PMA, alors qu'elle abolie complètement cette production dans le neutrophile stimulé par le fMLF (**Fig 19**).

Les résultats obtenus jusqu'ici révèlent la capacité de la TQ à inhiber la production des FRO, et par conséquent la fonction oxydative du neutrophile, induite par trois stimuli différents ; le fMLF, le PMA et le ZOP. La différence de l'efficacité inhibitrice de la TQ en fonction du stimulus utilisé est probablement due au fait que ces différents agonistes ne mobilisent pas les mêmes voies de signalisation intracellulaires dans le neutrophile ni n'activent avec le même degré la NADPH oxydase.

Etant donné que la présente étude s'intéresse uniquement à la production extracellulaire du superoxyde, et en raison de la difficulté d'avoir une estimation précise de cette production extracellulaire lorsque le ZOP est utilisé comme stimulant, nous nous sommes focalisés uniquement sur le fMLF et le PMA.

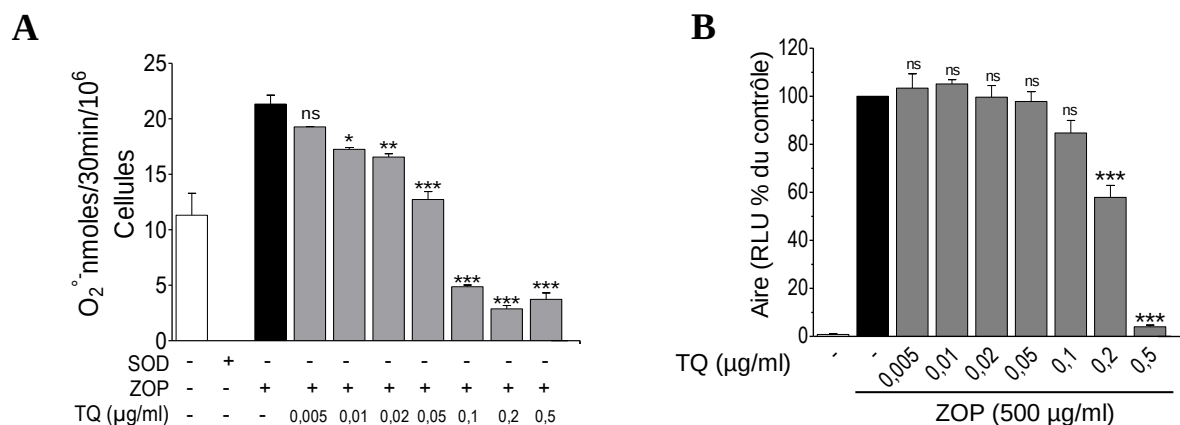


Figure 18. Effet de la TQ sur la production des FRO dans le neutrophile humain stimulé par le ZOP.

(A) La production de $O_2^{\cdot-}$ est déterminée par la méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD. Les neutrophiles ($10^6/ml$) sont pré-incubés avec différentes concentrations de TQ pendant 15 minutes à $37^\circ C$ avant d'être stimulés par le ZOP ($500 \mu g/ml$). La production totale du $O_2^{\cdot-}$ après 30 minutes d'incubation est estimée en nmoles/ 10^6 cellules, et est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle non traité par la TQ. (B) La production des FRO dans le neutrophile ($10^6/ml$) en réponse au ZOP ($500 \mu g/ml$) est déterminée par chimioluminescence, les colonnes de l'histogramme montrent les valeurs de l'intégrale de la chimioluminescence enregistrée pendant 30 minutes, et exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non traité par la TQ. Les valeurs sont une moyenne de 4 lectures $\pm$ SEM, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

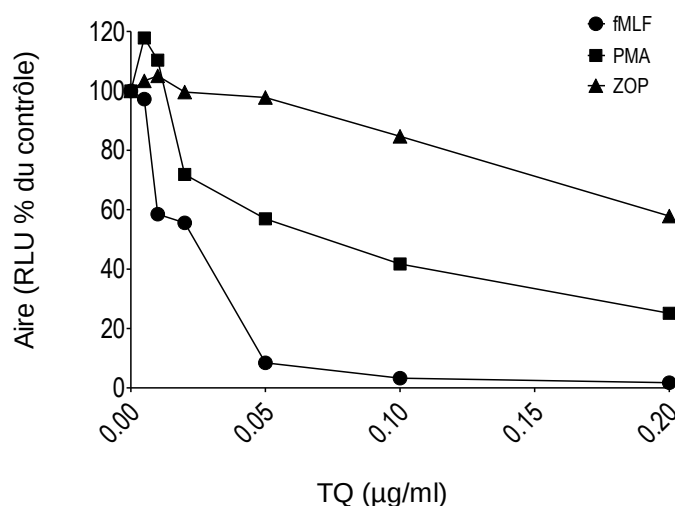


Figure 19. Comparaison des effets inhibiteurs de la TQ sur la production totale des FRO induite par le fMLF, le PMA et le ZOP

La production des FRO dans le neutrophile ($10^6/ml$) en réponse au fMLF ($10^{-6}M$), au PMA (100 ng/ml) et au ZOP ($500 \mu g/ml$) est déterminée par chimioluminescence. Les valeurs représentent les intégrales des courbes de chimioluminescence enregistrées pendant 10, 15 et 30 minutes (pour le fMLF, le PMA et le ZOP respectivement), et exprimées en pourcentage par rapport au contrôle non traité par la TQ.

Les tests de production de $O_2^{\bullet-}$ par la méthode de réduction du cytochrome *C* réalisé jusqu'ici ont été menée dans les conditions standards décrits dans la littérature où la production optimale est obtenue avec 10^6 cellules/ml. Etant donné que le but de la présente étude s'étend à l'élucidation des mécanismes d'inhibition de la production de $O_2^{\bullet-}$ par la TQ, en analysant l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire, les différentes voies de signalisation contrôlant la production des FRO et la dégranulation, nous avons donc refait le test de production de $O_2^{\bullet-}$ par la méthode de réduction du cytochrome *C*, cette fois-ci dans des conditions similaires aux tests de phosphorylation de la $p47^{PHOX}$, des PKC et MAPKinases, et de dégranulation, afin d'établir le lien entre ces derniers et la production des FRO par le neutrophile.

Comme le montre la **figure 20**, la TQ inhibe toujours assez fortement la réduction du cytochrome *C* par les neutrophiles humains en réponse au fMLF et au PMA d'une manière dépendante de la concentration. Cette inhibition est hautement significative ($p < 0,005$) à toutes les concentrations utilisées et, comme observé précédemment, est plus prononcée dans les neutrophiles stimulés par le fMLF. Le calcul des IC_{50} correspondantes montre que la TQ inhibe cinq fois plus efficacement la production du superoxyde lorsque le fMLF est utilisé comme stimulant.

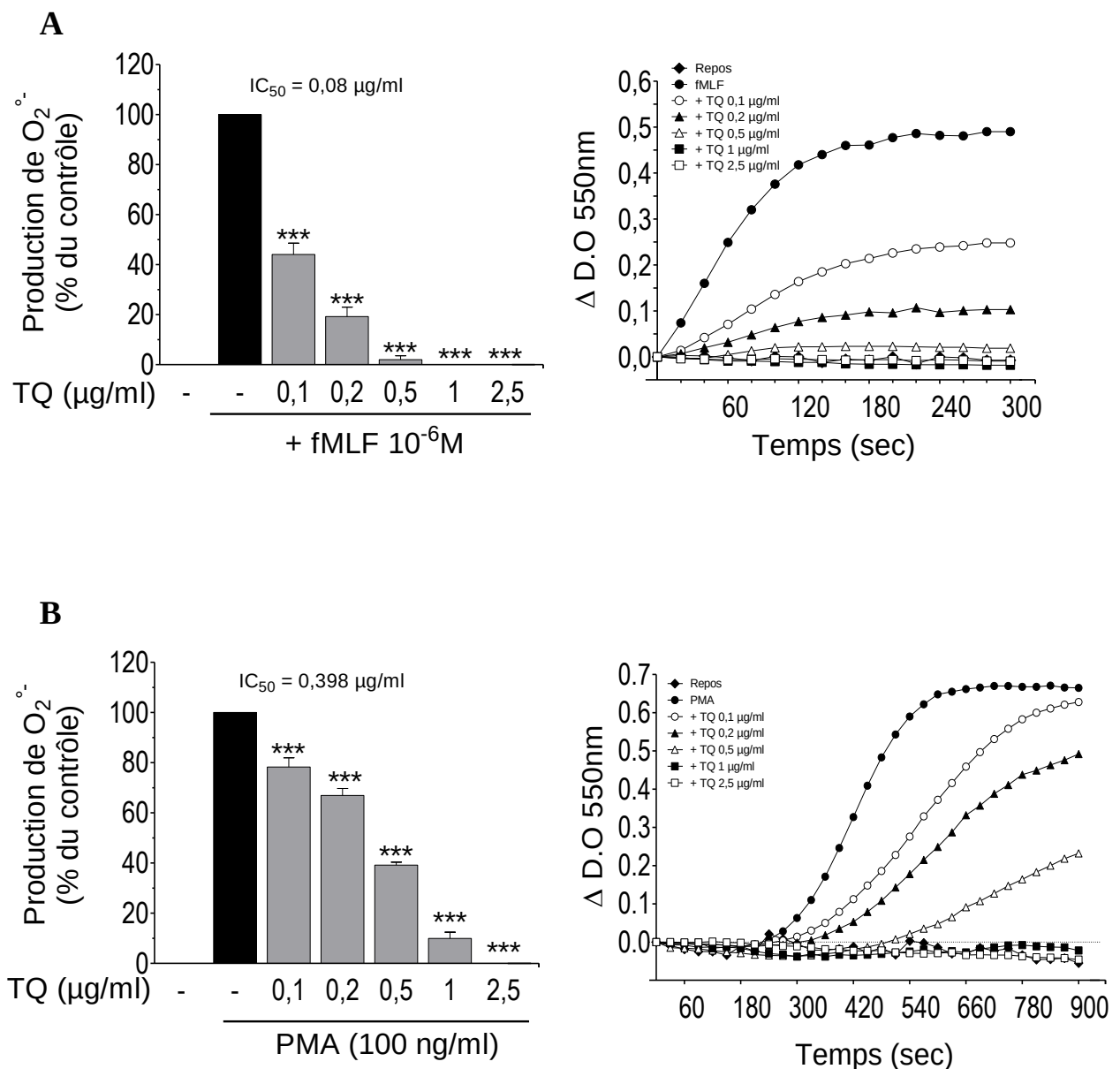


Figure 20. Effet de la TQ sur la production d'anions superoxydes dans le neutrophile stimulé par le fMLF (A) ; et le PMA (B)

Les neutrophiles (5×10^6 /ml) sont pré-incubés avec différentes concentrations de TQ pendant 15 minutes à 37°C avant d'être stimulés par 10⁻⁶M de fMLF ou 100 ng/ml de PMA. La production de O_2^- est déterminée par méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD. Les histogrammes à gauche représentent la vitesse initiale de la réaction de production de O_2^- exprimée en pourcentage par rapport au contrôle non traité par la TQ. Production des cellules du contrôle stimulées par le fMLF = $8,44 \pm 0,96$ nmoles/min/10⁶ cellules ; production des cellules du contrôle stimulées par le PMA = $2,19 \pm 0,24$ nmoles/min/10⁶ cellules. A droite la cinétique de réduction du cytochrome C en présence des concentrations croissantes de la TQ, une représentation de 4 expériences indépendantes. Les valeurs sont une moyenne de 4 lectures $\pm$ SEM, ***: $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

III.2. Effet de la TQ sur la viabilité des neutrophiles

Afin de vérifier que les activités observées de la TQ ne sont pas dues à un effet cytotoxique sur les neutrophiles, la viabilité de ces derniers a été évaluée par deux méthodes différentes ; par l'essai d'exclusion du bleu trypan, et par le kit Cyto-X de prolifération/cytotoxicité cellulaire. Ces essais ont été réalisés dans les mêmes conditions de l'essai de production des anions superoxydes.

Les résultats du test au bleu trypan présentés dans **la figure 21.A** montrent que la TQ n'a aucun effet sur la viabilité des neutrophiles et ce à toutes les concentrations de TQ utilisées. Ce test n'étant pas très précis, nous avons effectué un autre test plus spécifique pour s'assurer de la non-toxicité de la TQ vis-à-vis des neutrophiles. Ainsi, les résultats obtenus avec le test Cyto-X vont dans le même sens que le test au bleu trypan, et ce pour les neutrophiles stimulés par le fMLF et le PMA (**Fig. 21.B**). On note cependant une augmentation de la production du formozan dans les neutrophiles stimulés par le PMA par rapport aux cellules non stimulées. Cette production diminue uniquement à la concentration la plus forte de la TQ, sans pour autant descendre au-dessous de la lecture basale observée avec les cellules au repos (**Fig. 21.B**).

Les données de la littérature montrent que la TQ possède des propriétés cytotoxiques sélectives ; elle est capable de tuer les cellules cancéreuses humaines sans être nocive pour les cellules normales (Gali-Muhtasib *et al.*, 2006b). A des concentrations allant jusqu'à 60 μ M ($\approx$ 10 μ g/ml), la TQ est complètement inoffensive vis-à-vis des cellules humaines normales de l'intestin, alors qu'elle inhibe à plus de 90% la prolifération de certaines lignées du cancer de colon (El-Najjar *et al.*, 2010). Quant à la toxicité de la TQ envers les leucocytes ; Surber *et al.* (2009) n'ont rapporté aucun effet de la TQ (50 μ M) sur le nombre de macrophages après 48h d'administration. De même, Houghton *et al.* (1995) et Mansour et Tornhamre (2004) n'ont remarqué aucune cytotoxicité de la TQ vis-à-vis des leucocytes péritonéaux murins et les granulocytes polymorphonucléaires humains respectivement. Notant que les concentrations maximales utilisées dans ces deux études (50 μ g/ml et 100 μ M respectivement) dépassent largement celles utilisées dans la nôtre.

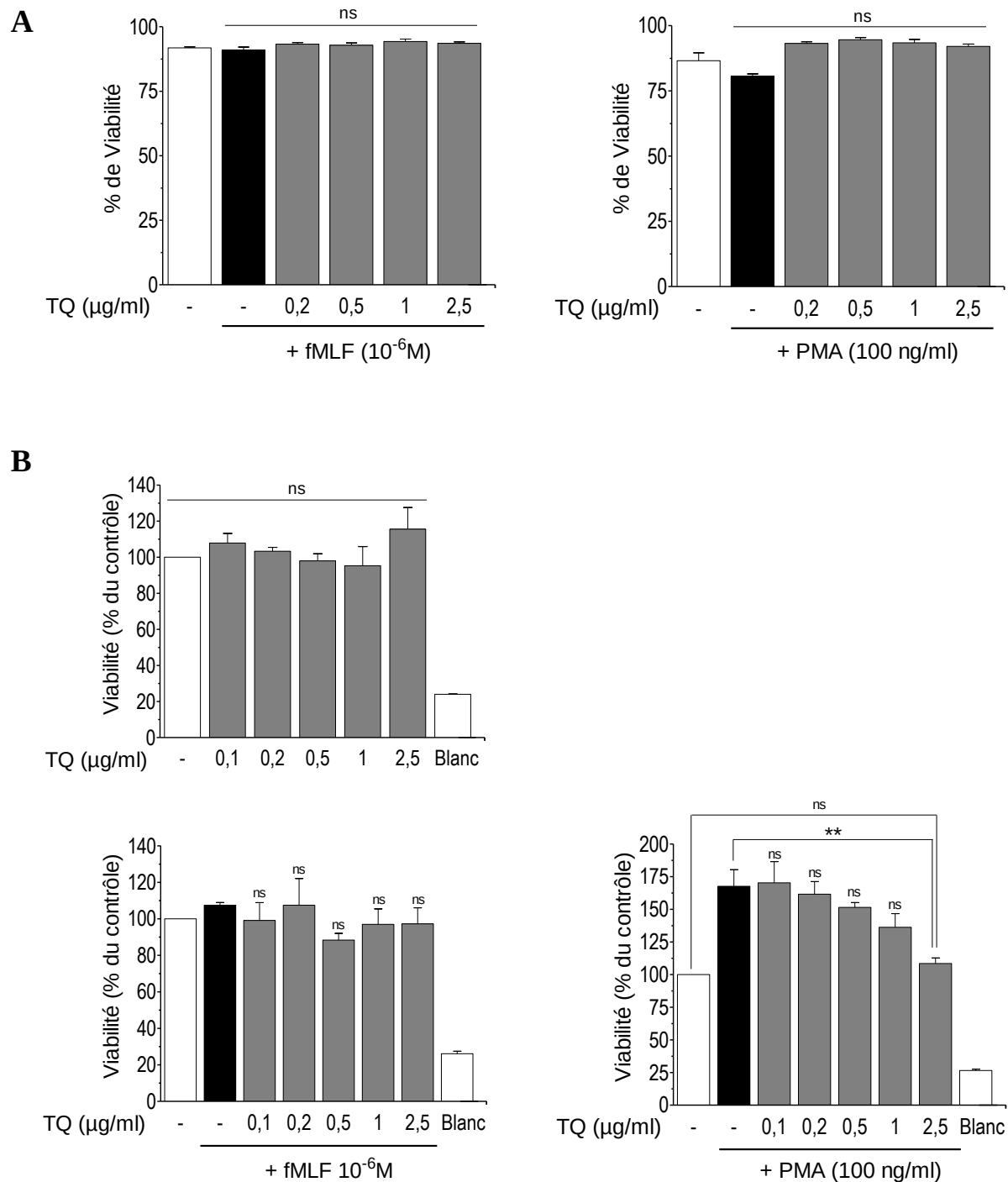


Figure 21. Effet de la TQ sur la viabilité des neutrophiles.

(A) Viabilité des neutrophiles stimulés par le fMLF (10^{-6} M) ou le PMA (100 ng/ml) en présence de différentes concentrations de la TQ déterminée par l'essai d'exclusion du bleu trypan. **(B)** Viabilité des neutrophiles stimulés ou pas par le fMLF (10^{-6} M) ou le PMA (100 ng/ml) en présence de la TQ, déterminée par le Kit Cyto-X de prolifération/cytotoxicité cellulaire. La viabilité est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle non stimulé et non traité par la TQ. Les valeurs sont une moyenne de 3 essais $\pm$ SEM. ns : non significatif ; ** : $p < 0.01$, comparaison effectuée par rapport au contrôle stimulé et non traité par la TQ.

(B)

III.3. Effet de la TQ sur la production d'anions superoxydes produits par la xanthine oxydase

Dans le but de vérifier que la TQ inhibe réellement la production d'anions superoxydes par le neutrophile sans que cet effet soit dû à une quelconque propriété scavenger de la TQ vis-à-vis de l'anion superoxyde, l'essai de réduction du cytochrome *C* dans le système acellulaire xanthine/xanthine oxydase a été réalisé en absence et en présences des différentes concentrations de la TQ. Les résultats, présentés dans la **figure 22** montrent que la production d'anions superoxydes n'a été réduite par aucune des concentrations de TQ utilisées, alors qu'elle a été complètement abolie par la SOD, démontrant que la TQ est dépourvue d'activité scavenger du $O_2^{\bullet-}$. En revanche, les concentrations de 1 et 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de TQ augmentent significativement la production du superoxyde par la xanthine oxydase. Nous n'avons observé aucun effet réducteur direct de la TQ sur le cytochrome *C* (Résultats non montrés).

Dans leurs études s'intéressant aux propriétés antioxydantes de la TQ, Mansour *et al.* (2002) et Badary *et al.* (2003) ont attribué à la TQ un effet scavenger du $O_2^{\bullet-}$ généré par le système xanthine/xanthine oxydase, ce qui va à l'encontre de nos résultats. La raison de cette divergence n'est pas claire, sauf que dans ces deux études, les sels de tetrazolium [le NBT (nitroblue tetrazolium) et le INT (iodophenyl-nitrophenyl-phenyltetrazolium)], ont été utilisés comme accepteurs d'électrons au lieu du cytochrome *C* (Mansour *et al.*, 2002 ; Badary *et al.*, 2003). Le cytochrome *C* est le seul accepteur à être réduit par un seul électron, il est donc plus spécifique pour l'anion superoxyde. La réduction des sels de tetrazolium requiert deux électrons résultant en la formation du formozan, un précipité insoluble, ce qui rend la quantification plus difficile. Nous pensons que la méthode de réduction du cytochrome *C* pour la détection de la production du superoxyde soit plus fiable. Il nous semble justifiable de déduire que l'inhibition de la production du superoxyde par le neutrophile humain ne soit pas due à effet direct de la TQ sur ce radical libre, mais plutôt sur le système cellulaire qui le génère ; la NADPH oxydase.

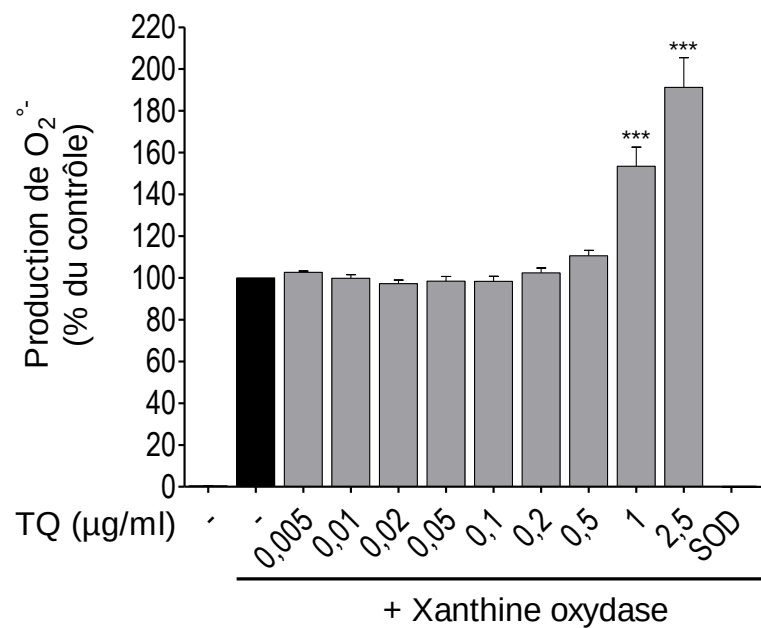


Figure 22. Effet de la TQ sur la production d'anions superoxydes par le système xanthine/xanthine oxydase.

La production de $O_2^{\bullet-}$ est déterminée par la méthode de réduction du cytochrome *C* inhibable par la SOD. Les résultats sont estimés en nmoles/min/0,02 U XO et exprimés en pourcentage du contrôle. Les valeurs sont une moyenne de 3 lectures $\pm$ SEM, ***: $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

III.4. Effet de la TQ sur l'activité catalytique du complexe NADPH oxydase préassemblé

La TQ démontre une activité inhibitrice importante sur la production des anions superoxydes par le neutrophile humain. Afin de déterminer à quel niveau la TQ agit, nous avons tout d'abord déterminé son effet direct sur l'activité catalytique du complexe NADPH oxydase, le système enzymatique professionnel générateur d'anions superoxydes dans les phagocytes. À cette fin, les fractions membranaires contenant le complexe NADPH oxydase préassemblé ont été préparées en traitant les neutrophiles par le PMA, un activateur direct des PKC qui entraîne la translocation des composantes cytosoliques p47^{PHOX}, p67^{PHOX} et Rac2 de la NADPH oxydase à la membrane pour rejoindre le cytochrome b558 et former une oxydase active. Les fractions membranaires contenant l'enzyme catalytiquement active sont purifiées par ultracentrifugation sur gradient discontinue de sucrose. Les blots présentés dans la **figure 23.A** confirment que les composantes cytosoliques (p47^{PHOX}, p67^{PHOX} et Rac2) sont bien présentes à la membrane des cellules stimulées par le PMA et que l'assemblage du complexe NADPH oxydase est réussi.

L'effet de la TQ sur le complexe NADPH oxydase préassemblé a été par la suite déterminé par la méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD, en présence de GTP γ S, FAD et du substrat NADPH. Les membranes des PMN contenant le complexe NADPH oxydase actif (membranes préparées à partir de PMN stimulés par le PMA) produisent en effet des quantités significatives de O₂⁻ ($p < 0,005$) en comparaison à celles ne contenant pas le complexe actif (membranes préparées à partir des cellules non stimulées) (**Fig. 23.B**). La spécificité de cette réaction a été contrôlée par ajout de la SOD, qui a réduit la production d'anions superoxydes au niveau basal. Lorsque les membranes des PMN stimulés par le PMA ont été incubées avec la TQ, la production du O₂⁻ a demeuré inchangée, même à la concentration de TQ de 0,5 μ g/ml qui a été capable d'abolir complètement la production de O₂⁻ par les neutrophiles intacts en réponse au fMLF et au PMA (**Fig 16 & 17**). Ces observations montrent clairement que la TQ n'inhibe pas directement l'activité catalytique de la NADPH oxydase, mais agit plutôt en interférant avec le processus d'activation de ce complexe enzymatique.

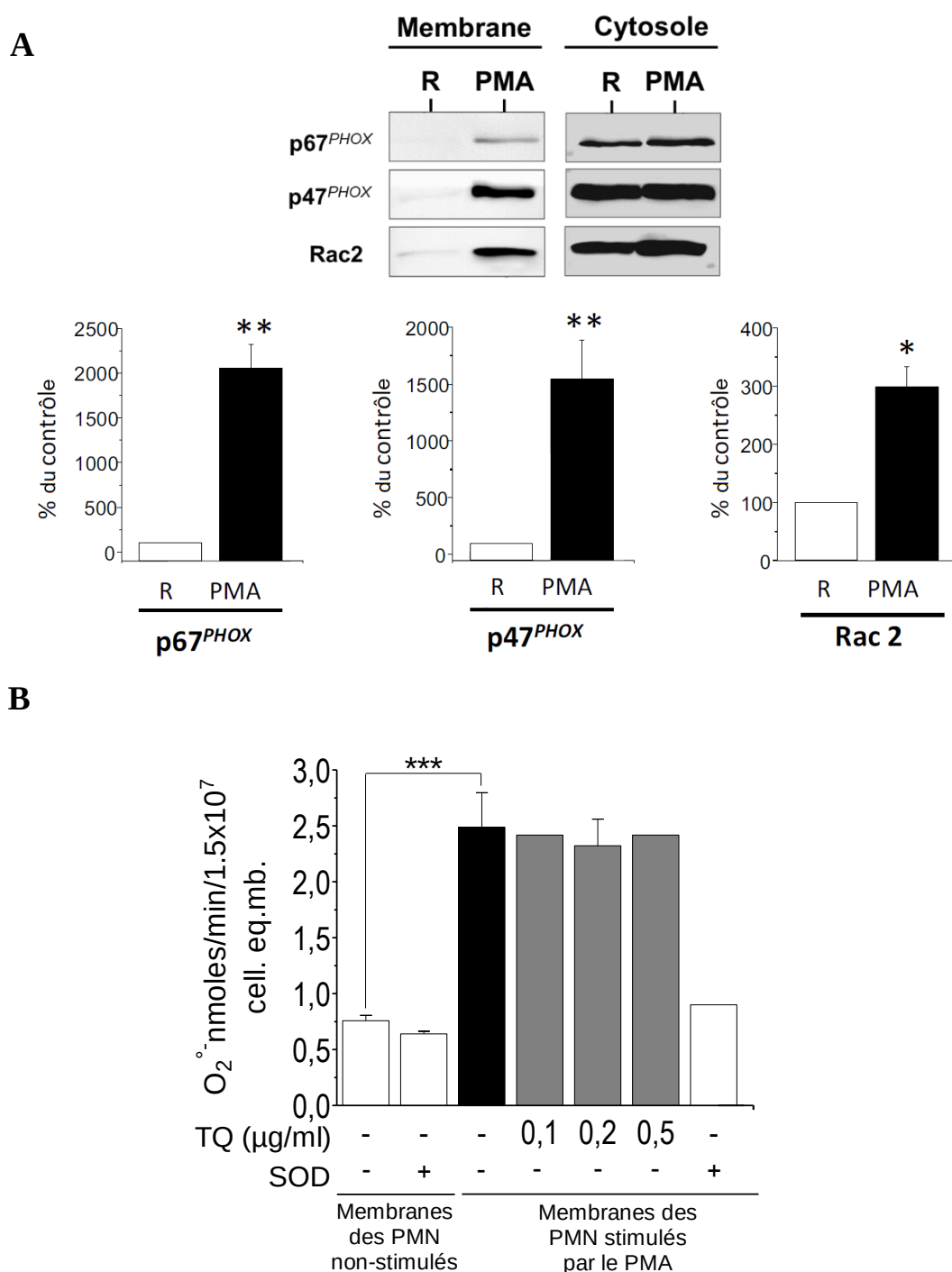


Figure 23. Effet de la TQ sur l'activité catalytique du complexe NADPH oxydase préassemblé.

(A) Les fractions membranaires contenant le complexe NADPH oxydase préassemblée sont préparées à partir des neutrophiles stimulés par le PMA comme décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ». Les blots en hauts montrent les sous unités cytosoliques de la NADPH oxydase (p47^{PHOX}, p67^{PHOX} et Rac2) détectées dans la fraction membranaires issue des PMN stimulés alors qu'elles ne sont pas présentes dans les membranes des cellules au repos. Les résultats de la quantification des bandes issues des fractions membranaires sont présentés dans l'histogramme en bas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle (membranes des cellules au repos). (B) Effet des différentes concentrations de la TQ sur l'activité catalytique du complexe NADPH oxydase dans un système acellulaire, évaluée par méthode de réduction du cytochrome C inhibable par la SOD. La production de O₂^{•-} est exprimée en nmoles/min/1,5 × 10⁷ cell.eq.mb. Les valeurs sont une moyenne de deux lectures ± SEM. ***: $p < 0,05$.

III.5. Effet de la TQ sur la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur les sérines 304 et 328

Dans les PMN au repos, les composantes de la NADPH oxydase sont distribuées entre le cytosol et la membrane plasmique. Pour que cette enzyme soit catalytiquement active, les composantes cytosoliques doivent être phosphorylées, en réponse à une stimulation appropriée, pour être capables de rejoindre les composantes membranaires et former le complexe NADPH actif.

La phosphorylation de la p47^{PHOX} est un évènement crucial à l'activation de la NADPH oxydase. Afin de voir si la TQ interfère avec ce processus, nous avons analysé son effet sur la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur les Ser304 et Ser328, particulièrement nécessaires à l'activation de la NADPH oxydase (Ago *et al.*, 1999 ; 2003).

Les résultats illustrés dans la **figure 24** montrent que le fMLF induit une phosphorylation très forte de la p47^{PHOX} sur les Ser304 et Ser328 en comparaisons au PMN non stimulés. Cette phosphorylation est inhibée par la TQ d'une manière dépendante de la concentration, avec un effet plus apparent sur la Ser304 (**Fig. 24.A**). L'analyse par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre la p47^{PHOX} non phosphorylée permet de s'assurer que la même quantité de protéine a été déposée dans chaque puit de la SDS-PAGE. Les bandes ont été quantifiées par densitométrie et les rapports entre les phospho- p47^{PHOX} et les p47^{PHOX} totales ont été calculés. Les résultats de la quantification montrent que l'inhibition de la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur les Ser304 et Ser328 est hautement significative ($p < 0,005$) à partir de 0,5 µg/ml de TQ (**Fig. 24.A et 24.B**). Ces résultats suggèrent que la TQ inhibe la production des anions superoxydes par la NADPH oxydase dans les neutrophiles stimulés par le fMLF en inhibant la phosphorylation de la p47^{PHOX}, bloquant ainsi l'activation du complexe NADPH oxydase.

Nous constatons cependant que la TQ inhibe la phosphorylation des Ser304 et 328 induite par le fMLF (IC₅₀ de 0,545 et 0,892 µg/ml respectivement) à des concentrations plus élevées que les concentrations inhibitrices de la production du superoxyde (IC₅₀ = 0,08 µg/ml). Cela signifie que la TQ utilise, en plus de l'inhibition de la phosphorylation de la p47^{PHOX}, d'autres mécanismes pour inhiber la production du superoxyde induite par le fMLF.

Dans le cas des neutrophiles stimulés par le PMA, et comme le montre la **figure 25**, nous n'avons pas pu observer d'effet significatif sur la phosphorylation des Ser304 et 328, au moins dans la gamme de concentration de TQ utilisée.

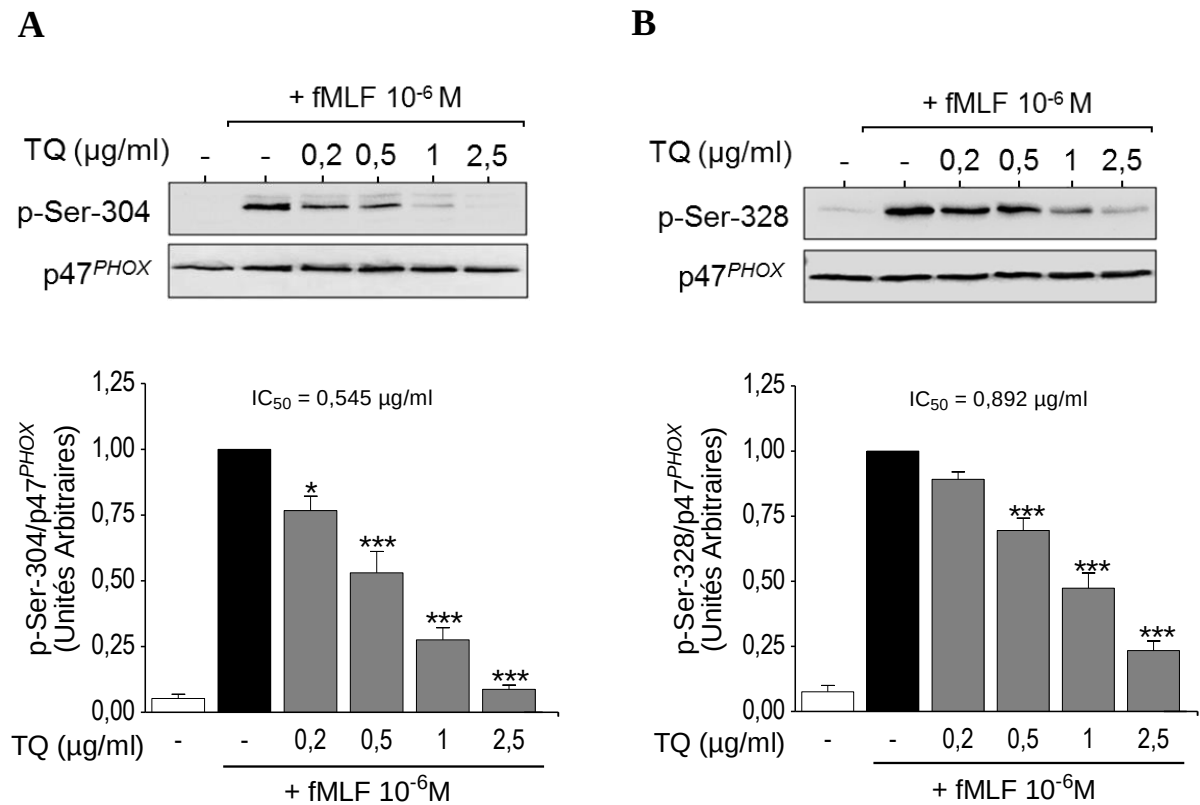


Figure 24. Effet de la TQ sur la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur la sérine 304 **(A)** et la sérine 328 **(B)** dans le neutrophile stimulé par le fMLF

Les neutrophiles (5×10^6 dans 500 μl de HBSS) sont incubés pour 15 minutes à 37°C avec différentes concentrations de la TQ, avant d'être stimulés par 10^{-6} M de fMLF pour 10 secondes. Après arrêt de la stimulation par du tampon Laemmli 5X et 5 minutes de dénaturation à 100°C, les lysats cellulaires sont soumis à une SDS-PAGE de 10% (4×10^5 eq. cell/puit) puis analysés par Western Blot en utilisant des anticorps spécifiques anti-phospho-Ser304-p47^{PHOX} et anti-phospho-Ser328-p47^{PHOX}. Les membranes sont réincubées avec les anticorps anti-p47^{PHOX} utilisée comme contrôle de charge. Les bandes sont quantifiées et les rapports entre l'intensité des phospho-p47^{PHOX} et celle de la p47^{PHOX} totale sont calculés. Les valeurs sont une moyenne de 3 essais indépendants $\pm$ SEM. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

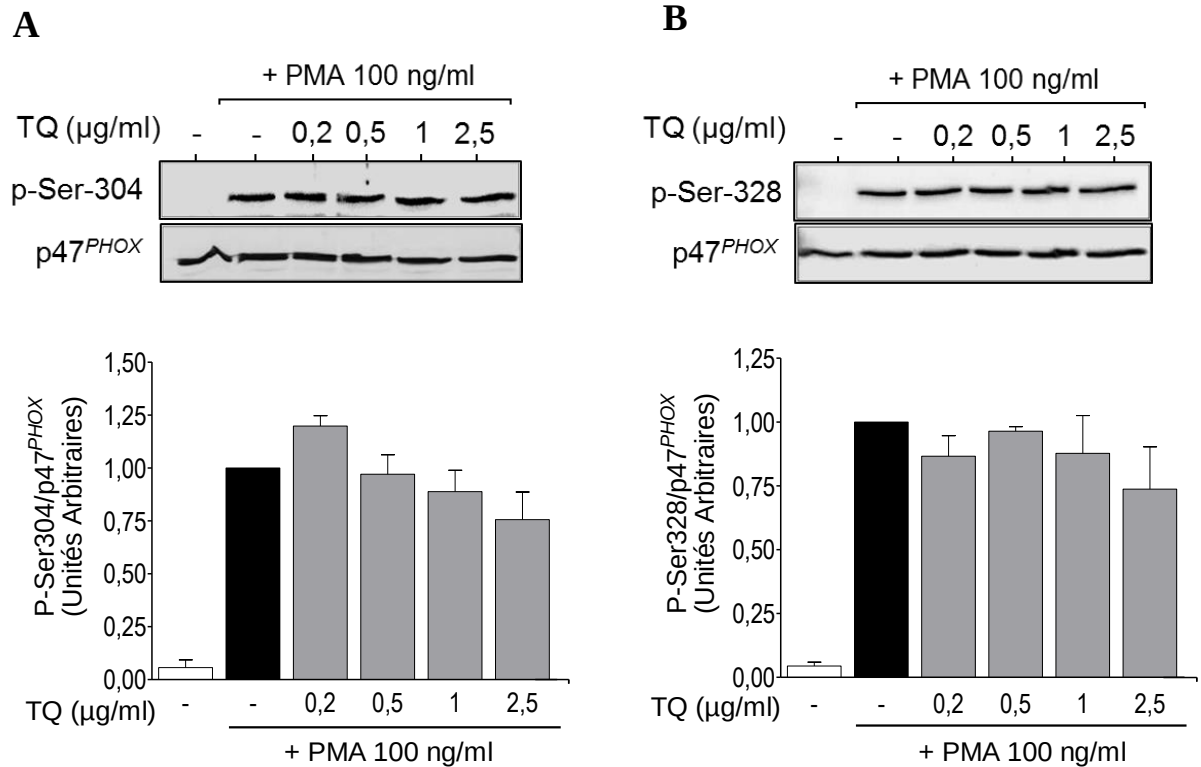


Figure 25. Effet de la TQ sur la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur la sérine 304 **(A)** et la sérine 328 **(B)** dans le neutrophile stimulé par le PMA

Les neutrophiles (5×10^6 dans 500 μl de HBSS) sont incubés pour 15 minutes à 37°C avec différentes concentrations de la TQ, avant d'être stimulés par 100 ng/ml de PMA pour 5 minutes. Après arrêt de la stimulation par du tampon Laemmli 5X et 5 minutes de dénaturation à 100°C, les lysats cellulaires sont soumis à une SDS-PAGE de 10% (4×10^5 eq. cell/puit) puis analysés par Western Blot en utilisant des anticorps spécifiques anti-phospho-Ser304-p47^{PHOX} et anti-phospho-Ser328-p47^{PHOX}. Les membranes sont réincubées avec les anticorps anti-p47^{PHOX} utilisée comme contrôle de charge. Les bandes sont quantifiées et les rapports entre l'intensité des phospho-p47^{PHOX} et celle de la p47^{PHOX} totale sont calculés. Les valeurs sont une moyenne de 3 essais indépendants $\pm$ SEM.

III.6. Effet de la TQ sur la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane du neutrophile

L'activation de la NADPH oxydase implique la phosphorylation des composantes cytosoliques, notamment la p47^{PHOX} et la p67^{PHOX}, suivie par leur translocation vers la membrane et leur association au cytochrome b558 pour former une oxydase active. La petite protéine G Rac2 est également requise pour l'activité de la NADPH oxydase ; et sa présence à la membrane, avec les autres composantes cytosoliques est cruciale (Bokoch et Zhao, 2006).

Les résultats décrits dans la section précédente montrent que la TQ inhibe la phosphorylation de la p47^{PHOX} dans les PMN stimulés par le fMLF. Nous avons donc pensé à vérifier si la TQ inhibe également la translocation induite par le fMLF des composantes cytosoliques p47^{PHOX} et p67^{PHOX}, ainsi que celle de Rac2 qui migre vers la membrane indépendamment des autres sous-unités cytosoliques de l'oxydase.

L'analyse, par Western blot, des fractions membranaires obtenues des neutrophiles stimulés par le fMLF montre que ce dernier induit une translocation nette de la p47^{PHOX}, la p67^{PHOX} et de Rac2 en comparaison aux neutrophiles au repos (**Fig. 26**). La p22^{PHOX} qui fait partie du cytochrome b558 est présente dans les membranes des cellules au repos et y reste après stimulation, alors qu'elle est totalement absente dans le cytosol. Sa quantité dans la membrane est constante ce qui nous permet de l'utiliser comme contrôle de charge.

Le traitement des neutrophiles par les différentes concentrations de TQ n'a point influencé la translocation de la p47^{PHOX}, de la p67^{PHOX} et de Rac2 (**Fig. 26**). Bien qu'elle inhibe la phosphorylation des sérines 304 et 328 sous fMLF, la TQ n'empêche pas la translocation de la p47^{PHOX}. Ces résultats suggèrent que la TQ n'agit pas sur l'assemblage de la NADPH oxydase dans les neutrophiles stimulés par le fMLF. De même, la TQ ne présente aucun effet sur la translocation des différentes composantes cytosoliques de la NADPH oxydase en réponse au PMA (**Fig. 27**).

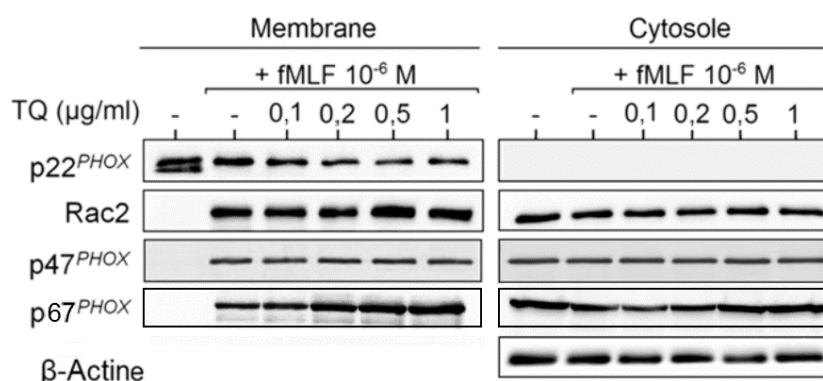


Figure 26. Effet de la TQ sur la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane des neutrophiles stimulés par le fMLF

Les neutrophiles ($50 \times 10^6/\text{ml}$) sont pré-incubés avec différentes concentrations de TQ avant d'être stimulés pendant 30 secondes par le fMLF (10^{-6}M) en présence de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cytochalasine B. Après arrêt de la stimulation par du PBS glacé, les cellules sont lysées puis soumises à un fractionnement cellulaire par ultracentrifugation. Les fractions cytosoliques et membranaires sont dénaturées dans du tampon Laemmli, soumises à une SDS-PAGE (4×10^5 eq. cell/puit), puis analysés par Western blot.

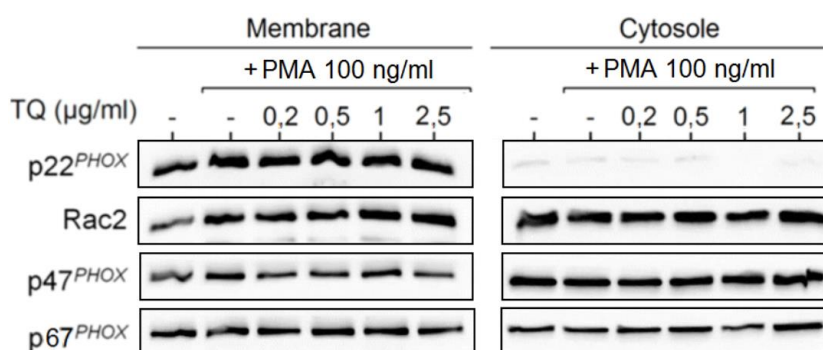


Figure 27. Effet de la TQ sur la translocation des composantes cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane des neutrophiles stimulés par le PMA

Les neutrophiles ($50 \times 10^6/\text{ml}$) sont pré-incubés avec différentes concentrations de TQ avant d'être stimulés pendant 5 minutes par le PMA (100 ng/ml). Après arrêt de la stimulation par du PBS glacé, les cellules sont lysées puis soumises à un fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur un gradient discontinu de sucrose. Les fractions cytosoliques et membranaires sont dénaturées dans du tampon Laemmli, soumises à une SDS-PAGE ($2,5 \times 10^6$ eq. cell/puit pour les fractions membranaires et 10^6 eq. cell/puit pour les fractions cytosoliques), puis analysés par Western blot.

Quel que soit le stimulus, le fonctionnement correct de la NADPH oxydase *in vivo* requiert les cinq composantes gp91^{PHOX}, p22^{PHOX}, p47^{PHOX}, de la p67^{PHOX} et Rac2. Ceci est illustré par le désordre génétique de la CGD résultant du dysfonctionnement ou de l'absence de l'une de ces composantes (DeCoursey et Ligeti, 2005). Il est généralement admis que l'assemblage du complexe NADPH oxydase résulte en son activation. Or, il s'avère que la phosphorylation et la translocation des composantes cytosoliques ne soient pas suffisantes à l'activité de l'oxydase (Dana *et al.*, 1994). Cross et Segal (2004) proposent un équilibre dynamique entre trois états de l'oxydase ; inactif, intermédiaire et actif. Dans ce modèle, le transfert d'électron ne se produit pas jusqu'à ce qu'un changement conformationnel du flavocytochrome b558 se produise. Ce changement conformationnel résulterait de l'interaction entre les sous unités cytosoliques et membranaires.

Dusi *et al.* (1993) ont rapporté que la staurosporine, un inhibiteur des sérine/thréonine kinases, inhibe la production des FRO et la phosphorylation de p47^{PHOX} et p67^{PHOX} induites par le fMLF, mais sans affecter la translocation de ces deux composantes à la membrane. Ils ont suggéré que la phosphorylation de p47^{PHOX} et p67^{PHOX} serait quantitativement dissociée de leur translocation, et que l'activité de l'oxydase n'est pas corrélée à la quantité des protéines phosphorylées présentes à la membrane. Plus récemment, Johnson *et al.* (1998) ont montré que la phosphorylation de la p47^{PHOX} se produit d'une manière hiérarchique où la phosphorylation des sérines 359 et/ou 370 est requise à la translocation de la p47^{PHOX} et à la phosphorylation d'autres sérines (Ser303/304) qui sont nécessaires à l'activation elle-même de l'oxydase, mais pas à la translocation de la p47^{PHOX} à la membrane. A la lumière de ces données, nous pouvons conclure que la TQ inhibe la phosphorylation de la p47^{PHOX} nécessaires à l'activité de l'oxydase (ex. Ser304), alors qu'elle n'aurait aucun effet sur la phosphorylation des sérines requises pour la translocation de la p47^{PHOX}. De plus, de par sa nature lipophile, la TQ pourrait altérer les propriétés de la membrane plasmique conduisant à un assemblage imparfait de la NADPH oxydase ce qui résulte en la réduction de son activité.

III.7. Effet de la TQ sur la dégranulation du neutrophile humain

L'exocytose des granules spécifiques et azurophiles joue un rôle clé dans diverses fonctions du neutrophile humain en modifiant la composition moléculaire des membranes cibles (Faurschou et Borregaard, 2003). Les granules spécifiques abritent le pool cellulaire le plus important (80%) du flavocytochrome b558 (gp91^{PHOX}/p22^{PHOX}) (Borregaard *et al.*, 1983; Jesaitis *et al.*, 1990). La stimulation de neutrophile entraîne une mobilisation de ces granules vers la membrane plasmique associée à une augmentation de l'activité de l'oxydase (Uriarte *et al.*, 2011). Toute inhibition du processus de dégranulation contribuerait ainsi à la réduction de la génération extracellulaire du O₂⁻ par la NADPH oxydase. Nous avons donc étudié l'effet de la TQ sur la libération des granules spécifiques par mesure de l'expression de la gp91^{PHOX} et du CD11b, contenus dans ces granules, à la surface du neutrophile par Cytométrie en flux.

La TQ a significativement réduit l'expression membranaire de la gp91^{PHOX} ainsi que celle du CD11b en réponse au fMLF (**Fig. 28**). Les concentrations de 1 et 2,5 µg/ml de TQ ont réussi à réduire l'expression membranaire de la gp91^{PHOX} au niveau basal où la fluorescence enregistrée est égale à celle obtenue avec les neutrophiles non stimulés ($p > 0,05$) (**Fig. 28.A**). L'inhibition de l'expression du CD11b est hautement significative ($p < 0,005$), et en présence de 2,5 µg/ml de TQ, l'expression du CD11b est même inférieure à son expression basale dans le neutrophile au repos (**Fig. 28.B**). Ces résultats suggèrent que la TQ inhibe la libération des granules spécifiques induite par le fMLF, ce qui pourrait affecter l'assemblage et l'activité de la NADPH oxydase à la surface cellulaire. A la gamme de concentrations utilisées, la TQ a réussi à réduire, mais d'une manière moins significative, l'expression membranaire du CD11b induite par le PMA ($p < 0,05$) (**Fig. 29.B**). Ces résultats suggèrent que la TQ pourrait inhiber la libération des granules spécifiques induite par le PMA, mais d'une manière moins prononcée que celle observée dans le neutrophile stimulé par le fMLF. Avec le PMA comme stimulant, cette inhibition serait plus importante avec des concentrations plus élevées de TQ.

L'importance de l'inhibition de la libération des granules spécifiques par la TQ ne se limite pas uniquement à la réduction de la production du superoxyde dans le milieu extracellulaire. Les granules spécifiques hébergent une collection de molécules et enzymes (ex. protéases) dont la libération excessive dans le milieu extracellulaire amorcerait des complications de la réaction inflammatoire et contribuerait à sa chronicité.

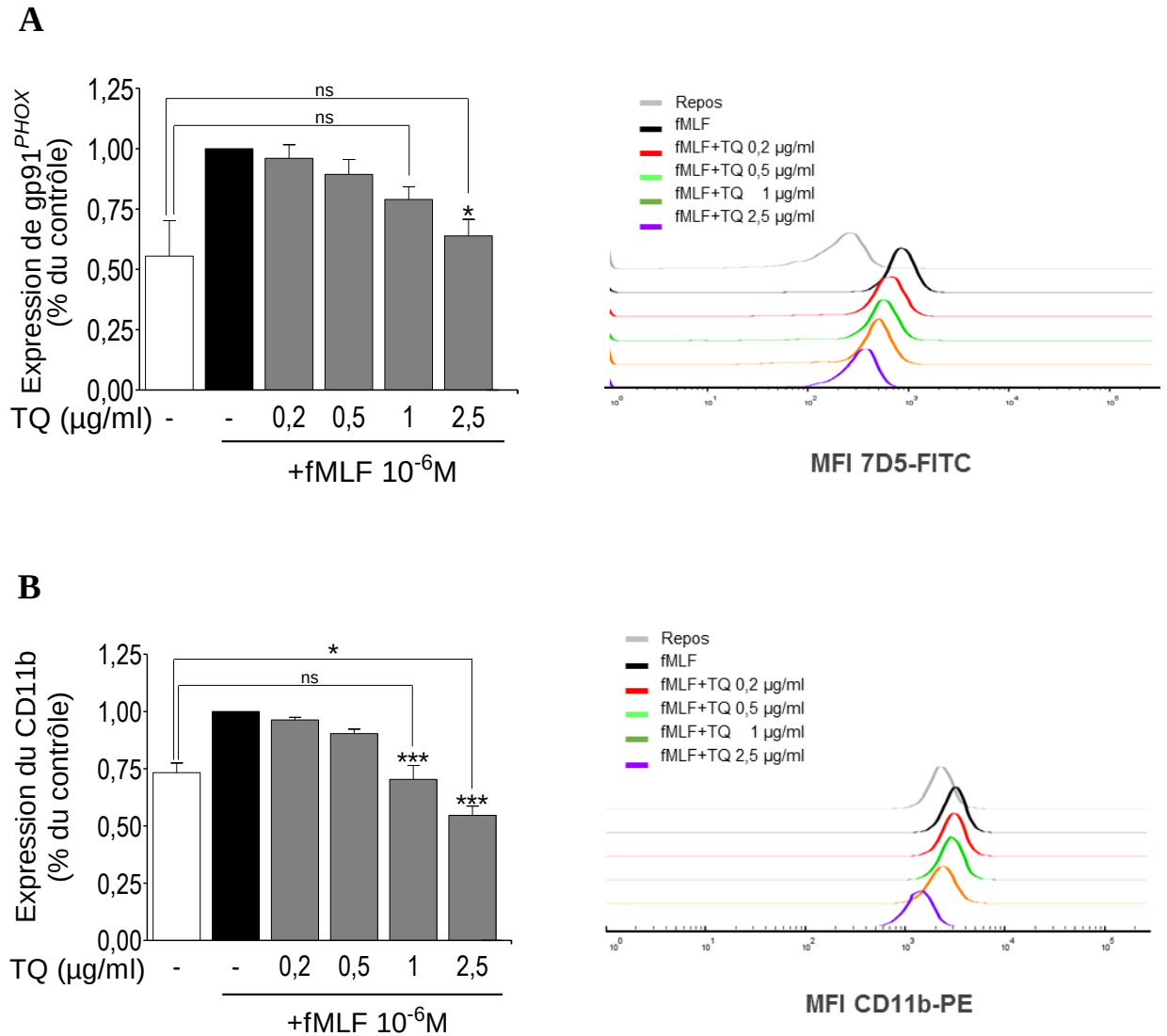


Figure 28. Effet de la TQ sur la libération des granules spécifiques dans le neutrophile stimulé par le fMLF

La libération des granules spécifiques est déterminée en mesurant l'expression membranaire de la gp91^{PHOX} (**A**) et du CD11b (**B**). Les neutrophiles (5×10^6 /ml) sont incubés pendant 15 minutes avec la TQ avant d'être stimulés par 10^{-6} M de fMLF pour 5 minutes. Les cellules sont par la suite marquées par les anti-gp91^{PHOX} conjugués à l'FITC ou par les anti-CD11b conjugués à la PE puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes à gauche représentent les résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (stimulé par le fMLF et non traité par la TQ). Les graphes à droite sont représentatifs des résultats du FACS. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 expériences indépendantes $\pm$ SEM. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

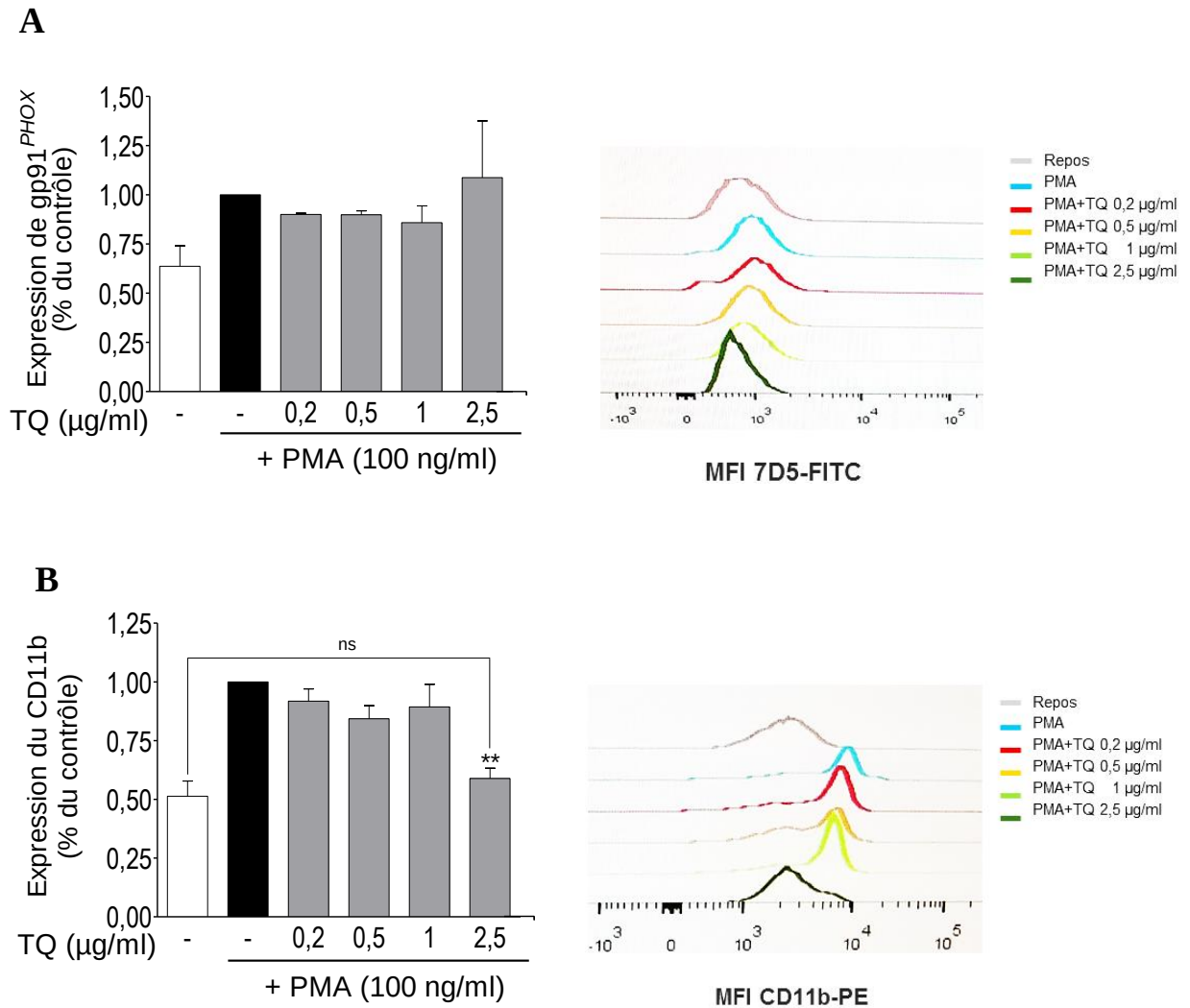


Figure 29. Effet de la TQ sur la libération des granules spécifiques dans le neutrophile stimulé par le PMA

Les neutrophiles ($5 \times 10^6/\text{ml}$) préalablement incubés pendant 15 minutes avec la TQ sont stimulés par le PMA (100 ng/ml) pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules marquées par les anti-gp91^{PHOX} conjugués à l'FITC (**A**) ou par les anti-CD11b conjugués à la PE (**B**) puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes à gauche représentent les résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (stimulé par le PMA et non traité par la TQ). Les graphes à droite sont représentatifs des résultats du FACS. Les valeurs sont une moyenne de 3 essais $\pm$ SEM. **: $p < 0,01$; comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

L'effet de la TQ sur la libération des granules azurophiles induite par le fMLF a été par la suite évalué en mesurant de la libération extracellulaire de la MPO dans les surnageant cellulaires. L'analyse de ces surnageants par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la MPO montre que la TQ exerce un effet inhibiteur significatif et puissant sur la libération de la MPO, visible à partir de la concentration de 1 µg/ml de TQ (**Fig. 30**).

Au cours d'une activation normale des neutrophiles, des quantités limitées de MPO sont libérées dans le milieu extracellulaire (estimées entre 10 à 15 %) (Serteyn *et al.*, 2003). Cependant, dans des conditions pathologiques, une activation continue et incontrôlée des neutrophiles entraîne une dégranulation massive de la MPO et des enzymes protéolytiques dans le milieu extracellulaire avec un risque de destruction locale. La MPO et ses produits dérivés sont fortement impliqués dans le développement et/ou l'aggravation de nombreuses pathologies, ce qui en fait une cible thérapeutique importante. La MPO est d'ailleurs considérée aujourd'hui comme un marqueur dans de nombreuses pathologies liées à l'activation des neutrophiles (McConnico *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2001 ; Hoy *et al.*, 2002). De même, la libération excessive des sérines protéases contenues dans les granules azurophiles du neutrophile est associée à un nombre de pathologies respiratoires (Hirsch *et al.*, 2004).

Par sa capacité d'inhiber l'exocytose des granules spécifiques et azurophiles du neutrophile, la TQ pourrait donc exercer une fonction anti-inflammatoire en prévenant/réduisant les dommages tissulaires dans le foyer inflammatoire.

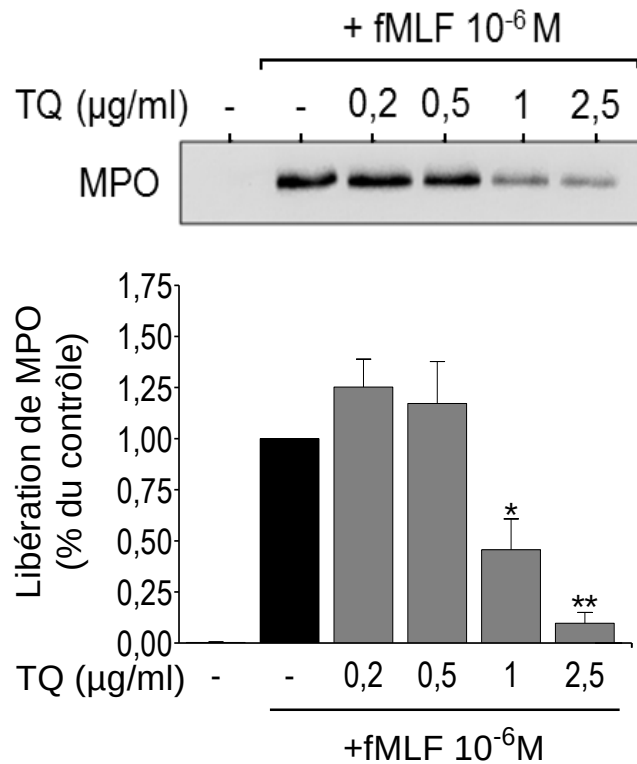


Figure 30. Effet de la TQ sur la libération des granules azurophiles induite par le fMLF

L'effet de la TQ sur la libération des granules azurophiles est déterminé en mesurant la libération de la MPO. Les neutrophiles ($20 \times 10^6/\text{ml}$) préalablement traités pendant 15 minutes avec différentes concentrations de la TQ, sont soumis à une stimulation de 2 minutes par du fMLF (10^{-6}M) en présence de $5 \mu\text{g/ml}$ de cytochalasine B. Les neutrophiles sont éliminés par centrifugation rapide de 30 secondes à $13\,000 \text{ rpm}$ et le surnageant est analysé par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la MPO. Les résultats de la quantification sont présentés par l'histogramme en bas. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 expériences indépendantes $\pm \text{SEM}$. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité par la TQ.

III.8. Effet de la TQ sur les voies de signalisation stimulées par le fMLF dans le neutrophile humain

Dans le neutrophile, la production des FRO et la dégranulation induites par le fMLF sont sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation intracellulaire. En particulier, la voie des PKC est impliquée dans la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$ et la production des FRO (El Benna *et al.*, 1994), alors que la voie des MAP Kinases est impliquée dans la dégranulation (Lacy, 2006). Comme ces fonctions sont fortement altérées par la TQ dans les neutrophiles stimulés par le fMLF, nous avons examiné la capacité de la TQ à bloquer l'activation de ces voies.

Dans un premier temps, l'effet de la TQ sur l'activation des PKC dans le neutrophile stimulé par le fMLF a été analysé par Western blot en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre la phospho-Ser660. Cette sérine est un site d'autophosphorylation qui régule l'activité des PKC, elle est localisée dans la partie C-terminale et est commune à plusieurs isoformes de PKC. Comme le montre la **figure 31.A**, l'anticorps reconnaît trois phosphoprotéines dont le poids moléculaire varie entre 60 et 85 kDa. Ces trois protéines sont également reconnues par un anticorps anti-PKC-pan, indiquant que ces trois bandes correspondent à trois isoformes de PKC. Parmi ces trois isoformes, la phosphorylation des deux en bas, correspondant aux bandes 2 et 3, est significativement réduite par la TQ d'une manière dépendante de la concentration (**Fig. 31.A, B et C**), alors que la phosphorylation de la bande supérieure n'est guère affectée (**Fig. 31.A**). Ces observations suggèrent que la TQ est capable d'inhiber l'activation d'au moins deux isoformes de PKC dans le neutrophile stimulé par le fMLF.

Les neutrophiles humains expriment cinq isoformes de PKC, α , βI , βII , δ et ζ (Majumdar *et al.*, 1991; Smallwood et Malawista, 1992; Dang *et al.*, 1994; Kent *et al.*, 1996). Parmi ces isoformes, les PKC α , βII et δ sont capables de phosphoryler tous les sites majeurs sur la $p47^{PHOX}$, alors que la PKC ζ phosphoryle uniquement un groupe sélectif de sites, en particulier Ser303/304 (Dang *et al.*, 2001; Fontayne *et al.*, 2002). En plus de leur capacité de phosphoryler la $p47^{PHOX}$, les PKC α , βII , δ et ζ induisent l'activation de la NADPH oxydase dans un système acellulaire (Fontayne *et al.*, 2002). Quoique l'identité des isotypes de PKC ciblés par la TQ reste à déterminer, nous pouvons conclure que la TQ bloquerait l'activation de la NADPH oxydase en altérant la phosphorylation PKC-dépendante de la $p47^{PHOX}$, au moins sur les sérines 304 et 328.

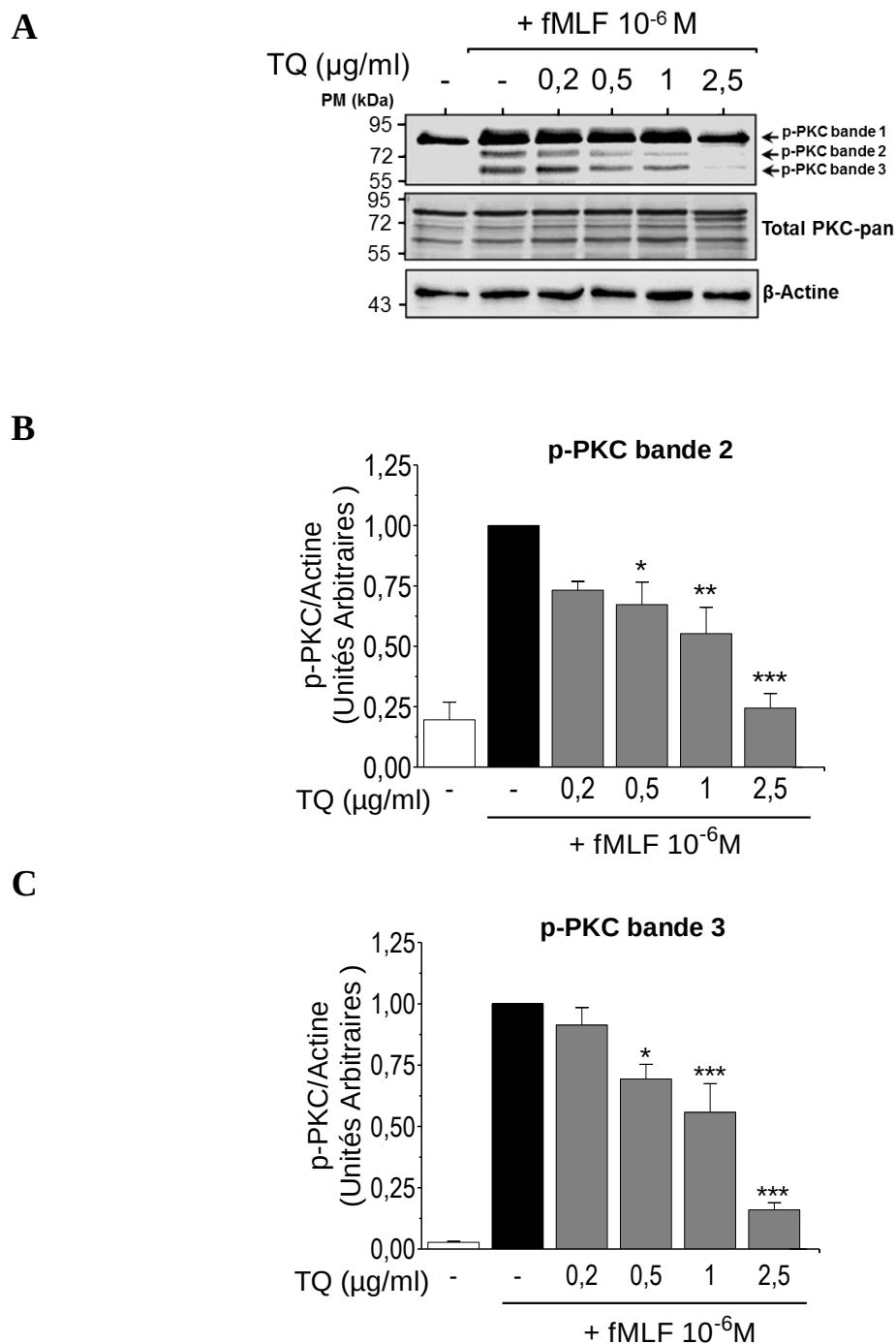


Figure 31. Effet de la TQ sur la phosphorylation de la PKC induite par le fMLF

Les PMN (5×10^6 dans 500 μ l de HBSS) sont incubés pendant 15 minutes à 37°C avec la TQ puis soumis à une stimulation de 3 minutes par du fMLF (10^{-6} M). Après dénaturation dans le tampon Laemmli 5X, les échantillons sont soumis à une SDS-PAGE de 10% (4×10^5 eq.cell/puit) puis analysés par Western blot en utilisant des anticorps anti-phospho Ser660-PKC-pan et anti-PKC-pan (**A**). Les membranes sont reblottées avec les anticorps anti-actine, utilisée comme contrôle de charge. Les rapports entre les bandes des phospho-PKC et celles de l'actine sont déterminés (**B** et **C**). Les valeurs sont une moyenne de 3 essais indépendants $\pm$ SEM. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle stimulé par le fMLF et non traité par la TQ.

Les MAPK, en particulier ERK1/2 et p38 MAPK, constituent un autre groupes de kinases impliquées dans diverses fonctions du neutrophile induites par le fMLF, notamment la phosphorylation des composantes de la NADPH oxydase (Dewas *et al.*, 2000 ; Dang *et al.*, 2003) et la dégranulation (Mocsai *et al.*, 2000 ; Fumagalli *et al.*, 2007). Afin d'explorer davantage les mécanismes possibles de l'inhibition des fonctions du neutrophile par la TQ observées jusqu'ici, nous avons analysé l'effet de la TQ sur l'activation des MAP Kinases (ERK1/2 et p38 MAPK) dans les neutrophiles stimulés par le fMLF en utilisant des anticorps anti-phospho MAPK. Les résultats obtenus, illustrés dans la **figure 32.A**, montrent que la forte phosphorylation de ERK1/2 induite par le fMLF a été significativement réduite par la TQ ($p < 0,005$) à la concentration de 2,5 µg/ml. Cette même concentration a également réduit la phosphorylation de la p38 MAPK mais d'une manière moins significative ($p < 0,05$) (**Fig. 32.B**).

Dans le neutrophile, les ERK1/2 et p38 MAPK interviennent dans le priming de l'explosion oxydative, l'activation de la NADPH oxydase et la production des FRO (El Benna *et al.*, 1996b ; Krump *et al.*, 1997 ; McLeish *et al.*, 1998). Dewas *et al.* (2000) ont montré que ERK1/2, mais pas la p38 MAPK, joue un rôle important dans la phosphorylation de la p47^{PHOX} dans les neutrophiles stimulés par le fMLF. La même équipe a par la suite rapporté le rôle des deux MAPK dans la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur la Ser345 au cours du priming du neutrophile par le TNF et le GM-CSF. Elle a également montré que cette phosphorylation joue un rôle essentiel dans l'hyperactivation des PMN dans la pathologie de la polyarthrite rhumatoïde (Dang *et al.*, 2006).

Dans les fibroblastes synoviaux isolés de patients arthritiques, les données bibliographiques indiquent que la phosphorylation induite par le LPS de ERK1/2 et p38 MAPK est inhibée par la TQ (El-Mahmoudy *et al.*, 2005; Vaillancourt *et al.*, 2011). El-Mahmoudy *et al.* (2005) ont remarqué que la TQ inhibe aussi l'expression et la sa synthèse *de novo* de p38 MAPK dans les macrophages péritonéaux de rat. La phosphorylation de ERK1/2 induite par le TNF α est pourtant insensible à la TQ (Umar *et al.*, 2015). Il a été suggéré donc que la TQ exerce des effets adverses vis-à-vis de ERK qui sembleraient spécifiques au type cellulaire et à la nature du stimulant (El-Najjar *et al.*, 2010).

Dans la présente étude, nous montrons que la TQ inhibe la phosphorylation induite par le fMLF de ERK1/2 et p38 MAPK dans le neutrophile humain. Cette inhibition contribuerait à l'atténuation de la production excessive des FRO par le neutrophile dans le foyer inflammatoire.

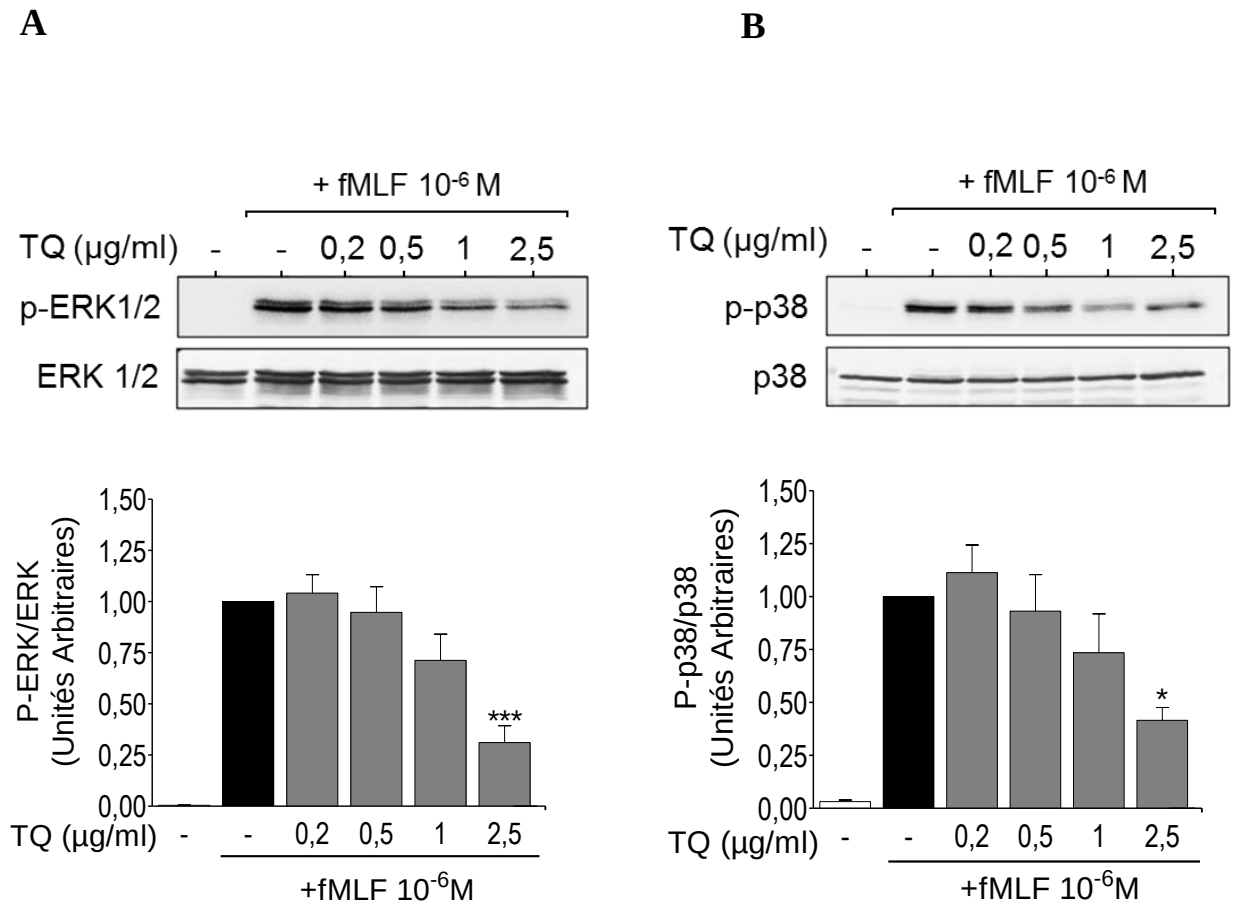


Figure 32. Effet de la TQ sur la phosphorylation induite par le fMLF des ERK1/2 **(A)** et p38 MAPK **(B)**.

Les PMN (5×10^6 dans 500 μ l de HBSS) sont incubés pendant 15 minutes à 37°C avec la TQ puis soumis à une stimulation de 3 minutes par du fMLF (10^{-6} M). Après dénaturation dans le tampon Laemmli 5X, les échantillons sont soumis à une SDS-PAGE de 10% (4×10^5 eq.cell/puit) puis analysés par Western blot en utilisant des anticorps anti-phospho-ERK1/2 et anti-phospho-p38 MAPK. Les membranes sont reblottées avec les anticorps anti-ERK1, anti-ERK2 et anti-p38 MAPK, utilisées comme contrôle de charge. Les rapports entre les bandes des phospho-ERK1/2 ou phospho-p38 MAPK et celles des ERK1/2 ou des p38 MAPK totales sont déterminés. Les valeurs sont une moyenne de 3 essais indépendants $\pm$ SEM.; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle stimulé par le fMLF et non traité par la TQ.

Dans le neutrophile stimulé par le fMLF, la p38 MAPK est impliquée, plutôt que ERK1/2, dans le processus d'exocytose des granules spécifiques et azurophiles (Mocsai *et al.*, 2000, Boussif *et al.*, 2016). Nos résultats montrant l'inhibition de la phosphorylation induite par le fMLF de cette kinase suggèrent que la TQ agit sur cette voie pour bloquer la libération des granules spécifiques et azurophiles en réponse au même stimulus (**Fig. 28 & 30**). Cependant, nous constatons que la concentration de TQ de 2,5 µg/ml qui a fortement inhibé l'exocytose des granules spécifiques et azurophiles (inhibition de 100% et 90% respectivement) n'a réussi qu'à réduire à environ 58% la phosphorylation de p38 MAPK. Ceci implique que l'inhibition de l'activation de la p38 MAPK ne serait pas le seul mécanisme exercé par la TQ pour atténuer la dégranulation induite par le fMLF.

L'augmentation des concentrations du Ca^{2+} intracellulaire, qui est un événement primordial à l'exocytose des granules primaires et secondaires du neutrophile (Sengelov *et al.*, 1993 ; Lacy, 2006), est une cible invraisemblable de la TQ. Comme le montre la **figure 33**, le fMLF induit une augmentation nette et transitoire du calcium intracellulaire (**Fig. 33A**). De manière surprenante, la TQ seule induit une augmentation lente mais significative du calcium intracellulaire qui est masquée par l'augmentation induite par le fMLF (**Fig. 33B**). La présence de la TQ augmente davantage les taux du Ca^{2+} intracellulaire induite par le fMLF, mais le pic est moins distinct dû à l'effet propre à la TQ. Il paraît donc que la TQ soit incapable d'inhiber l'élévation induite par le fMLF du calcium intracellulaire, et qu'elle induit plutôt une augmentation du Ca^{2+} en l'absence de stimulation.

Le PMA induit la libération des granules spécifiques du neutrophile, mais pas celle des granules azurophiles (Herrero-Turrión *et al.*, 2008). La sécrétion des granules spécifiques utilise en effet des voies dépendantes de la PKC, alors que l'exocytose des granules azurophiles utilise des voies PKC-indépendantes impliquant principalement Rac2 (Abdel-Latif *et al.*, 2005). En s'appuyant sur ces faits, nous suggérons que la TQ inhiberait la libération des granules spécifiques en bloquant les voies des p38 MAPK et PKC. Quant à l'inhibition de la libération des granules azurophiles, en plus du blocage de la voie p38 MAPK, la TQ utiliserait un autre mécanisme qui reste à déterminer.

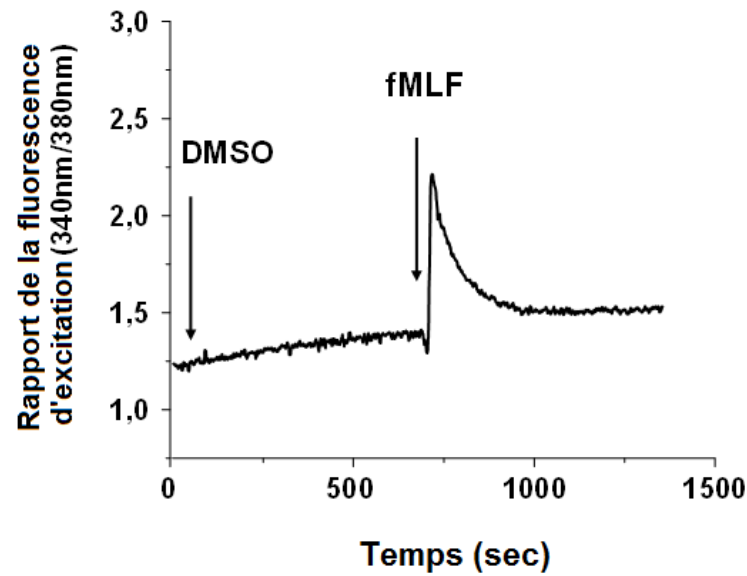
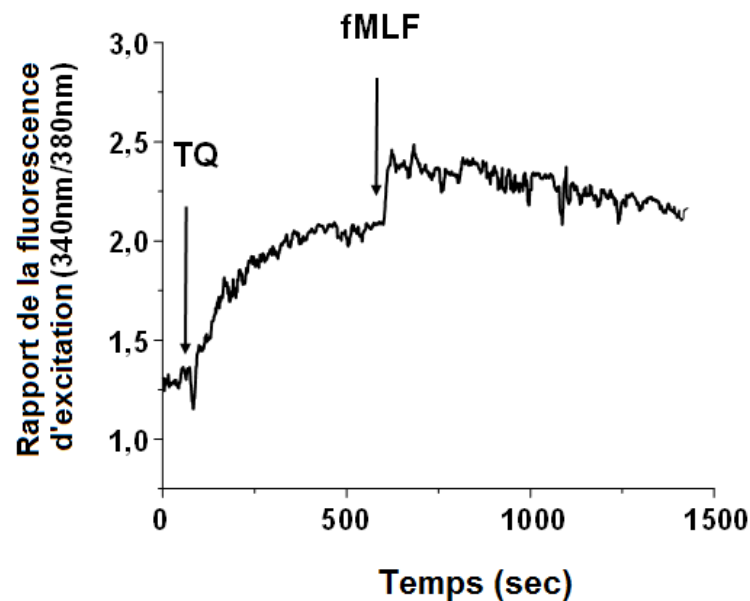
A**B**

Figure 33. Effet de la TQ sur les changements induits par le fMLF des taux du calcium intracellulaire.

Le calcium intracellulaire est mesuré par le Fura-2/AM. Les neutrophiles ($2,5 \times 10^6/\text{ml}$ de HBSS) sont incubés avec $5 \mu\text{M}$ de Fura-2/AM pendant 45 min à 37°C avant d'être lavés dans du HBSS. Les changements des taux du Ca^{2+} intracellulaire induits par le fMLF (10^{-6}M) sont ensuite suivis en absence (A) et en présence (B) de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de TQ. La fluorescence est mesurée par un Fluorimètre à double longueur d'onde d'excitation à 340 et 380nm pour l'excitation et à 510nm pour l'émission. Les figures sont une représentation de 3 essais.

III.9. Effet de la TQ sur la pleurésie induite chez le rat

La pleurésie induite par la carraghénine est un modèle d'inflammation expérimentale caractérisée par une infiltration massive des PMN et des dommages des poumons induits par les FRO (Cuzzocrea *et al.*, 2000; Moore, 2003). Ce modèle est largement utilisé pour l'étude de la physiopathologie de l'inflammation aigüe et l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de diverses substances. Dans ce modèle expérimental, l'IL-6 contribue à l'extension de l'inflammation en augmentant la formation d'autres cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-1) qui, à leur tour, augmentent le recrutement des neutrophiles. En outre, l'inflammation pleurale induite par la carraghénine est accompagnée par une augmentation IL-6-dépendante de l'expression et de l'activité de COX-2 avec une élévation des taux du LTB4 qui pourrait aussi contribuer au recrutement des PMN (Cuzzocrea *et al.*, 1999).

La présente étude est la première à évaluer l'activité anti-inflammatoire de la TQ dans ce modèle. Les rats ont été traités par 10 et 50 mg/kg de TQ avant l'induction de l'inflammation par injection de la λ - carraghénine. Les résultats présentés dans la **figure 34** montrent que la TQ réduit significativement l'inflammation pleurale d'une manière dépendante de la concentration, comme le montre la diminution du nombre des PMN recrutés dans la cavité pleurale.

La capacité de la TQ à inhiber l'accumulation des PMN et d'autres leucocytes a été démontrée dans des modèles murins d'asthme allergique (Ammar *et al.*, 2011), de gastrite induite par ischémie/reperfusion (Magdy *et al.*, 2012) et d'arthrite rhumatoïde induite par le collagène (Umar *et al.*, 2012). Dans ces modèles et dans d'autres, les propriétés anti-inflammatoires de la TQ ont été associées à sa capacité antioxydante (Mahgoub, 2003; Vaillancourt *et al.*, 2011; Magdy *et al.*, 2012; Umar *et al.*, 2012). D'autres mécanismes sous-jacents à l'activité anti-inflammatoire de la TQ ont été également proposés. Ces mécanismes incluent la diminution de la production des leucotriènes et l'inhibition des cyclooxygénases et lipooxygénases leucocytaires (Houghton *et al.*, 1995; El-Dakhakhny *et al.*, 2002; Mansour et Tornhamre, 2004, El Gazzar *et al.*, 2006b), mais aussi la réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF α (Tekeoglu *et al.*, 2007; Vaillancourt *et al.*, 2011; Umar *et al.*, 2012).

En plus des mécanismes cités ci-haut, les résultats obtenus dans notre étude suggèrent que l'inhibition des fonctions du neutrophile (génération des FRO et dégranulation) contribuerait à l'effet anti-inflammatoire de la TQ. En effet, la production excessive et l'accumulation des FRO, qui sont des molécules hautement instables et réactives, dans le foyer

inflammatoire induit des lésions oxydatives endommageant les lipides, les protéines et l'ADN (Schieber et Chandel, 2014). D'autre part, les FRO générés par le neutrophile peuvent activer des facteurs de transcription redox-sensibles comme le facteur NF- κ B qui contrôle l'expression des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires, conduisant ainsi à l'amplification du recrutement des PMN et de la sévérité de la réponse inflammatoire (Gloire *et al.*, 2006 ; Hayden *et al.*, 2006). Parallèlement, l'exocytose des granules azurophiles et spécifiques des PMN résulte en la libération des enzymes protéolytiques et de la MPO qui, avec les FRO, contribuent aux dommages tissulaires dans le site de l'inflammation.

En plus de l'inhibition des lésions tissulaires dues aux FRO et aux enzymes granulaires libérées dans le milieu extracellulaire, la TQ pourrait également altérer la migration et le recrutement des neutrophiles au foyer inflammatoire en inhibant la libération des granules spécifiques. Ces granules contiennent des métalloprotéinases qui, une fois libérées à l'extérieure de la cellule, dégradent la matrice extracellulaire et génèrent des fragments de collagène à propriétés chimioattractante (Wolf et Friedl, 2011). L'exocytose des granules spécifiques entraîne, non seulement la libération d'enzymes lytiques dans l'espace extracellulaire, mais aussi l'enrichissement de la membrane cellulaire en divers récepteurs et molécules d'adhésion (CD11b/CD18, CD66 et CD67) nécessaires à la migration des PMN et à leur recrutement au site de l'inflammation (Borregaard et Cowland, 1997). L'inhibition de la libération de ces granules limiterait donc la capacité migratoire et le recrutement des neutrophiles au foyer inflammatoire et contribuerait à l'activité anti-inflammatoire de la TQ.

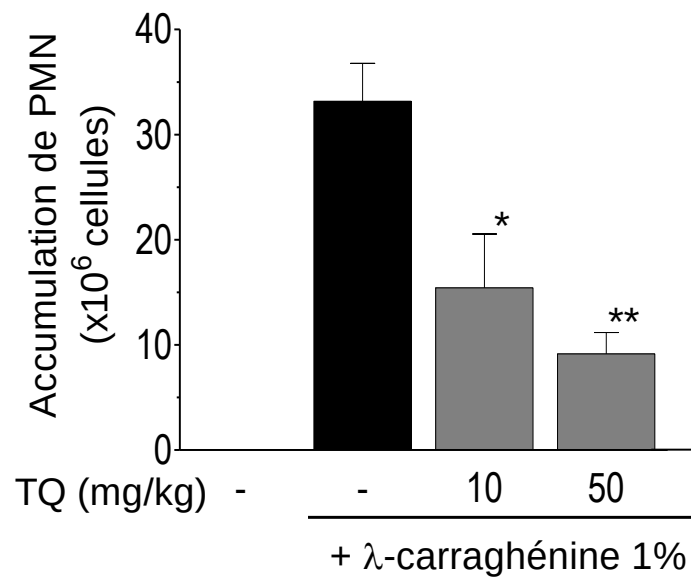


Figure 34. Effet de la TQ sur la pleurésie induite par la λ-carraghénine chez le rat

Des rats Albinos Wistar sont traités ou pas par injection intrapéritonéale de TQ une heure avant l'induction de l'inflammation pleurale par 1% de λ-carraghénine. Après 4 heures, l'exsudat est récupéré de la cavité pleurale et les neutrophiles sont comptés dans un hémocytomètre Malassez. Chaque valeur est obtenue de 6 rats et est exprimée en moyenne $\pm$ SEM. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$. Comparaisons effectuées par rapport au contrôle non-traité par la TQ.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Nigella sativa est l'une des plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle dans la région méditerranéenne et en Asie occidentale (El-Dakhakhny, 1963; Gali-Muhtasib *et al.*, 2006b). Depuis quelques années, notre laboratoire s'intéresse à l'étude des activités biologiques de la nigelle. Nous avons montré que les extraits des graines de la nigelle, en particulier l'huile de la nigelle, possèdent des propriétés antioxydantes et antidiabétiques intéressantes (Houcher *et al.*, 2007 ; Boudiaf *et al.*, 2010 ; Sobhi *et al.*, 2011 ; Meziti *et al.*, 2012 ; Mosbah *et al.*, 2015). Deux travaux de recherche se consacrant à l'effet de différents composants des graines de la nigelle sur la toxicité induite par le CCL4 et l'arthrite rhumatoïde induite par le collagène chez le rat sont en cours de réalisation.

Le travail de thèse ci présenté s'intéresse à la thymoquinone, le composant actif le plus abondant de l'huile volatile des graines de *Nigella sativa* (Burits et Bucar, 2000) auquel les activités biologiques de la plante sont souvent attribuées (Ahmad *et al.*, 2013).

Il a été démontré que la TQ exerce des effets anti-inflammatoires et antioxydants et détient de ce fait un potentiel thérapeutique intéressant (Woo *et al.*, 2012 ; Darakhshan *et al.*, 2015). Toutefois, ses effets sur les neutrophiles, les premières cellules à rejoindre le foyer inflammatoire, ainsi que ses mécanismes d'action restent à élucider. Le présent travail est le premier à examiner l'effet de la TQ sur les fonctions du neutrophile humain, notamment sur la production des FRO par le complexe NADPH oxydase et sur la dégranulation.

Les neutrophiles jouent un rôle majeur dans l'élimination des agents pathogènes. Cette fonction de défense innée nécessite une coordination fine de deux activités majeures ; la production de formes réactives de l'oxygène via la génération d'anion superoxyde par la NADPH oxydase (explosion oxydative) et la libération du contenu stocké dans les granules intracellulaires du neutrophile (dégranulation). La production excessive des FRO par la NADPH oxydase du neutrophile est associée à différentes pathologies inflammatoires, faisant de l'activité de ce complexe enzymatique une cible thérapeutique privilégiée. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'inhibiteurs de la NADPH oxydase phagocytaire en thérapie, souvent par manque de spécificité, de compréhension de leur mécanisme d'action ou parce qu'ils ne remplissent pas les critères de sécurité. La complexité de la recherche sur les inhibiteurs de la NADPH oxydase découle de sa structure multi-protéique qui fait intervenir de multiples interactions protéines-protéines et protéines-lipides, compliquant la détermination des cibles atteintes par les inhibiteurs. De plus, l'enzyme peut être activée suivant différents stimuli et

différentes voies qui peuvent aussi être considérés comme des cibles thérapeutiques (Kim *et al.*, 2011).

Dans la présente étude, nous avons montré que la TQ inhibe fortement la production du $O_2^{\cdot -}$ par le neutrophile humain en réponse à trois stimuli différents (fMLF, PMA et ZOP), sans que les effets observés soient dus à un effet cytotoxique vis-à-vis des neutrophiles, ou scavenger de l'anion superoxyde. La question suivante était de savoir si la TQ affecte ou pas l'activité enzymatique de la NADPH oxydase. Après préassemblage du complexe NADPH oxydase, et sa préparation à partir des membranes de PMN humains stimulés, nous avons évalué son activité enzymatique, dans un système acellulaire, en présence et en absence de la TQ. Les résultats obtenus (**Fig. 23.B**) montrent clairement que la TQ n'affecte pas directement l'activité catalytique de la NADPH oxydase. L'incapacité de la TQ à réduire la production du $O_2^{\cdot -}$ par la NADPH oxydase dans ce système confirme son inaptitude de piéger le superoxyde.

Il a été rapporté que la TQ réagit lentement avec le NADPH dans une réaction spontanée (Khalife et Lupidi, 2007). Il y a donc une possibilité que la TQ inhiberait l'activité NADPH oxydase du neutrophile en depletant son substrat, le NADPH. Or, cette réaction se produit très lentement après plusieurs heures (Khalife et Lupidi, 2007), tandis que l'effet inhibiteur obtenue dans la présente étude survient très rapidement après quelques minutes d'incubation avec la TQ rendant cette cause d'inhibition de la NADPH oxydase invraisemblable. En plus, le fait que la TQ n'a exercé aucun effet sur la NADPH oxydase préassemblé dans le système acellulaire, en présence de NADPH exogène ajouté au milieu réactionnel, supporte cette opinion. Pour toutes ces raisons, nous concluons que la TQ n'inhibe pas directement l'activité catalytique de la NADPH oxydase, mais agit plutôt en interférant avec le processus d'activation de ce complexe enzymatique.

En effet, les résultats obtenus dans ce travail montrent que la TQ bloque un des évènements clés de l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire qu'est la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$, sur les sérines 304 et 328 dont la phosphorylation est particulièrement importante pour l'activité de l'oxydase (Ago *et al.*, 1999 et 2003). Etant donné que ces deux sérines sont localisées dans une séquence consensus de phosphorylation des PKC (El Benna *et al.*, 1994), nous avons analysé l'influence de l'administration de la TQ sur la phosphorylation de la PKC induite par le fMLF. Comme prévu, les résultats obtenus montrent que la TQ inhibe la phosphorylation d'au moins deux isoformes de PKC, quoique leur identité reste à déterminer. Ceci nous a permis de conclure que, dans le neutrophile stimulé par le fMLF, la TQ prévient

l'activation de la NADPH oxydase en bloquant la phosphorylation PKC-dépendante de la p47^{PHOX}, au moins sur les Sérines 304 et 328.

L'inhibition de la phosphorylation de la PKC et de la p47^{PHOX} est observée à des concentrations supérieures à celles qui entravent la production du O₂⁻, suggérant l'implication d'autres mécanismes dans l'effet inhibiteur de la TQ sur la production du O₂⁻ en réponse au fMLF. Comme l'activation du complexe NADPH oxydase implique, en plus de la phosphorylation des composantes cytosoliques de l'oxydase, leur translocation vers la membrane, nous avons évalué l'effet de la TQ sur la translocation de la p47^{PHOX}, la p67^{PHOX} et Rac2, cette dernière qui migre indépendamment des autres composantes cytosoliques et est capable d'activer *in vitro* la NADPH oxydase même en l'absence de la p47^{PHOX} (Gorzalczany *et al.*, 2000). L'activation de Rac2 ne semble point être affectée par la TQ, qui n'a pas empêché sa translocation, avec les autres composantes cytosoliques, à la membrane. Nous avons en revanche constaté que la TQ est capable d'inhiber l'exocytose, induite par le fMLF, des granules spécifiques, ce qui est traduit par une diminution de l'expression membranaire de la gp91^{PHOX} et du CD11b. La diminution de la mobilisation de la gp91^{PHOX} à la surface cellulaire pourrait affecter l'assemblage de la NADPH oxydase à la surface cellulaire. Par conséquent, l'effet inhibiteur puissant de la TQ vis-à-vis de la production du O₂⁻ résulterait d'un effet synergique de la TQ sur les deux processus ; phosphorylation de la p47^{PHOX} par la PKC et la mobilisation de la gp91^{PHOX} à la surface cellulaire.

Le PMA est un activateur direct des PKC. Etant donné que les résultats obtenus dans la présente étude montrent que la TQ cible les PKC, il était attendu à ce que la TQ bloque toutes les réponses induites par le PMA. Or, seule la production du O₂⁻ est clairement inhibée par la TQ en réponse au PMA alors que la dégranulation ne l'est pas. Ces observations reflèteraient un effet différentiel de la TQ sur les différentes isoformes de la PKC, ou encore un effet sur une voie induite par le PMA, autre que les PKC, qui reste à caractériser.

La p38MAPK et les ERK1/2, bien que moins impliquées que les PKC, jouent un rôle dans l'activation de la NADPH oxydase des neutrophiles. Les données de la littérature montrent que ces kinases sont impliquées dans le priming de l'explosion oxydative (McLeish *et al.*, 1998) mais aussi dans l'activation de la NADPH oxydase (El Benna *et al.*, 1996b; Krump *et al.*, 1997) et la production des FRO. En effet, deux inhibiteurs spécifiques des p38 MAPK et MEK (SB 203580 et PD98059 respectivement) inhibent la production d'anions superoxydes par les neutrophiles humains en réponse au fMLF et au PMA (Torres *et al.*, 1993; Worthen *et al.*, 1994 ; El Benna *et al.*, 1996b; Nick *et al.*, 1997). L'équipe d'accueil a montré que ERK1/2

jouent un rôle prédominant dans la phosphorylation de la p47^{PHOX} lorsque les PMN sont activés par le fMLF (Dewas *et al.*, 2000) et que ERK1/2 et p38 MAPK sont aussi impliquées dans la phosphorylation de la p67^{PHOX} (Dang *et al.*, 2003). Nous avons montré dans le présent travail que la TQ inhibe la phosphorylation de ces deux MAPK, il y a donc une possibilité que cet effet contribue à la forte inhibition la TQ observée sur la production d'anions superoxydes par le neutrophile en réponse au fMLF.

La dégranulation induite par le fMLF dans les neutrophile est une autre réponse régulée par les MAP Kinases, en particulier la p38 MAPK (Mocsai *et al.*, 2000). Comme discuté plus haut, la TQ a été en mesure d'inhiber l'exocytose des granules spécifiques ce qui contribuerait à l'inhibition de la production d'anions superoxydes par le neutrophile en réponse au fMLF. Nous avons aussi constaté que cette inhibition est en corrélation avec la diminution de la phosphorylation de la p38 MAPK sous l'influence de la TQ. Etant donné que la TQ n'inhibe pas l'augmentation du calcium intracellulaire induite par le fMLF, son effet sur l'exocytose des granules spécifiques du neutrophile en réponse au fMLF serait par blocage principalement de l'activation de la p38 MAPK et secondairement de la voie des PKC.

Comme pour les granules spécifiques, la TQ inhibe significativement la libération des granules azurophiles induite par le fMLF. En plus de la MPO, les granules azurophiles contiennent trois sérine-protéases microbicides ; la protéinase-3, la cathepsine G et l'élastase (Borregard *et al.*, 2007). Malgré la fonction antimicrobienne de ces molécules, leur libération dans l'espace extracellulaire prolonge la réponse inflammatoire aigüe conduisant au développement de divers désordres inflammatoires (Kobayashi *et al.*, 2005). Par exemple, la MPO libérée par les neutrophiles est impliquée dans l'athérogénèse ainsi que dans l'initiation et la propagation des maladies cardiovasculaires (Nussbaum *et al.*, 2012). Les sérines protéases du neutrophile contribuent aux dommages tissulaires et à la pathogénèse d'un nombre de pathologie respiratoires comme le syndrome de détresse respiratoire aigüe, l'emphysème pulmonaire et la fibrose cystique (Hirsch *et al.*, 2004). Par sa capacité d'inhiber la production des FRO et la libération du contenu des granules du neutrophile dans le milieu extracellulaire, la TQ empêcherait non seulement les dommages oxydatifs des cellules et tissus environnants mais aussi leur dégradation par les enzymes granulaires.

Nous avons finalement montré qu'en plus de l'inhibition des fonctions du neutrophile *in vitro*, la TQ inhibe l'inflammation pleurale induite par la λ -carraghénine *in vivo*. Dans ce modèle d'inflammation aigüe, la TQ a considérablement réduit le nombre de neutrophiles accumulés dans la cavité pleurale des animaux traités par rapport au contrôle. L'IL-6, une

cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle important dans le développement de la pleurésie induite par la λ -carraghénine chez le rat (Cuzzocrea *et al.*, 1999) serait une cible potentielle de la TQ qui a réussi à réduire les taux de cette cytokine dans d'autres modèles inflammatoires (Umar *et al.*, 2012). Le travail ci-présenté propose un nouveau mécanisme anti-inflammatoire de la TQ par inhibition des fonctions du neutrophile (production des FRO et dégranulation) dont le dérèglement engendrerait des conséquences pathologiques graves. A cet égard, la TQ détient un potentiel anti-inflammatoire polyvalent faisant d'elle une alternative naturelle intéressante des thérapies anti-inflammatoires actuelles.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La TQ, la composante active majoritaire de l'huile essentielle de *N. sativa*, a été largement étudiée au fil des années, et ce depuis son isolement en 1965. Malgré le nombre considérable de recherches publiées, la littérature ne rapporte aucune donnée sur les effets de la TQ sur les fonctions effectrices du neutrophile humain. Dans le but d'éclaircir cet aspect jusqu'à maintenant non exploré, nous avons examiné les effets de la TQ sur deux fonctions principales du neutrophile humain ; l'explosion oxydative et la dégranulation. A l'issue de cette étude, nous avons pu démontrer que la TQ est capable d'inhiber efficacement la production d'anion superoxyde par la NADPH oxydase, ainsi que l'exocytose des granules spécifiques et azurophiles. Ces observations ont une signification thérapeutique importante, supportée par les résultats de l'étude *in vivo* où la TQ a réussi à réduire efficacement le recrutement des neutrophiles dans le modèle d'inflammation pleurale aigüe induite chez le rat. Nous avons pu également mettre en lumière quelques mécanismes empruntés par la TQ pour exercer ces activités. Dans ce qui suit les conclusions les plus importantes tirées de cette étude :

1. La TQ inhibe fortement les fonctions du neutrophile *in vitro*, notamment la production des formes réactives de l'oxygène et la dégranulation ;
2. La TQ n'exerce aucun effet sur l'activité catalytique de la NADPH oxydase, et interfèrerait plutôt avec le processus d'activation de ce complexe enzymatique ;
3. Les mécanismes pivotant l'inhibition de l'activation de la NADPH oxydase par la TQ impliqueraient :
 - a) L'inhibition de la phosphorylation PKC-dépendante de la p47^{PHOX} sur les sérines 304 et 328 ;
 - b) L'inhibition de l'expression à la surface cellulaire de la gp91^{PHOX} par diminution de l'exocytose des granules spécifiques ;
 - c) L'inhibition de la phosphorylation des MAP Kinases, ERK1/2 et p38 MAPK.
4. La TQ inhiberait l'exocytose, induite par le fMLF, des granules du neutrophile humain principalement par inhibition des voies p38 MAPK ;
5. La TQ exerce des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et inhibe l'accumulation des neutrophiles dans la cavité pleurale dans un modèle de pleurésie induite par la λ -carraghénine chez le rat. Les mécanismes proposés de cette activité incluraient :

- a) L'inhibition de la production des FRO par le neutrophile ;
- b) L'inhibition de la libération des granules azurophiles et des granules spécifiques.

Le présent travail a rapporté de nouvelles données concernant les propriétés anti-inflammatoires de la TQ et ses mécanismes d'action. Néanmoins, plusieurs aspects nécessitent d'être éclaircis davantage. Les principales perspectives de recherche qui apparaissent à l'issue de cette thèse se résument dans les points suivants :

1. Examiner l'effet de la TQ sur les autres sites de phosphorylation de p47^{PHOX} (ser315, 320, 359 etc...).
2. Etudier d'autres voies de signalisation (ex. PLC, PI3K....) afin de mieux caractériser les mécanismes empruntés par la TQ dans l'inhibition de l'activation de la NADPH oxydase du neutrophile ;
3. Etudier de l'effet de la TQ sur d'autres fonctions du neutrophile, notamment le chimiotactisme ;
4. Etudier les mécanismes de l'activité anti-inflammatoire de la TQ *in vivo*, sur le modèle expérimental de pleurésie induite par la λ -carraghénine chez le rat (mesurer l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles isolés des rats traités et non traités par la TQ, analyser la phosphorylation de la p47^{PHOX}... etc.).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2012). *Cellular and Molecular Immunology*. 7th edn. Elsevier/Saunders.
- Abdel-Latif D, Steward M, Lacy P (2005). Neutrophil primary granule release and maximal superoxide generation depend on Rac2 in a common signalling pathway. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. **83**(1): 69-75.
- Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ (2010). Effects of Nigella sativa and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes*. **2**(4): 256-266.
- Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW (1994). Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *The Biochemical journal*. **298 Pt 3**: 585-591.
- Aboutabl EA, El-Azzouny, A. A., Hammerschmidt, F. J. (1986). Aroma volatiles of Nigella sativa L. seeds. In: "Brunke EJ (ed). *Progress in essential oil research. Proceedings of the 16th International Symposium on essential oils*". Berlin: DeGruyer. Pp: 49–55.
- Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, *et al.* (2003). Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**(8): 4474-4479.
- Ago T, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H (1999). Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *The Journal of biological chemistry*. **274**(47): 33644-33653.
- Agwu DE, McPhail LC, Chabot MC, Daniel LW, Wykle RL, McCall CE (1989). Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. **264**(3): 1405-1413.
- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, *et al.* (2013). A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. **3**(5): 337-352.
- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*. **20**(2): 25-27.
- Al-Amri AM, Bambosa AO (2009). Phase I Safety and Clinical Activity Study of Thymoquinone in Patients with Advanced Refractory Malignant Disease. *Shiraz E Medical Journal*. **10**(3): 107-111.
- Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, Ansari S (2013). Anti-inflammatory effect of seeds and callus of Nigella sativa L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. *AAPS PharmSciTech*. **14**(1): 160-167.
- Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS (2011). The protective effect of thymoquinone against sepsis syndrome morbidity and mortality in mice. *International immunopharmacology*. **11**(2): 250-254.
- Amin B, Hosseinzadeh H (2016). Black Cumin (Nigella sativa) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects. *Planta medica*. **82**(1-2): 8-16.
- Ammar E-SM, Gameil NM, Shawky NM, Nader MA (2011). Comparative evaluation of anti-inflammatory properties of thymoquinone and curcumin using an asthmatic murine model. *International immunopharmacology*. **11**(12): 2232-2236.

- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology*. **30**: 459-489.
- Ariel A, Fredman G, Sun YP, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, *et al.* (2006). Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nature immunology*. **7**(11): 1209-1216.
- Ashraf M, Ali Q, Iqbal Z (2006). Effect of nitrogen application rate on the content and composition of oil, essential oil and minerals in black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**(6): 871-876.
- Atta-ur-Rahman, Malik S, Cun-heng H, Clardy J (1985). Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *nigella sativa*. *Tetrahedron Letters*. **26**(23): 2759-2762.
- Atta-ur-Rahman, Malik S, Hasan SS, Choudhary MI, Ni C-Z, Clardy J (1995). Nigellidine — A new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Letters*. **36**(12): 1993-1996.
- Attoub S, Sperandio O, Raza H, Arafat K, Al-Salam S, Al Sultan MA, *et al.* (2013). Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundamental & clinical pharmacology*. **27**(5): 557-569.
- Babior BM (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*. **93**(5): 1464-1476.
- Babior BM (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*. **109**(1): 33-44.
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical investigation*. **52**(3): 741-744.
- Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*. **397**(2): 342-344.
- Badary OA, Gamal El-Din AM (2001). Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer detection and prevention*. **25**(4): 362-368.
- Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*. **26**(2): 87-98.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS letters*. **307**(1): 97-101.
- Bainton DF, Miller LJ, Kishimoto TK, Springer TA (1987). Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *The Journal of experimental medicine*. **166**(6): 1641-1653.
- Barton GM (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*. **118**(2): 413-420.
- Bauldry SA, Wykle RL, Bass DA (1991). Differential actions of diacyl- and alkylacylglycerols in priming phospholipase A2, 5-lipoxygenase and acetyltransferase activation in human neutrophils. *Biochimica et biophysica acta*. **1084**(2): 178-184.
- Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA (2010). Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *European journal of immunology*. **40**(9): 2360-2368.
- Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guermontprez P, *et al.* (2007). Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood*. **110**(8): 2965-2973.
- Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. **87**(1): 245-313.

- Belambri SA (2014) Etude du mécanisme d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire : Analyse de la dynamique de phosphorylation de la p47phox dans le neutrophile activé. Thèse de Doctorat en Biochimie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif, Algérie. 132p.
- Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et biophysica acta*. **1121**(1-2): 130-136.
- Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, *et al.* (2004). TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *The Journal of immunology*. **173**(12): 7406-7415.
- Bengis-Garber C, Gruener N (1996). Protein kinase A downregulates the phosphorylation of p47 phox in human neutrophils: a possible pathway for inhibition of the respiratory burst. *Cellular signalling*. **8**(4): 291-296.
- Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY (2003). Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *The Journal of immunology*. **171**(11): 6052-6058.
- Berton G, Fumagalli L, Laudanna C, Sorio C (1994). Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils. *The Journal of cell biology*. **126**(4): 1111-1121.
- Berton G, Lowell CA (1999). Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cellular signalling*. **11**(9): 621-635.
- Bertram A, Ley K (2011). Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. **59**(2): 79-87.
- Bey EA, Xu B, Bhattacharjee A, Oldfield CM, Zhao X, Li Q, *et al.* (2004). Protein kinase C delta is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human monocytes. *The Journal of immunology*. **173**(9): 5730-5738.
- Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinanuer MC (2001). Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *The Journal of biological chemistry*. **276**(33): 31105-31112.
- Bokoch GM (1994). Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Current opinion in cell biology*. **6**(2): 212-218.
- Bokoch GM, Bohl BP, Chuang TH (1994). Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*. **269**(50): 31674-31679.
- Bokoch GM, Diebold BA (2002). Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*. **100**(8): 2692-2696.
- Bokoch GM, Zhao T (2006). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxidants & redox signaling*. **8**(9-10): 1533-1548.
- Borregaard N (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. **33**(5): 657-670.
- Borregaard N, Cowland JB (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. **89**(10): 3503-3521.
- Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA (1983). Subcellular localization of the b-cytochrome Component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *The Journal of cell biology*. **97**(1): 52-61.
- Borregaard N, Herlin T (1982). Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *The Journal of clinical investigation*. **70**(3): 550-557.
- Borregaard N, Kjeldsen L, Rygaard K, Bastholm L, Nielsen MH, Sengelov H, *et al.* (1992). Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. **90**(1): 86-96.

- Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, *et al.* (1993). Human neutrophil granules and secretory vesicles. *European journal of haematology*. **51**(4): 187-198.
- Borregaard N, Sehested M, Nielsen BS, Sengelov H, Kjeldsen L (1995). Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood*. **85**(3): 812-817.
- Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in immunology*. **28**(8): 340-345.
- Borregaard N, Tauber AI (1984). Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. b-Cytochrome and associated flavoprotein. *The Journal of biological chemistry*. **259**(1): 47-52.
- Boudiaf K, Houcher Z, Sobhi W, Benboubetra M (2010). Evaluation of antioxidant and anti-Xanthine oxidoreductase activities of *Nigella sativa* Linn seeds' extracts. *Journal of Applied Biological Sciences*. **4**(1): 7-16.
- Bouin AP, Grandvaux N, Vignais PV, Fuchs A (1998). p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *The Journal of biological chemistry*. **273**(46): 30097-30103.
- Bourgoin S, Plante E, Gaudry M, Naccache PH, Borgeat P, Poubelle PE (1990). Involvement of a phospholipase D in the mechanism of action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): priming of human neutrophils in vitro with GM-CSF is associated with accumulation of phosphatidic acid and diradylglycerol. *The Journal of experimental medicine*. **172**(3): 767-777.
- Bourke E, Casseti A, Villa A, Fadlon E, Colotta F, Mantovani A (2003). IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils. *The Journal of immunology*. **170**(12): 5999-6005.
- Boussetta T, Gougerot-Pocidalo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, *et al.* (2010). The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*. **116**(26): 5795-5802.
- Bradford PG, Rubin RP (1986). Quantitative changes in inositol 1,4,5-trisphosphate in chemoattractant-stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. **261**(33): 15644-15647.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, *et al.* (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. **303**(5663): 1532-1535.
- Brinkmann V, Zychlinsky A (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews. Microbiology*. **5**(8): 577-582.
- Brown GE, Stewart MQ, Liu H, Ha VL, Yaffe MB (2003). A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Molecular cell*. **11**(1): 35-47.
- Burits M, Bucar F (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research : PTR*. **14**(5): 323-328.
- Butt MS, Sultan MT (2010). *Nigella sativa*: Reduces the Risk of Various Maladies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **50**(7): 654-665.
- Bylund J, Bjornsdottir H, Sundqvist M, Karlsson A, Dahlgren C (2014). Measurement of respiratory burst products, released or retained, during activation of professional phagocytes. *Methods Mol Biol*. **1124**: 321-338.
- Bystrom J, Evans I, Newson J, Stables M, Toor I, van Rooijen N, *et al.* (2008). Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*. **112**(10): 4117-4127.

- Cadwallader KA, Condliffe AM, McGregor A, Walker TR, White JF, Stephens LR, *et al.* (2002). Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation by neutrophil priming agents. *The Journal of immunology*. **169**(6): 3336-3344.
- Campanelli D, Detmers PA, Nathan CF, Gabay JE (1990). Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *The Journal of clinical investigation*. **85**(3): 904-915.
- Campbell MS, Lovell MA, Gorbsky GJ (1995). Stability of nuclear segments in human neutrophils and evidence against a role for microfilaments or microtubules in their genesis during differentiation of HL60 myelocytes. *Journal of leukocyte biology*. **58**(6): 659-666.
- Carvalho LO, Aquino EN, Neves AC, Fontes W (2015). The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function. *Journal of cellular biochemistry*. **116**(9): 1831-1836.
- Cassatella MA (2010). Neutrophils II. In: "Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW (ed). *Fundamentals of Inflammation*". New York: Cambridge University Press. Pp: 49-64.
- Chapman ML, Rubin BR, Gracy RW (1989). Increased carbonyl content of proteins in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. **16**(1): 15-18.
- Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA (2009). Anti-inflammatory effects of the Nigella sativa seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. **11**(5): 373-381.
- Chen J, Tang H, Hay N, Xu J, Ye RD (2010). Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions. *Blood*. **115**(21): 4237-4246.
- Chen K, Kirber MT, Xiao H, Yang Y, Keaney JF, Jr. (2008). Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *The Journal of cell biology*. **181**(7): 1129-1139.
- Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB, *et al.* (2003). Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *The Journal of immunology*. **170**(10): 5302-5308.
- Cheng N, He R, Tian J, Dinanuer MC, Ye RD (2007). A critical role of protein kinase C delta activation loop phosphorylation in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced phosphorylation of p47(phox) and rapid activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *The Journal of immunology*. **179**(11): 7720-7728.
- Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, *et al.* (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. **271**(6): 2935-2940.
- Chessa TA, Anderson KE, Hu Y, Xu Q, Rausch O, Stephens LR, *et al.* (2010). Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood*. **116**(26): 6027-6036.
- Chopra RN, Nayar, S. L., Chopra, I. C. (1956). *Glossary of Indian medicinal plants*. edn. CSIR: New Delhi.
- Chou WH, Choi DS, Zhang H, Mu D, McMahon T, Kharazia VN, *et al.* (2004). Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*. **114**(1): 49-56.
- Christenson K, Bjorkman L, Karlsson J, Sundqvist M, Movitz C, Speert DP, *et al.* (2011). In vivo-transmigrated human neutrophils are resistant to antiapoptotic stimulation. *Journal of leukocyte biology*. **90**(6): 1055-1063.
- Chuang FY, Sassaroli M, Unkeless JC (2000). Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *The Journal of immunology*. **164**(1): 350-360.

- Cremer D, Hausen BM, Schmalle HW (1987). Toward a rationalization of the sensitizing potency of substituted p-benzoquinones. Reaction of nucleophiles with p-benzoquinones. *Journal of Medicinal Chemistry*. **30**(9): 1678-1681.
- Cross AR (2000). p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *The Biochemical journal*. **349**(Pt 1): 113-117.
- Cross AR, Curnutte JT (1995). The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*. **270**(12): 6543-6548.
- Cross AR, Parkinson JF, Jones OT (1984). The superoxide-generating oxidase of leucocytes. NADPH-dependent reduction of flavin and cytochrome b in solubilized preparations. *The Biochemical journal*. **223**(2): 337-344.
- Cross AR, Rae J, Curnutte JT (1995). Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *The Journal of biological chemistry*. **270**(29): 17075-17077.
- Cross AR, Segal AW (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et biophysica acta*. **1657**(1): 1-22.
- Cuzzocrea S, Santagati S, Sautebin L, Mazzon E, Calabro G, Serraino I, *et al.* (2000). 17beta-estradiol antiinflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinology*. **141**(4): 1455-1463.
- Cuzzocrea S, Sautebin L, De Sarro G, Costantino G, Rombolà L, Mazzon E, *et al.* (1999). Role of IL-6 in the Pleurisy and Lung Injury Caused by Carrageenan. *The Journal of Immunology*. **163**(9): 5094-5104.
- Dahan I, Pick E (2012). Strategies for identifying synthetic peptides to act as inhibitors of NADPH oxidases, or "all that you did and did not want to know about Nox inhibitory peptides". *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **69**(14): 2283-2305.
- Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI (1986). Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of virology*. **60**(3): 1068-1074.
- Dana R, Malech HL, Levy R (1994). The requirement for phospholipase A2 for activation of the assembled NADPH oxidase in human neutrophils. *The Biochemical journal*. **297** (Pt 1): 217-223.
- Dang PM, Fontayne A, Hakim J, El Benna J, Perianin A (2001). Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *The Journal of immunology*. **166**(2): 1206-1213.
- Dang PM, Hakim J, Perianin A (1994). Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils. *FEBS letters*. **349**(3): 338-342.
- Dang PM, Morel F, Gougerot-Pocidalo MA, El Benna J (2003). Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry*. **42**(15): 4520-4526.
- Dang PM, Raad H, Derkawi RA, Boussetta T, Paclet MH, Belambri SA, *et al.* (2011). The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochemical pharmacology*. **82**(9): 1145-1152.
- Dang PM, Rais S, Hakim J, Perianin A (1995). Redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils stimulated by formyl peptides and phorbol myristate acetate. *Biochemical and biophysical research communications*. **212**(2): 664-672.

- Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, *et al.* (2006). A specific p47phox - serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation*. **116**(7): 2033-2043.
- Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological research*. **95-96**: 138-158.
- de Mendez I, Homayounpour N, Leto TL (1997). Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Molecular and cellular biology*. **17**(4): 2177-2185.
- DeCoursey TE, Ligeti E (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **62**(19-20): 2173-2193.
- Dekker LV, Leitges M, Altschuler G, Mistry N, McDermott A, Roes J, *et al.* (2000). Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *The Biochemical journal*. **347 Pt 1**: 285-289.
- DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM (2000). Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *The Journal of biological chemistry*. **275**(18): 13986-13993.
- Dergarabetian EM, Ghattass KI, El-Sitt SB, Al-Mismar RM, El-Baba CO, Itani WS, *et al.* (2013). Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS. *Front Biosci (Elite Ed)*. **5**: 706-719.
- Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J (2000). The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *The Journal of immunology*. **165**(9): 5238-5244.
- Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA (1996). Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood*. **88**(1): 146-157.
- Diebold BA, Bokoch GM (2001). Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nature immunology*. **2**(3): 211-215.
- Djerdjouri B, Lenoir M, Giroud JP, Perianin A (1999). Contribution of mitogen-activated protein kinase to stimulation of phospholipase D by the chemotactic peptide fMet-Leu-Phe in human neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications*. **264**(2): 371-375.
- Downey GP, Fukushima T, Fialkow L, Waddell TK (1995). Intracellular signaling in neutrophil priming and activation. *Seminars in cell biology*. **6**(6): 345-356.
- Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature immunology*. **7**(4): 344-353.
- Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. **82**(1): 47-95.
- Dusi S, Della Bianca V, Grzeskowiak M, Rossi F (1993). Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils. *The Biochemical journal*. **290 (Pt 1)**: 173-178.
- Dusi S, Rossi F (1993). Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox. *The Biochemical journal*. **296 (Pt 2)**: 367-371.
- Edwards SW (1994). *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. edn. Cambridge University Press.
- Efimov A, Schiefermeier N, Grigoriev I, Ohi R, Brown MC, Turner CE, *et al.* (2008). Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *Journal of cell science*. **121(Pt 2)**: 196-204.

- El Benna J, Dang PM, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J, *et al.* (1997). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *The Journal of biological chemistry*. **272**(27): 17204-17208.
- El Benna J, Faust LP, Babior BM (1994). The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *The Journal of biological chemistry*. **269**(38): 23431-23436.
- El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM (1996a). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. **271**(11): 6374-6378.
- El Benna J, Han J, Park JW, Schmid E, Ulevitch RJ, Babior BM (1996b). Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Archives of biochemistry and biophysics*. **334**(2): 395-400.
- El Benna J, Hayem G, Dang PM, Fay M, Chollet-Martin S, Elbim C, *et al.* (2002). NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy. *Inflammation*. **26**(6): 273-278.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC (2006a). Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International immunopharmacology*. **6**(7): 1135-1142.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC (2006b). Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1760**(7): 1088-1095.
- El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H (2006). Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunology letters*. **106**(1): 72-81.
- Elbarbry F, Ragheb A, Marfleet T, Shoker A (2012). Modulation of hepatic drug metabolizing enzymes by dietary doses of thymoquinone in female New Zealand White rabbits. *Phytotherapy research : PTR*. **26**(11): 1726-1730.
- El-Benna J, Dang PM (2007). Analysis of protein phosphorylation in human neutrophils. *Methods Mol Biol*. **412**: 85-96.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in immunopathology*. **30**(3): 279-289.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C (2005). Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. **53**(3): 199-206.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Braut-Boucher F (2009). p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Experimental & molecular medicine*. **41**(4): 217-225.
- El-Benna J, Dang PM, Perianin A (2010). Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochemical pharmacology*. **80**(6): 778-785.
- El-Dakhakhny M (1963). Studies on the chemical constitution of Egyptian *N. sativa* L. seeds. II) The essential oil. *Planta medica*. **11**: 465-470.
- El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lember N, Ammon HP (2002). Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of ethnopharmacology*. **81**(2): 161-164.

- Elferink JG (1984). Measurement of the metabolic burst in human neutrophils: a comparison between cytochrome C and NBT reduction. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. **43**(2): 339-342.
- Ellson CD, Gobert-Gosse S, Anderson KE, Davidson K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, *et al.* (2001). PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nature cell biology*. **3**(7): 679-682.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA (2005). Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *International journal of cancer*. **117**(3): 409-417.
- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T (2005). Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *International immunopharmacology*. **5**(1): 195-207.
- El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, *et al.* (2010). Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis*. **15**(2): 183-195.
- Elsbach P (1998). The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *Journal of leukocyte biology*. **64**(1): 14-18.
- Erickson RW, Langel-Peveri P, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, Curnutte JT (1999). Activation of human neutrophil NADPH oxidase by phosphatidic acid or diacylglycerol in a cell-free system. Activity of diacylglycerol is dependent on its conversion to phosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry*. **274**(32): 22243-22250.
- Esaguy N, Aguas AP, Vilanova M, Silva MT (1991). Activation of human neutrophils by phorbol ester decreases the cytoplasm compactness and the lactoferrin content of the granulocytes. *Journal of leukocyte biology*. **50**(5): 444-452.
- Ethuin F, Gerard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidallo MA, Jacob L, *et al.* (2004). Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **84**(10): 1363-1371.
- Fallman M, Gullberg M, Hellberg C, Andersson T (1992). Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. **267**(4): 2656-2663.
- Faurschou M, Borregaard N (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. **5**(14): 1317-1327.
- Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N (2002). Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochimica et biophysica acta*. **1591**(1-3): 29-35.
- Faust LR, el Benna J, Babior BM, Chanock SJ (1995). The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *The Journal of clinical investigation*. **96**(3): 1499-1505.
- Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, *et al.* (2010). Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *The Journal of immunology*. **185**(4): 2044-2050.
- Fletcher MP, Seligmann BE, Gallin JI (1982). Correlation of human neutrophil secretion, chemoattractant receptor mobilization, and enhanced functional capacity. *The Journal of immunology*. **128**(2): 941-948.

- Flodgaard H, Ostergaard E, Bayne S, Svendsen A, Thomsen J, Engels M, *et al.* (1991). Covalent structure of two novel neutrophil leucocyte-derived proteins of porcine and human origin. Neutrophil elastase homologues with strong monocyte and fibroblast chemotactic activities. *European journal of biochemistry / FEBS*. **197**(2): 535-547.
- Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J (2002). Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*. **41**(24): 7743-7750.
- Forbes LV, Truong O, Wientjes FB, Moss SJ, Segal AW (1999). The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67phox is Thr233. *The Biochemical journal*. **338** (Pt 1): 99-105.
- Forehand JR, Pabst MJ, Phillips WA, Johnston RB, Jr. (1989). Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *The Journal of clinical investigation*. **83**(1): 74-83.
- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of innate immunity*. **2**(3): 216-227.
- Fuchs A, Bouin AP, Rabilloud T, Vignais PV (1997). The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. **249**(2): 531-539.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, *et al.* (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*. **176**(2): 231-241.
- Fumagalli L, Zhang H, Baruzzi A, Lowell CA, Berton G (2007). The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *The Journal of immunology*. **178**(6): 3874-3885.
- Fuortes M, Jin WW, Nathan C (1993). Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology*. **120**(3): 777-784.
- Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, *et al.* (2004a). Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology*. **25**(4): 857-866.
- Gali-Muhtasib H, El-Najjar N, Schneider-Stock R (2006a). The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. In: "Mahmud THK, Arjumand A (ed). *Advances in Phytomedicine*", Vol. Volume 2: Elsevier. Pp: 133-153.
- Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, *et al.* (2008). Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. *Journal of cellular and molecular medicine*. **12**(1): 330-342.
- Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R (2006b). Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **38**(8): 1249-1253.
- Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA (2004b). Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-cancer drugs*. **15**(4): 389-399.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, *et al.* (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*. **76**(4): 1427-1435.
- Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist P, *et al.* (2001). Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nature medicine*. **7**(10): 1123-1127.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology*. **72**(11): 1493-1505.

- Gohari AR, Ostad SN, Moradi-Afrapoli F, Malmir M, Tavajohi S, Akbari H, *et al.* (2012). Evaluation of the cytotoxicity of *Satureja spicigera* and its main compounds. *The Scientific World Journal*. **2012**: 203861.
- Gorzalczany Y, Sigal N, Itan M, Lotan O, Pick E (2000). Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *The Journal of biological chemistry*. **275**(51): 40073-40081.
- Gougerot-Pocidalo MA (2012). The neutrophil and systemic inflammation. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. **79**(3): 209-211.
- Gougerot-Pocidalo MA, El Benna J, Dang PM, Elbim C (2007). Quand les polynucléaires neutrophiles attrapent les agents pathogènes dans leurs filets. *Med Sci (Paris)*. **23**(5): 464-465.
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K (2003). Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*. **113**(3): 343-355.
- Groemping Y, Rittinger K (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal*. **386**(Pt 3): 401-416.
- Grosso C, Figueiredo AC, Burillo J, Mainar AM, Urieta JS, Barroso JG, *et al.* (2010). Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Journal of separation science*. **33**(14): 2211-2218.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*. **260**(6): 3440-3450.
- Hallett MB, Lloyds D (1995). Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunology today*. **16**(6): 264-268.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. **92**(9): 3007-3017.
- Harper AM, Chaplin MF, Segal AW (1985). Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *The Biochemical journal*. **227**(3): 783-788.
- Hayashi F, Means TK, Luster AD (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. **102**(7): 2660-2669.
- Hayden MS, West AP, Ghosh S (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. **25**(51): 6758-6780.
- Hellberg C, Molony L, Zheng L, Andersson T (1996). Ca²⁺ signalling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P₃. *The Biochemical journal*. **317** (Pt 2): 403-409.
- Herrero-Turrión MJ, Calafat J, Janssen H, Fukuda M, Mollinedo F (2008). Rab27a Regulates Exocytosis of Tertiary and Specific Granules in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*. **181**(6): 3793-3803.
- Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT (1994). Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *The Journal of biological chemistry*. **269**(49): 30749-30752.
- Heyworth PG, Curnutte JT, Badwey JA (1999). Structure and Regulation of NADPH Oxidase of Phagocytic Leukocytes. Insights from Chronic Granulomatous Disease. In: "Serhan CN, Ward PA (ed). *Molecular and Cellular Basis of Inflammation*". New York Springer Science+Business Media Pp: 165-191.
- Hii CS, Ferrante A (2007). Regulation of the NADPH oxidase activity and anti-microbial function of neutrophils by arachidonic acid. *Archivum immunologiae et therapiæ experimentalis*. **55**(2): 99-110.

- Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, Younger JG, Olle EW, Gao H, *et al.* (2005). Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock*. **24**(1): 40-47.
- Hoffmann K, Sperling K, Olins AL, Olins DE (2007). The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid. *Chromosoma*. **116**(3): 227-235.
- Honbou K, Minakami R, Yuzawa S, Takeya R, Suzuki NN, Kamakura S, *et al.* (2007). Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *The EMBO journal*. **26**(4): 1176-1186.
- Houcher Z, Boudiaf K, Benboubetra M, Houcher B (2007). Effects of Methanolic Extract and Commercial Oil of *Nigella sativa* L. on Blood Glucose and Antioxidant Capacity in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Pteridines*. **18**: 8 -18.
- Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JR (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta medica*. **61**(1): 33-36.
- Huang ZH, Hii CS, Rathjen DA, Poulos A, Murray AW, Ferrante A (1997). N-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids stimulate translocation of protein kinase Calpha, -betaI, -betaII and -epsilon and enhance agonist-induced NADPH oxidase in macrophages. *The Biochemical journal*. **325 (Pt 2)**: 553-557.
- Hussain J, Bukhari N, Hussain H, Rehman NU, Hussain SM (2010). Chemical constituents of *Nepeta distans*. *Natural product communications*. **5**(11): 1785-1786.
- Inanami O, Johnson JL, McAdara JK, Benna JE, Faust LR, Newburger PE, *et al.* (1998). Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. *The Journal of biological chemistry*. **273**(16): 9539-9543.
- Ishitoya J, Yamakawa A, Takenawa T (1987). Translocation of diacylglycerol kinase in response to chemotactic peptide and phorbol ester in neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications*. **144**(2): 1025-1030.
- Ismail M, Al-Naqeeq G, Chan KW (2010). *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free radical biology & medicine*. **48**(5): 664-672.
- Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H (2010). Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. **29**: 87.
- Jesaitis AJ, Buescher ES, Harrison D, Quinn MT, Parkos CA, Livesey S, *et al.* (1990). Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *The Journal of clinical investigation*. **85**(3): 821-835.
- Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O, Babior BM (1998). Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *The Journal of biological chemistry*. **273**(52): 35147-35152.
- Joiner KA, Ganz T, Albert J, Rotrosen D (1989). The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. *The Journal of cell biology*. **109**(6 Pt 1): 2771-2782.
- Jrah Harzallah H, Kouidhi B, Flamini G, Bakhrouf A, Mahjoub T (2011). Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chemistry*. **129**(4): 1469-1474.
- Kacem R (2011). Effects of *Nigella* (*Nigella sativa* L.) Seed Extract on Human Neutrophil Elastase Activity. In: "Preedy VR, Watson, R. R., Patel, V. B. (ed). *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*". San Diego: Academic Press. Pp: 823-829.

- Kamen LA, Schlessinger J, Lowell CA (2011). Pyk2 is required for neutrophil degranulation and host defense responses to bacterial infection. *The Journal of immunology*. **186**(3): 1656-1665.
- Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, *et al.* (2001). The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nature cell biology*. **3**(7): 675-678.
- Kanter M (2008). Effects of Nigella sativa and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. *Neurochemical research*. **33**(1): 87-96.
- Kanter M (2009). Protective effects of thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Journal of molecular histology*. **40**(2): 107-115.
- Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H (2005). Gastroprotective activity of Nigella sativa L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World journal of gastroenterology*. **11**(42): 6662-6666.
- Karlsson A, Nixon JB, McPhail LC (2000). Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of leukocyte biology*. **67**(3): 396-404.
- Kawahara T, Lambeth JD (2007). Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes. *BMC evolutionary biology*. **7**: 178.
- Kent JD, Sergeant S, Burns DJ, McPhail LC (1996). Identification and regulation of protein kinase C-delta in human neutrophils. *The Journal of immunology*. **157**(10): 4641-4647.
- Khalife KH, Lupidi G (2007). Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. *Free radical research*. **41**(2): 153-161.
- Khalife KH, Lupidi G (2008). Reduction of hypervalent states of myoglobin and hemoglobin to their ferrous forms by thymoquinone: the role of GSH, NADH and NADPH. *Biochimica et biophysica acta*. **1780**(4): 627-637.
- Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, *et al.* (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine*. **5**(178): 178ra140.
- Kim C, Marchal CC, Penninger J, Dinanier MC (2003). The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *The Journal of immunology*. **171**(8): 4425-4430.
- Kim J-A, Neupane GP, Lee ES, Jeong BS, Park BC, Thapa P (2011). NADPH oxidase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. **21**(8): 1147-1158.
- Kinkade K, Streeter J, Miller FJ (2013). Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis. *International journal of molecular sciences*. **14**(8): 17017-17028.
- Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N (1993). Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood*. **82**(10): 3183-3191.
- Klebanoff SJ (1999). Myeloperoxidase. *Proceedings of the Association of American Physicians*. **111**(5): 383-389.
- Klebanoff SJ (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*. **77**(5): 598-625.
- Klebanoff SJ, Waltersdorff AM (1990). Prooxidant activity of transferrin and lactoferrin. *The Journal of experimental medicine*. **172**(5): 1293-1303.
- Kleinberg ME, Rotrosen D, Malech HL (1989). Asparagine-linked glycosylation of cytochrome b558 large subunit varies in different human phagocytic cells. *The Journal of immunology*. **143**(12): 4152-4157.

- Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, Goraca A (2012). The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Archivum immunologiae et therapeutiae experimentalis*. **60**(4): 277-294.
- Knaus UG, Morris S, Dong HJ, Chernoff J, Bokoch GM (1995). Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein--coupled receptors. *Science*. **269**(5221): 221-223.
- Knight JS, Luo W, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Subramanian V, *et al.* (2014). Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circulation research*. **114**(6): 947-956.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR (2005). Neutrophils in the innate immune response. *Archivum immunologiae et therapeutiae experimentalis*. **53**(6): 505-517.
- Kodama T, Hazeki K, Hazeki O, Okada T, Ui M (1999). Enhancement of chemotactic peptide-induced activation of phosphoinositide 3-kinase by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its relation to the cytokine-mediated priming of neutrophil superoxide-anion production. *The Biochemical journal*. **337** (Pt 2): 201-209.
- Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H (1999). Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*. **274**(35): 25051-25060.
- Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC (2010). Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Exp Biol Med (Maywood)*. **235**(6): 751-760.
- Kolaczowska E, Kubes P (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology*. **13**(3): 159-175.
- Korchak HM, Kilpatrick LE (2001). Roles for beta II-protein kinase C and RACK1 in positive and negative signaling for superoxide anion generation in differentiated HL60 cells. *The Journal of biological chemistry*. **276**(12): 8910-8917.
- Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W, Grinstein S (1997). Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. **272**(2): 937-944.
- Kuhns DB, Gallin JI (1995). Increased cell-associated IL-8 in human exudative and A23187-treated peripheral blood neutrophils. *The Journal of immunology*. **154**(12): 6556-6562.
- Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, *et al.* (2002). The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *The EMBO journal*. **21**(23): 6312-6320.
- Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, *et al.* (2002). Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood*. **100**(5): 1860-1868.
- Kwong CH, Malech HL, Rotrosen D, Leto TL (1993). Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. *Biochemistry*. **32**(21): 5711-5717.
- Lacy P (2005). The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacology & therapeutics*. **107**(3): 358-376.
- Lacy P (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. **2**(3): 98-108.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(5259): 680-685.
- Lambeth JD (2007). Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free radical biology & medicine*. **43**(3): 332-347.

- Lambeth JD, Krause KH, Clark RA (2008). NOX enzymes as novel targets for drug development. *Seminars in immunopathology*. **30**(3): 339-363.
- Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K (2002). Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *The Journal of biological chemistry*. **277**(12): 10121-10128.
- Laudanna C, Constantin G, Baron P, Scarpini E, Scarlato G, Cabrini G, *et al.* (1994). Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *The Journal of biological chemistry*. **269**(6): 4021-4026.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*. **281**(5385): 2042-2045.
- Lee WL, Harrison RE, Grinstein S (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. **5**(14): 1299-1306.
- Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, Selsted ME (1988). Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *The Journal of clinical investigation*. **81**(6): 1829-1835.
- Leto TL, Adams AG, de Mendez I (1994). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**(22): 10650-10654.
- Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D (1996). Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. **1**: d72-90.
- Lewis EM, Sergeant S, Ledford B, Stull N, Dinanuer MC, McPhail LC (2010). Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. *The Journal of biological chemistry*. **285**(5): 2959-2967.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*. **7**(9): 678-689.
- Ley K, Smith E, Stark MA (2006). IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunologic research*. **34**(3): 229-242.
- Liu C, Desikan R, Ying Z, Gushchina L, Kampfrath T, Deiluiis J, *et al.* (2012). Effects of a novel pharmacologic inhibitor of myeloperoxidase in a mouse atherosclerosis model. *PloS one*. **7**(12): e50767.
- Liu H, Liu HY, Jiang YN, Li N (2016). Protective effect of thymoquinone improves cardiovascular function, and attenuates oxidative stress, inflammation and apoptosis by mediating the PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Molecular medicine reports*. **13**(3): 2836-2842.
- Lotz S, Aga E, Wilde I, van Zandbergen G, Hartung T, Solbach W, *et al.* (2004). Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *Journal of leukocyte biology*. **75**(3): 467-477.
- Lukas B, Schmiderer C, Franz C, Novak J (2009). Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae). *Journal of agricultural and food chemistry*. **57**(4): 1362-1365.
- Mahgoub AA (2003). Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicology letters*. **143**(2): 133-143.
- Majdalawieh AF, Fayyad MW (2015). Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *International immunopharmacology*. **28**(1): 295-304.

- Majumdar S, Rossi MW, Fujiki T, Phillips WA, Disa S, Queen CF, *et al.* (1991). Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. Differential substrate specificities of a translocatable calcium- and phospholipid-dependent beta-protein kinase C and a phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl coenzyme A. *The Journal of biological chemistry*. **266**(14): 9285-9294.
- Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M, Bedouhene S, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM, *et al.* (2013). Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochemical pharmacology*. **85**(1): 92-100.
- Malhotra SK (2012). Nigella. In: "Peter KV (ed). *Handbook of Herbs and Spices, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*", Second Edition: Woodhead Publishing. Pp: 391-416.
- Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM (2002). Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell biochemistry and function*. **20**(2): 143-151.
- Mansour MA, Tornhamre S (2004). Inhibition of 5-lipoxygenase and Leukotriene C4 Synthase in Human Blood Cells by Thymoquinone. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **19**(5): 431-436.
- Manter DK, Kelsey RG, Karchesy JJ (2007). Antimicrobial Activity of Extractable Conifer Heartwood Compounds Toward *Phytophthora ramorum*. *Journal of Chemical Ecology*. **33**(11): 2133-2147.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*. **11**(8): 519-531.
- Marcoux J, Man P, Petit-Haertlein I, Vives C, Forest E, Fieschi F (2010). p47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *The Journal of biological chemistry*. **285**(37): 28980-28990.
- Markert M, Andrews PC, Babior BM (1984). Measurement of O₂⁻ production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods in enzymology*. **105**: 358-365.
- Martyn KD, Kim MJ, Quinn MT, Dinanier MC, Knaus UG (2005). p21-activated kinase (Pak) regulates NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Blood*. **106**(12): 3962-3969.
- Matsuzawa A, Ichijo H (2008). Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochimica et biophysica acta*. **1780**(11): 1325-1336.
- McConnico RS, Weinstock D, Poston ME, Roberts MC (1999). Myeloperoxidase activity of the large intestine in an equine model of acute colitis. *American journal of veterinary research*. **60**(7): 807-813.
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *The Journal of biological chemistry*. **244**(22): 6049-6055.
- McKimmie CS, Fraser AR, Hansell C, Gutierrez L, Philipsen S, Connell L, *et al.* (2008). Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1. *The Journal of immunology*. **181**(5): 3353-3363.
- McLeish KR, Knall C, Ward RA, Gerwins P, Coxon PY, Klein JB, *et al.* (1998). Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *Journal of leukocyte biology*. **64**(4): 537-545.
- McPhail LC, Clayton CC, Snyderman R (1984). A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca²⁺-dependent protein kinase. *Science*. **224**(4649): 622-625.

- Meijles DN, Fan LM, Howlin BJ, Li JM (2014). Molecular insights of p47phox phosphorylation dynamics in the regulation of NADPH oxidase activation and superoxide production. *The Journal of biological chemistry*. **289**(33): 22759-22770.
- Merfort I, Wray V, Barakat HH, Hussein SAM, Nawwar MAM, Willuhn G (1997). Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. **46**(2): 359-363.
- Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, *et al.* (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. **117**(3): 953-959.
- Meziti A, Meziti H, Boudiaf K, Benboubetra M, Bouriche H (2012). Polyphenolic profile and antioxidant activities of *Nigella sativa* seed extracts in vitro and in vivo. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. **64**: 24-32.
- Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, *et al.* (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*. **91**(3): 385-395.
- Migeotte I, Communi D, Parmentier M (2006). Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine & growth factor reviews*. **17**(6): 501-519.
- Miller AA, Drummond GR, Sobey CG (2006). Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacology & therapeutics*. **111**(3): 928-948.
- Mocsai A, Jakus Z, Vantus T, Berton G, Lowell CA, Ligeti E (2000). Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *The Journal of immunology*. **164**(8): 4321-4331.
- Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F, Mare A, Alzrigh M, Benghuzzi H, *et al.* (2003). Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomedical sciences instrumentation*. **39**: 440-445.
- Moore AR (2003). Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. *Methods Mol Biol*. **225**: 123-128.
- Mosbah A, Sobhi W, Benboubetra M (2015). Antioxidant and anti-hemolytic activities of Algerian *Nigella sativa* total oil and its neutral lipid fraction. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **7**(11): 50-54.
- Nadkarni K (1976). *Crocus sativus*, *Nigella sativa*. In: "Nadkarni KM (ed). *Indian materia medica*. ". Bombay, India: Popular Prakashan. Pp: 386-411.
- Nagaji J (1999). The role of protein kinase C and [Ca²⁺]_i in superoxide anion synthesis and myeloperoxidase degranulation of human neutrophils. *The Kurume medical journal*. **46**(3-4): 157-162.
- Nathan C (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology*. **6**(3): 173-182.
- Nauseef WM (2004). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and cell biology*. **122**(4): 277-291.
- Nauseef WM (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews*. **219**: 88-102.
- Nauseef WM, Borregaard N (2014). Neutrophils at work. *Nature immunology*. **15**(7): 602-611.
- Nergiz C, Ötleş S (1993). Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food Chemistry*. **48**(3): 259-261.
- Ng-Sikorski J, Andersson R, Patarroyo M, Andersson T (1991). Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Experimental cell research*. **195**(2): 504-508.

- Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Knall C, Gerwins P, Johnson GL, *et al.* (1997). Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *Journal of Clinical Investigation*. **99**(5): 975-986.
- Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD (1999). The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *The Journal of biological chemistry*. **274**(33): 22999-23005.
- Nusse O, Lindau M (1988). The dynamics of exocytosis in human neutrophils. *The Journal of cell biology*. **107**(6 Pt 1): 2117-2123.
- Odeh F, Ismail SI, Abu-Dahab R, Mahmoud IS, Al Bawab A (2012). Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer. *Drug Delivery*. **19**(8): 371-377.
- Olins DE, Olins AL (2005). Granulocyte heterochromatin: defining the epigenome. *BMC cell biology*. **6**: 39.
- Omran OM (2014). Effects of thymoquinone on STZ-induced diabetic nephropathy: an immunohistochemical study. *Ultrastructural pathology*. **38**(1): 26-33.
- Owen CA, Campbell EJ (1999). The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *Journal of leukocyte biology*. **65**(2): 137-150.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, *et al.* (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(25): 13766-13771.
- Pai JK, Siegel MI, Egan RW, Billah MM (1988). Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. *The Journal of biological chemistry*. **263**(25): 12472-12477.
- Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & molecular immunology*. **12**(1): 5-23.
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*. **191**(3): 677-691.
- Park HS, Lee SM, Lee JH, Kim YS, Bae YS, Park JW (2001). Phosphorylation of the leucocyte NADPH oxidase subunit p47(phox) by casein kinase 2: conformation-dependent phosphorylation and modulation of oxidase activity. *The Biochemical journal*. **358**(Pt 3): 783-790.
- Parkos CA, Dinanuer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT (1989). Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. **73**(6): 1416-1420.
- Pick E (2014). Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. *Small GTPases*. **5**: e27952.
- Pontremoli S, Melloni E, Michetti M, Sacco O, Salamino F, Sparatore B, *et al.* (1986). Biochemical responses in activated human neutrophils mediated by protein kinase C and a Ca²⁺-requiring proteinase. *The Journal of biological chemistry*. **261**(18): 8309-8313.
- Popa-Nita O, Proulx S, Pare G, Rollet-Labelle E, Naccache PH (2009). Crystal-induced neutrophil activation: XI. Implication and novel roles of classical protein kinase C. *The Journal of immunology*. **183**(3): 2104-2114.
- Price MO, Atkinson SJ, Knaus UG, Dinanuer MC (2002). Rac activation induces NADPH oxidase activity in transgenic COSphox cells, and the level of superoxide production is exchange factor-dependent. *The Journal of biological chemistry*. **277**(21): 19220-19228.

- Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM (1993). Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *The Journal of biological chemistry*. **268**(28): 20983-20987.
- Quinn MT, Gauss KA (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of leukocyte biology*. **76**(4): 760-781.
- Raad H, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, *et al.* (2009). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **23**(4): 1011-1022.
- Ramadan MF (2007). Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *International Journal of Food Science and Technology*. **42**(10): 1208-1218.
- Ramadan MF, Mörsel JT (2002a). Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Die Nahrung*. **46**(4): 240-244.
- Ramadan MF, Mörsel JT (2002b). Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and β -carotene in oilseeds. *European Food Research and Technology*. **214**(6): 521-527.
- Rane MJ, Carrithers SL, Arthur JM, Klein JB, McLeish KR (1997). Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *The Journal of immunology*. **159**(10): 5070-5078.
- Rane MJ, Coxon PY, Powell DW, Webster R, Klein JB, Pierce W, *et al.* (2001). p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. **276**(5): 3517-3523.
- Ravetch JV, Kinet JP (1991). Fc receptors. *Annual review of immunology*. **9**: 457-492.
- Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ, McPhail LC (2000). Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. **275**(37): 28406-28412.
- Regier DS, Waite KA, Wallin R, McPhail LC (1999). A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component. *The Journal of biological chemistry*. **274**(51): 36601-36608.
- Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, *et al.* (2007). Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer biology & therapy*. **6**(2): 160-169.
- Rooney S, Ryan MF (2005). Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer research*. **25**(3B): 2199-2204.
- Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, *et al.* (1996). Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. **87**(5): 1663-1681.
- Rosen H, Michel BR (1997). Redundant contribution of myeloperoxidase-dependent systems to neutrophil-mediated killing of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. **65**(10): 4173-4178.
- Rossi F, Zatti M (1964). Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia*. **20**(1): 21-23.
- Rotrosen D, Kleinberg ME, Nunoi H, Leto T, Gallin JI, Malech HL (1990). Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocyte oxidase cytochrome b558. *The Journal of biological chemistry*. **265**(15): 8745-8750.

- Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH (1992). Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. **256**(5062): 1459-1462.
- Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, *et al.* (2003). Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *The Journal of immunology*. **170**(10): 5268-5275.
- Sankaranarayanan C, Pari L (2011). Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and β -cell damage in experimental hyperglycemic rats. *Chemico-biological interactions*. **190**(2-3): 148-154.
- Sareila O, Kelkka T, Pizzolla A, Hultqvist M, Holmdahl R (2011). NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxidants & redox signaling*. **15**(8): 2197-2208.
- Sarfstein R, Gorzalczyk Y, Mizrahi A, Berdichevsky Y, Molshanski-Mor S, Weinbaum C, *et al.* (2004). Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras. *The Journal of biological chemistry*. **279**(16): 16007-16016.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, *et al.* (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. **287**(5455): 1040-1046.
- Sathyamoorthy M, de Mendez I, Adams AG, Leto TL (1997). p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *The Journal of biological chemistry*. **272**(14): 9141-9146.
- Scapini P, Carletto A, Nardelli B, Calzetti F, Roschke V, Merigo F, *et al.* (2005). Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood*. **105**(2): 830-837.
- Scher JU, Abramson SB, Pillinger MH (2010). Neutrophils I. In: "Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW (ed). *Fundamentals of Inflammation*". New York: Cambridge University Press. Pp: 39-48.
- Schieber M, Chandel NS (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*. **24**(10): R453-462.
- Schmeling DJ, Peterson PK, Hammerschmidt DE, Kim Y, Verhoef J, Wilkinson BJ, *et al.* (1979). Chemotaxis by cell surface components of Staphylococcus aureus. *Infection and immunity*. **26**(1): 57-63.
- Schneider-Stock R, Fakhoury IH, Zaki AM, El-Baba CO, Gali-Muhtasib HU (2014). Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discovery Today*. **19**(1): 18-30.
- Schramm R, Thorlacius H (2004). Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*. **53**(12): 644-652.
- Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. **447**(7146): 869-874.
- Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, *et al.* (2000). Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *The Journal of immunology*. **164**(9): 4783-4789.
- Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N (1995). Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *The Journal of immunology*. **154**(8): 4157-4165.
- Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *The Journal of immunology*. **150**(4): 1535-1543.

- Sergeant S, McPhail LC (1997). Opsonized zymosan stimulates the redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils. *The Journal of immunology*. **159**(6): 2877-2885.
- Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology*. **8**(5): 349-361.
- Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, *et al.* (2009). Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *The Journal of experimental medicine*. **206**(1): 15-23.
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Myckalad A, Deby-Dupont G (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annales de Médecine Vétérinaire*. **147**: 79-93.
- Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC (2005). Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of leukocyte biology*. **78**(5): 1025-1042.
- Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G (2014). Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in immunology*. **5**: 448.
- Shiose A, Sumimoto H (2000). Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*. **275**(18): 13793-13801.
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK (2003). In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International journal of oncology*. **22**(1): 107-113.
- Showell HJ, Freer RJ, Zigmond SH, Schiffmann E, Aswanikumar S, Corcoran B, *et al.* (1976). The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *The Journal of experimental medicine*. **143**(5): 1154-1169.
- Singer, II, Scott S, Kawka DW, Kazazis DM (1989). Adhesomes: specific granules containing receptors for laminin, C3bi/fibrinogen, fibronectin, and vitronectin in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *The Journal of cell biology*. **109**(6 Pt 1): 3169-3182.
- Smallwood JJ, Malawista SE (1992). Protein kinase C isoforms in human neutrophil cytoplasts. *Journal of leukocyte biology*. **51**(1): 84-92.
- Smith RJ, Justen JM, Sam LM (1988). Effects of a protein kinase C inhibitor, K-252a, on human polymorphonuclear neutrophil responsiveness. *Biochemical and biophysical research communications*. **152**(3): 1497-1503.
- Sobhi W, Khettal B, Belmouhoub M, Atmani D, Duez P, Benboubetra M (2011). Hepatotoxicity and Langerhans Islets Regenerative Effects of Polar and Neutral Lipids of Nigella sativa L. in Nicotinamide/streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pteridines*. **22** (1): 97-104.
- Someya A, Nunoi H, Hasebe T, Nagaoka I (1999). Phosphorylation of p40-phox during activation of neutrophil NADPH oxidase. *Journal of leukocyte biology*. **66**(5): 851-857.
- Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, *et al.* (2009). Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*. **461**(7268): 1287-1291.
- Staniek K, Gille L (2010). Is thymoquinone an antioxidant? *BMC Pharmacology*. **10**(1): 1-1.
- Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. **22**(3): 285-294.
- Suchard SJ, Nakamura T, Abe A, Shayman JA, Boxer LA (1994). Phospholipase D-mediated diradylglycerol formation coincides with H₂O₂ and lactoferrin release in adherent human neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. **269**(11): 8063-8068.

- Sumimoto H, Sakamoto N, Nozaki M, Sakaki Y, Takeshige K, Minakami S (1992). Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochemical and biophysical research communications*. **186**(3): 1368-1375.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology*. **31**(8): 318-324.
- Surber K, Tucci M, Benghuzzi H, Cameron JA (2009). Thymoquinone Decreases Macrophage Cell Viability and Function. *The FASEB Journal*. **23**(1 Supplement): 762.727.
- Taha MM, Sheikh BY, Salim LZ, Mohan S, Khan A, Kamalidehghan B, *et al.* (2016). Thymoquinone induces apoptosis and increase ROS in ovarian cancer cell line. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. **62**(6): 97-101.
- Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Frontiers in immunology*. **5**: 508.
- Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A (2007). Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phytotherapy research : PTR*. **21**(9): 895-897.
- Tesarova H, Svobodova B, Kokoska L, Marsik P, Pribylova M, Landa P, *et al.* (2011). Determination of oxygen radical absorbance capacity of black cumin (*Nigella sativa*) seed quinone compounds. *Natural product communications*. **6**(2): 213-216.
- Theilgaard-Monch K, Knudsen S, Follin P, Borregaard N (2004). The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *The Journal of immunology*. **172**(12): 7684-7693.
- Tian W, Li XJ, Stull ND, Ming W, Suh CI, Bissonnette SA, *et al.* (2008). Fc gamma R-stimulated activation of the NADPH oxidase: phosphoinositide-binding protein p40phox regulates NADPH oxidase activity after enzyme assembly on the phagosome. *Blood*. **112**(9): 3867-3877.
- Todd RF, 3rd, Arnaout MA, Rosin RE, Crowley CA, Peters WA, Babior BM (1984). Subcellular localization of the large subunit of Mo1 (Mo1 alpha; formerly gp 110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion. *The Journal of clinical investigation*. **74**(4): 1280-1290.
- Torres M, Hall FL, O'Neill K (1993). Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *The Journal of Immunology*. **150**(4): 1563-1577.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **76**(9): 4350-4354.
- Trang NT, Wanner MJ, Phuong le VN, Koomen GJ, Dung NX (1993). Thymoquinone from *Eupatorium ayapana*. *Planta medica*. **59**(1): 99.
- Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T (1994). A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. *Biochemical and biophysical research communications*. **199**(3): 1378-1387.
- Ueyama T, Tatsuno T, Kawasaki T, Tsujibe S, Shirai Y, Sumimoto H, *et al.* (2007). A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox. *Molecular biology of the cell*. **18**(2): 441-454.
- Umar S, Hedaya O, Singh AK, Ahmed S (2015). Thymoquinone inhibits TNF-alpha-induced inflammation and cell adhesion in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by ASK1 regulation. *Toxicology and applied pharmacology*. **287**(3): 299-305.

- Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar C, Khan HA (2012). Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chemico-biological interactions*. **197**(1): 40-46.
- Underhill DM, Ozinsky A (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current opinion in immunology*. **14**(1): 103-110.
- Uriarte SM, Rane MJ, Luerman GC, Barati MT, Ward RA, Nauseef WM, *et al.* (2011). Granule Exocytosis Contributes to Priming and Activation of the Human Neutrophil Respiratory Burst. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **187**(1): 391-400.
- Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, Fahmi H, Fernandes JC, Benderdour M (2011). Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. *Journal of cellular biochemistry*. **112**(1): 107-117.
- von Vietinghoff S, Ley K (2009). IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *The Journal of immunology*. **183**(2): 865-873.
- Wajs A, Bonikowski R, Kalembe D (2008). Composition of essential oil from seeds of *Nigella sativa* L. cultivated in Poland. *Flavour and Fragrance Journal*. **23**(2): 126-132.
- Wallach TM, Segal AW (1996). Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. *The Biochemical journal*. **320** (Pt 1): 33-38.
- Welch HC, Coadwell WJ, Stephens LR, Hawkins PT (2003). Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS letters*. **546**(1): 93-97.
- Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW (1993). p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *The Biochemical journal*. **296** (Pt 3): 557-561.
- Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E, Segal AW (1996). Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *The Biochemical journal*. **317** (Pt 3): 919-924.
- Wilson MI, Gill DJ, Perisic O, Quinn MT, Williams RL (2003). PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Molecular cell*. **12**(1): 39-50.
- Wolf K, Friedl P (2011). Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in cell biology*. **21**(12): 736-744.
- Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH (2012). Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical pharmacology*. **83**(4): 443-451.
- Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, *et al.* (2011). Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochemical pharmacology*. **82**(5): 464-475.
- Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA (1998). The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer research*. **18**(3A): 1527-1532.
- Worthen GS, Avdi N, Buhl AM, Suzuki N, Johnson GL (1994). FMLP activates Ras and Raf in human neutrophils. Potential role in activation of MAP kinase. *The Journal of clinical investigation*. **94**(2): 815-823.
- Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. **49**(9): 1618-1631.
- Wright HL, Moots RJ, Edwards SW (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*. **10**(10): 593-601.

- Yang HC, Cheng ML, Ho HY, Chiu DT (2011). The microbicidal and cytheregulatory roles of NADPH oxidases. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. **13**(2): 109-120.
- Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, *et al.* (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological reviews*. **61**(2): 119-161.
- Yu L, Quinn MT, Cross AR, Dinauer MC (1998). Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**(14): 7993-7998.
- Yu L, Zhen L, Dinauer MC (1997). Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *The Journal of biological chemistry*. **272**(43): 27288-27294.
- Yuzawa S, Suzuki NN, Fujioka Y, Ogura K, Sumimoto H, Inagaki F (2004). A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. **9**(5): 443-456.
- Zaman W, Mitsuyama T, Hatakenaka M, Kang D, Minakami S, Takeshige K (1994). Phosphatidic acid induces the release of beta-glucuronidase but not lactoferrin from electroporeabilized human neutrophils. *Journal of biochemistry*. **115**(2): 238-244.
- Zhan S, Vazquez N, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, *et al.* (1996). Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood*. **88**(7): 2714-2721.
- Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, *et al.* (2001). Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama*. **286**(17): 2136-2142.
- Zhang X, Kluger Y, Nakayama Y, Poddar R, Whitney C, DeTora A, *et al.* (2004). Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *Journal of leukocyte biology*. **75**(2): 358-372.
- Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A, *et al.* (2013). Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. *Cell Death Dis*. **4**: e660.

PUBLICATIONS



Thymoquinone strongly inhibits fMLF-induced neutrophil functions and exhibits anti-inflammatory properties *in vivo*



Kaouthar Boudiaf^{a,b,c,d}, Margarita Hurtado-Nedelec^{a,b}, Sahra Amel Belambri^{a,b}, Jean-Claude Marie^{a,b}, Yacine Derradji^e, Mustapha Benboubetra^d, Jamel El-Benna^{a,b}, Pham My-Chan Dang^{a,b,*}

^a INSERM U1149, ERL 8252 CNRS, Centre de Recherche sur l'Inflammation, Paris, France

^b Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence Inflamex, Faculté de Médecine, Site Xavier Bichat, Paris, France

^c Laboratoire de Chimie des Matériaux et des Vivants: Activité et réactivité, Faculté des Sciences, Université El-Hadj Lakhdar, Batna, Algeria

^d Laboratoire de Biochimie appliquée-Inflammation: Activités Pharmaco-Biologiques des Substances Naturelles, Département de Biochimie, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algeria

^e Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Khider, Biskra, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2015

Accepted 6 January 2016

Available online 13 January 2016

Keywords:

Thymoquinone
Neutrophils
NADPH oxidase
Superoxide anion
ROS
p47^{PHOX}
Phosphorylation
Degranulation

ABSTRACT

Polymorphonuclear neutrophils are key players in host defense against pathogens through the robust production of superoxide anion by the NADPH oxidase and the release of antibacterial proteins from granules. However, inappropriate release of these agents in the extracellular environment induces severe tissue injury, thereby contributing to the physiopathology of acute and chronic inflammatory disorders. Many studies have been carried out to identify molecules capable of inhibiting phagocyte functions, in particular superoxide anion production, for therapeutic purposes. In the present study, we show that thymoquinone (TQ), the major component of the volatile oil from *Nigella sativa* (black cumin) seeds strongly inhibits fMLF-induced superoxide production and granules exocytosis in neutrophils. The inhibition of superoxide anion was not due to a scavenger effect, as TQ did not inhibit superoxide anion produced by the xanthine/xanthine oxidase system. Interestingly, TQ impaired the phosphorylation on Ser-304 and Ser-328 of p47^{PHOX}, a cytosolic subunit of the NADPH oxidase. TQ also attenuated specific and azurophilic granule exocytosis in fMLF-stimulated neutrophils as evidenced by decreased cell surface expression of gp91^{PHOX} and CD11b, and release of myeloperoxidase. Furthermore, both the PKC and MAPK pathways, which are involved in p47^{PHOX} phosphorylation and granules exocytosis, respectively, were inhibited by TQ in fMLF-stimulated neutrophils. Finally, in a model of pleurisy induced by λ -carrageenan in rats, TQ reduced neutrophil accumulation in the pleural space, showing that it not only inhibits PMN functions *in vitro*, but also exhibits anti-inflammatory properties *in vivo*. Thus, TQ possesses promising anti-inflammatory therapeutic potential.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the most abundant white blood cells in the circulation. They are bestowed with

Abbreviations: AIR, auto-inhibitory region; DFP, Diisopropyl fluorophosphate; ECL, enhanced chemiluminescence; ERK, extracellular signal-regulated kinase; fMLF, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine; HBSS, Hank's balanced salt solution; IBD, inflammatory bowel disease; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MPO, myeloperoxidase; NOX, neutrophil oxidase; PKC, Protein Kinase C; PMA, phorbol myristate acetate; PMN, polymorphonuclear neutrophil; RA, rheumatoid arthritis; ROS, reactive oxygen species; SH3, Src homology 3; SOD, superoxide dismutase; TQ, thymoquinone; XO, xanthine oxidase.

* Corresponding author at: INSERM U1149, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France.

E-mail address: my-chan.dang@inserm.fr (P.M.-C. Dang).

antimicrobial mechanisms that make them the major microbe eradicators of the immune system [1], therefore representing the first line of host defense. In response to an inflammatory signal, PMN leave the circulation, pass through the endothelium, and then migrate towards the infectious site along a gradient of chemoattractants such as N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) and complement component 5a (C5a). At the site of infection, membrane receptors for complement proteins and immunoglobulins recognize and bind opsonized bacteria, leading to the phagocytosis and destruction of the pathogen within the phagosome [2].

The major mechanism by which neutrophils kill phagocytosed microbes is the massive production of reactive oxygen species (ROS), which include superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($OH^\bullet$) and hypochlorous acid (HOCl) [3]. In PMN, superoxide anion, from which the other ROS are generated

[4], is produced by a multicomponent enzyme called NADPH oxidase (now renamed NOX2). The NADPH oxidase consists of the membrane bound cytochrome b558 (composed of two subunits, p22^{PHOX} and gp91^{PHOX}), which harbors all the redox components required for electron transfer from NADPH to molecular oxygen to produce superoxide anion [5], as well as several regulatory proteins (p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p40^{PHOX}, and Rac1/2) that reside in the cytoplasm prior to cell activation [4]. The NADPH oxidase activity of PMN is tightly regulated, as its components are segregated in different cellular compartments, ensuring that it stays inactive in the absence of stimulation. However, upon stimulation, p47^{PHOX}, p67^{PHOX} and p40^{PHOX}, which form a trimeric complex, become phosphorylated [6–8] and then migrate to the membranes, together with Rac1/2, where they associate with cytochrome b₅₅₈ to assemble the catalytically active oxidase [9,10]. Phosphorylation of p47^{PHOX} on serines in the auto-inhibitory region (AIR) located in the C-terminus is crucial for NADPH oxidase assembly and activation [7,11] as it disrupts auto-inhibitory internal interactions within the protein. The disruption releases the two central SH3 (Src homology 3) domains and the N-terminus PX (Phox) domain of p47^{PHOX}, allowing interaction with membrane p22^{PHOX} and phosphoinositides, and leading to activation of the NADPH oxidase [10]. The small GTPase Rac2 is also required for NADPH oxidase activity in human PMN [12]. As PMN proceed through activation, specific granules, which contain 85% of the cytochrome b558, are mobilized and fuse with either the plasma membrane or the phagosome, thus increasing expression of cytochrome b558 at these sites and allowing ROS production both inside the phagolysosome and outside of the cell. In addition, azurophilic granules release myeloperoxidase (MPO) into the phagosome or to the extracellular space. MPO reacts with the H₂O₂ derived from the NADPH oxidase to form HOCl, a potent and toxic oxidant [3]. Simultaneously, antibacterial proteins such as cathepsins, defensins, lactoferrin and lysozyme are released from these granules, and participate with the ROS to pathogen killing [13].

Whereas ROS generation and antibacterial proteins release by phagocytes are critical for effective host defense, their inappropriate production and release can also disrupt cellular redox equilibrium and damage surrounding tissues, thereby contributing to a wide variety of inflammatory disorders, such as rheumatoid arthritis (RA) and inflammatory bowel disease (IBD) [14].

In this setting, many studies have been carried out to identify molecules capable of inhibiting phagocyte functions, in particular ROS production, for therapeutic purposes. We became interested in thymoquinone (TQ) (2-isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone), the major component of the volatile oil of *Nigella sativa* (black cumin) seeds. In the recent years, TQ has received significant interest and demonstrated remarkable biological activities (for review see [15] and [16]). Although its antioxidant and anti-inflammatory properties have been reported in a number of studies, its effect on human neutrophil functions is still unknown. In the present study, we investigated the effect of TQ on fMLF-induced neutrophil functions, especially superoxide production and degranulation, analyzed the underlying mechanisms and studied its effect in an *in vivo* acute model of inflammation.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Thymoquinone, fMLF, cytochrome C, superoxide dismutase (SOD), xanthine, xanthine oxidase, DFP, PMA, FAD, ATP, GTPγs, sucrose, λ-carrageenan, mouse monoclonal anti-β-Actin antibody, protease and phosphatase inhibitors, buffers, and salt solutions

were from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Anti-Rac1/2 antibodies were from BD Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), anti-phospho-Erk1/2 and anti-phospho-p38 MAPK antibodies were from R&D Systems (Minneapolis, USA), anti-p38 MAPK and anti-phospho-PKC (pan) (βII Ser660) antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), anti-MPO antibodies were from Abcam (Cambridge, UK), anti-p22^{PHOX}, anti-ERK1/2, anti-pan-PKC, HRP-conjugated goat anti-rabbit, HRP-conjugated goat anti-mouse, AP-conjugated goat anti-rabbit antibodies and ECL (enhanced chemiluminescence) reagent were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany). PE-conjugated anti-human CD11b monoclonal antibodies were from Beckman Coulter (Marseille, France), FITC-conjugated anti-human flavocytochrome b558 monoclonal antibodies (7D5) were from MBL Medical and Biological Laboratories (Naka-Ku Nagoya, Japan). Cyto-X reagent was from Cell Applications Inc. (San Diego, CA, USA), NADPH was from Roche Life Science (Indianapolis, IN, USA), Dextran T500 was from Pharmacosmos (Holbaek, Denmark), Ficoll was from GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden), SDS-PAGE and Western blotting reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). The rabbit polyclonal antibodies against p47^{PHOX} and p47^{PHOX} phospho-Ser304 and p47^{PHOX} phospho-Ser328 were produced as previously described [17,18].

2.2. Human neutrophil preparation

Fresh blood obtained from healthy adult volunteers was used to isolate neutrophils under LPS-free conditions by Dextran sedimentation followed by Ficoll density gradient centrifugation [17]. Red blood cells were removed by hypotonic lysis. Following isolation, neutrophils were suspended in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and D-glucose.

2.3. Superoxide anion production assay

Superoxide anion (O₂⁻) production was measured by the superoxide dismutase-inhibitable cytochrome C reduction at 550 nm in a dual beam recording Uvikon 860 spectrophotometer, thermostated at 37 °C. Neutrophils (2.5 × 10⁶ cells) were suspended in 0.5 ml HBSS and incubated with cytochrome C (200 μM final concentration) in the presence or absence (control) of various concentrations of TQ (dissolved in DMSO) for 15 min at 37 °C. Cells were then stimulated with fMLF (10⁻⁶ M) or PMA (100 ng/ml) or treated with buffer (control), and the change in absorbance at 550 nm was recorded for 5 or 10 min (for PMA). Superoxide production was expressed as nanomoles of reduced cytochrome C min⁻¹ 10⁶ cells (molar extinction coefficient: 21.1 mM⁻¹ cm⁻¹). The final concentration of DMSO did not exceed 0.1% and had no discernible effect on O₂⁻ production by PMN.

2.4. Superoxide anion scavenging assay

The superoxide anion scavenging effect of TQ was examined in a cell-free xanthine/xanthine oxidase assay system by following the reduction of cytochrome C at 550 nm. The reaction mixture, prepared in HBSS, contained 0.02 U of xanthine oxidase, 100 μM of cytochrome C in the presence or absence of increasing TQ concentrations. Superoxide production was initiated by adding 500 μM of xanthine and the increase in absorbance at 550 nm was recorded for 10 min at 37 °C in a spectrophotometer (UVIKON®860, KONTRON Instruments). SOD (75 U) was used to determine the specificity of the reaction.

2.5. Cyto-X cytotoxicity assay

The viability of neutrophils in the presence of increasing TQ concentrations was assessed using the Cyto-X Cell Proliferation/Cytotoxicity Kit (Cell Applications Inc., San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. The Cyto-X reagent is reduced by dehydrogenases in living cells to form an orange colored formazan product (abs 450 nm) that is soluble in culture medium. The amount of formazan produced is directly proportional to the number of living cells. A 100 μ l cell suspension in RPMI containing 2×10^5 neutrophils was initially incubated with various concentrations of TQ for 15 min at 37 °C, stimulated or not with fMLF (10^{-6} M) for 5 min, and then added to 10 μ l of Cyto-X reagent in a 96-well plate. The plate was incubated for 2 h at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. The absorbance was then measured at 450 nm with a microplate reader (Molecular Devices ThermoMax Microplate Reader).

2.6. Pre-assembled active NADPH oxidase complex in a cell-free system

Membrane neutrophil fractions containing the pre-assembled active NADPH oxidase complex were prepared according the following procedure. After isolation, neutrophils were treated with 2.7 mM of diisopropyl fluorophosphate (DFP) for 20 min at 4 °C. Cells were then washed, resuspended in HBSS to a final concentration of 25×10^6 cells/ml, and stimulated with PMA (200 ng/ml) for 30 min at 37 °C. The stimulation was stopped by adding 40 ml of ice cold PBS, and cells were spun down by centrifugation at $400 \times g$ for 10 min. The resulting cell pellet was resuspended in 1 ml of relaxation buffer (100 mM KCl; 3 mM NaCl; 3.5 mM MgCl₂; 10 mM PIPES) containing 1 mM of ATP and 1.25 mM EGTA, and cells were sonicated (4×10 s) on ice. The unbroken cells and cell debris were pelleted by spinning at $400 \times g$ for 10 min. The supernatants containing the cell lysates were loaded on top of a discontinued sucrose gradient (40% and 15% in relaxation buffer + 1 mM ATP) and centrifuged in a swinging rotor (sw55Ti, Beckman XL-90 Ultracentrifuge) at 35,000 rpm for 45 min at 4 °C. The upper layer consisting of cytosol, and the ring at the interface of the 40% and 15% sucrose density media containing the cell membranes were recovered. The membrane fractions containing the pre-assembled active NADPH oxidase complex were washed in relaxation buffer + 1 mM ATP, then resuspended in the same buffer, containing 1 mM ATP, 1.25 mM EGTA and 0.34 M sucrose to a final concentration of 12.5×10^8 cell equivalents membrane per milliliter. The membranes were stored at –80 °C until use. The activity of the pre-assembled NADPH oxidase complex was assessed by the SOD-inhibitable cytochrome C reduction method in the presence or absence of TQ at 37 °C. The reaction mixture, prepared in HBSS (500 μ l final volume), contained 1.5×10^7 cell equivalents of the previously prepared membranes, 10 μ M GTP γ S, 10 μ M FAD, and 100 μ M cytochrome C. The reaction was initiated by adding 200 μ M NADPH. The rate of O₂^{•–} produced was measured by following the cytochrome C reduction at 550 nm. SOD (75 U) was used to verify the specificity of the reaction.

2.7. SDS-PAGE and Western blotting

Neutrophils (5×10^6 in 500 μ l of HBSS) were incubated with or without increasing TQ concentrations at 37 °C for 15 min, then stimulated with fMLF (10^{-6} M) at 37 °C with mild shaking for the indicated times. The reaction was stopped by adding 125 μ l of 5X concentrated modified Laemmli sample buffer [19] containing 12.5 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF, 6.25 mM p-NPP, 12.5 mM EDTA, 12.5 mM EGTA, 50 μ g/ml leupeptin, 50 μ g/ml pepstatin and 50 μ g/ml aprotinin. Samples were then denatured for 5 min in boiling water (100 °C) and stored at –80 °C until Western blotting

analysis. Upon thawing, samples were sonicated for 10 s and subjected to 10% SDS-PAGE (eq. of 4×10^5 cells/well) using standard techniques [19]. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes [20]. After saturation with 5% milk in Tris Buffered Saline containing 0.1% tween 20 (TBS-T 0.1%) for 1 h, the membranes were probed with anti-p67^{PHOX} (1:5000), anti-Rac2 (1:5000), anti-p47^{PHOX} (1:5000), anti-phospho-Ser304-p47^{PHOX} (1:2500), anti-phospho-Ser328-p47^{PHOX} (1:5000), anti-phospho-PKC (pan) (β II ser660) (1:1000), anti- β -Actin (1:5000), anti-PKC (1:500), anti-phospho-ERK1/2 (1:1000), anti-ERK1 (1:1000), anti-ERK2 (1:1000), anti-phospho-p38 MAPK (1:1000), anti-p38 MAPK (1:1000). After overnight incubation at 4 °C and appropriate washing with TBS-Tween 0.1%, the membranes were incubated with the corresponding secondary antibody, i.e., HRP-labeled goat anti-rabbit antibody (1:30,000), HRP-labeled goat anti-mouse antibody (1:10,000), AP-labeled goat anti-rabbit antibody (1:10,000) or AP-labeled goat anti-mouse antibody (1:10,000). The protein bands were revealed using enhanced chemiluminescence (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) when HRP-conjugated secondary antibodies were used. For the AP-conjugated secondary antibodies, the bands were revealed by adding the AP substrate containing 0.015% of BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) and 0.3 mg/ml of NBT (nitroblue tetrazolium) in 0.1 M carbonate buffer containing 1 mM MgCl₂.

2.8. Flow cytometry analysis of cell surface expression of gp91^{PHOX} and CD11b

Neutrophils (5×10^6 /ml in HBSS) were incubated with increasing TQ concentrations at 37 °C for 15 min prior to stimulation with fMLF (10^{-6} M) or PMA (100 ng/ml) for 5 and 8 min respectively at 37 °C. The reaction was stopped by transferring the tubes on ice. Then, 100 μ l of each sample were stained with 10 μ l of PE-conjugated anti-human CD11b monoclonal antibody (Beckman Coulter, Marseille, France), or FITC-conjugated anti-human flavocytochrome b558 monoclonal antibody 7D5 (MBL Medical and Biological Laboratories, Naka-Ku, Nagoya, Japan) in the dark for 15 min on ice. Cells were then resuspended in 350 μ l of ice cold PBS and suspensions analyzed immediately using a FACS Canto II (BD Biosciences, Oxford, UK). Non-specific antibody binding was determined with cells incubated with the same concentration of an irrelevant antibody of the same isotype. Forward and side scatter were used to identify the neutrophil population and to gate out contaminating cells and debris. The mean fluorescent intensity (MFI) of CD11b-positive cells and 7D5-positive cells was then determined. Five thousand events per sample were analyzed, and all results were obtained with a constant photomultiplier gain value.

2.9. Measurement of MPO release

Neutrophils (5×10^6 /ml in 250 μ l HBSS) were pre-incubated with or without increasing concentrations of TQ (for 15 min) and 5 μ g/ml of cytochalasin B (for 5 min) before stimulating with fMLF (10^{-6} M) for 2 min at 37 °C. After centrifugation for 30 s at 13,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Germany), the supernatants containing the released MPO were recovered, added to 5X concentrated modified Laemmli sample buffer described earlier, and denatured for 5 min at 100 °C. Samples were stored at –80 °C until analysis by Western blotting using an anti-MPO specific antibody (1:5000).

2.10. Intracellular calcium measurement

Intracellular calcium was measured with Fura-2/AM. Neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) in HBSS were loaded with 5 μ M Fura-2/AM

containing 0.01% pluronic acid for 45 min at 37 °C. They were then washed in HBSS, and changes in intracellular Ca^{2+} induced by fMLF (10^{-6} M) were monitored in the presence or absence of TQ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Fluorescence was measured using a dual-wavelength excitation fluorimeter at 340 and 380 nm for excitation and 510 nm for emission.

2.11. λ -Carrageenan-induced pleurisy in rats

Male Wistar rats of about 180–220 g were from the “Institut Pasteur d’Alger” (Algiers, Algeria). Animals were fed standard rodent chow and water *ad libitum*. All animal work was conducted according to relevant national and international guidelines in accordance with the recommendations of the Weatherall report. All animal experiments were performed in compliance with the care and use of laboratory animals. The control group (–TQ,+carrageenan) and the TQ-treated groups (+TQ,+carrageenan) each included six rats. Animals were treated or not with TQ (10 and 50 mg/kg) by intraperitoneal injection 1 h before induction of inflammation. The chosen TQ concentrations were inferior to the DL50 (57.5 mg/ml) determined after intraperitoneal injection of TQ in rats [21]. Pleural inflammation was induced as previously described [22] with some modifications. Rats were anesthetized, a small cut was made on the left side of the animals to expose the intercostal muscles. Saline (control, 0.2 ml) or saline containing 1% λ -carrageenan (0.2 ml) were then injected into the pleural cavity at the level of the sixth intercostal space. The skin incision was closed with a suture and the animals were allowed to recover from the anesthetic. The animals were sacrificed 4 h after the injection of carrageenan. The thoracic cage was opened and 1 ml of saline solution was introduced to wash the pleural cavity. The exudates were recovered by aspiration and the total volumes measured. Neutrophils present in the exudates were counted with an optical microscope using a Malassez cell counter after staining with Turk’s solution.

2.12. Statistical analysis

Results are expressed as the Mean $\pm$ SEM of at least three independent experiments. The protein bands in Western blots were quantified using Image J 1.43u software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). One-way ANOVA analysis of variance with the Tukey test for multiple comparisons was implemented using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). The threshold of significance was fixed at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. TQ strongly inhibits superoxide anion production by fMLF-stimulated human polymorphonuclear neutrophils

TQ, a natural product from black cumin seeds, has been reported to have anti-oxidant and anti-inflammatory properties. However, its effect on ROS production by human PMN is still unknown. To analyze the effects of TQ on fMLF-induced superoxide anion production by human PMN, cells were first incubated with increasing concentrations of TQ for 15 min, then stimulated with fMLF, and superoxide anion production was measured by the SOD-inhibitable cytochrome C reduction method. Results in Fig. 1A and B show that TQ markedly inhibited fMLF-stimulated superoxide anion generation in a concentration-dependent manner. This inhibition was highly significant, even at low concentration of TQ (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and production was abolished starting at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.001$) (Fig. 1B). The effect of TQ

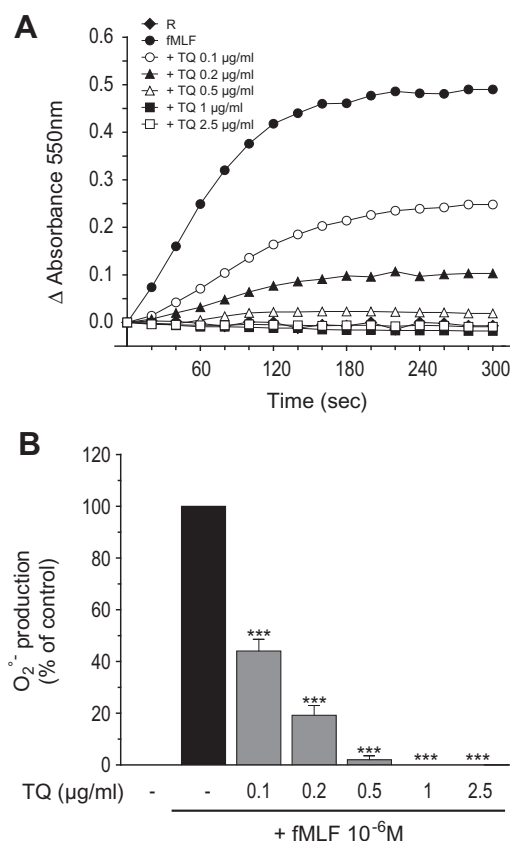


Fig. 1. TQ inhibits superoxide production by fMLF-stimulated human PMN. Human PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated in the presence or absence of increasing concentrations of TQ for 15 min at 37 °C, then stimulated with fMLF (10^{-6} M). Superoxide anion production was measured by the SOD-inhibitable cytochrome C reduction assay as described in Section 2. (A) Kinetics of cytochrome C reduction in the presence of increasing concentrations of TQ by fMLF-stimulated PMN. Representative of four independent experiments; (B) the initial velocity of the reaction from several experiments was expressed as percentage of control (PMN stimulated by fMLF). O_2^- production for control cells = 8.45 ± 0.96 nmoles/min/ 10^6 cells. Mean $\pm$ SEM of 4 experiments; ***, $p < 0.005$ as compared to TQ-untreated control (100%).

on non-receptor mediated neutrophils-induced superoxide generation was also analyzed by using phorbol myristate acetate (PMA) a direct activator of PKC. Fig. 2 show that TQ also inhibited PMA-induced superoxide generation in a concentration-dependent manner, however the effect was less important as compared to fMLF. In order to determine if the inhibition was due to a scavenging effect of TQ, we measured the production of superoxide anion in a cell-free xanthine/xanthine oxidase assay in the presence or absence of TQ. No effect of TQ was observed at all TQ concentrations used (0.1–2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig. 3A and B), while the production was completely inhibited by superoxide dismutase, demonstrating that TQ has no scavenging property on superoxide anion. Rather, TQ significantly increased superoxide anion production by the xanthine/xanthine oxidase system at 1 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 3A and B). We checked that TQ alone did not reduce directly cytochrome C (data not shown). We also analyzed whether TQ had a cytotoxic effect on neutrophils using the Cyto-X proliferation/cytotoxicity test. As illustrated in Fig. 4A and B, the viability of neutrophils stimulated or not with fMLF remained unchanged in presence of the different concentrations of TQ (0.1–2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). These results clearly show that TQ inhibits superoxide anion generation by fMLF-stimulated human neutrophils without having any scavenging properties on O_2^- or an effect on PMN viability. Therefore, it probably interferes directly or indirectly with the functioning of the NADPH oxidase complex.

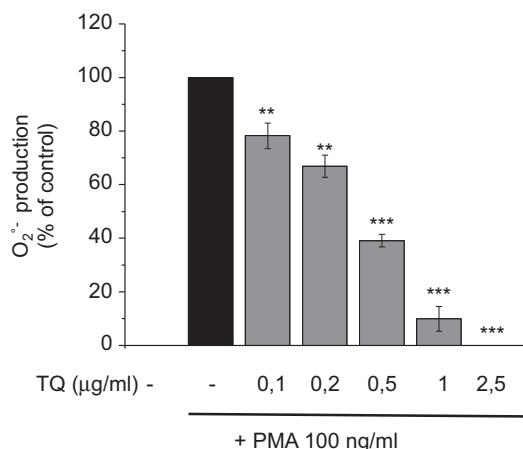


Fig. 2. TQ inhibits PMA-induced superoxide production in human PMN. Human PMN (5×10^6 /ml) were incubated in the presence or absence of increasing concentrations of TQ for 15 min at 37 °C, then stimulated with PMA (100 ng/ml). Superoxide anion production was measured by the SOD-inhibitable cytochrome C reduction assay as described in Section 2. The initial velocity of the reaction from several experiments was expressed as percentage of control (PMN stimulated by PMA). O₂⁻ production for control cells = 7.53 ± 2.1 nmoles/min/ 10^6 cells. Mean $\pm$ SEM of 4 experiments; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$ as compared to TQ-untreated control (100%).

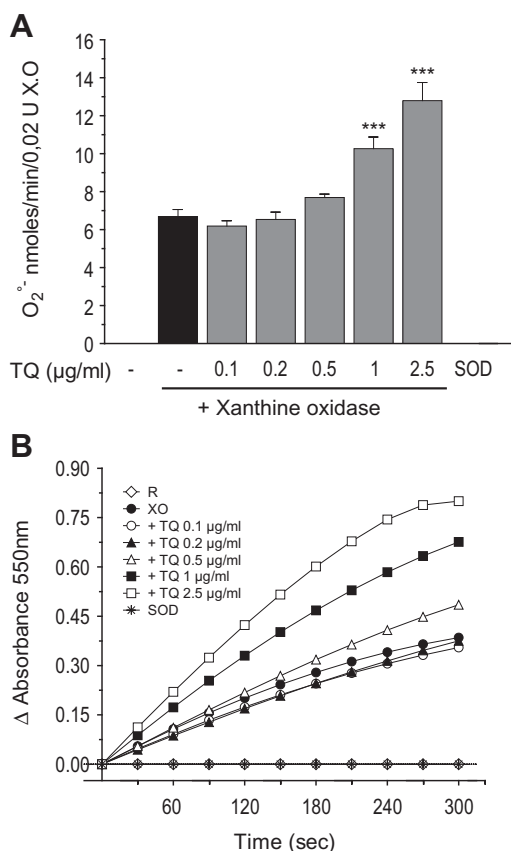


Fig. 3. TQ does not scavenge superoxide anion. The superoxide anion scavenging effect of TQ was examined in a cell-free xanthine/xanthine oxidase assay as described in Section 2. (A) Superoxide production in the presence of TQ, expressed as nmoles/min/0.02 U XO; (B) kinetics of cytochrome C reduction in the presence of increasing concentrations of TQ. Representative of three experiments. Mean $\pm$ SEM of 3 experiments; ***: $p < 0.005$ as compared to TQ-untreated control.

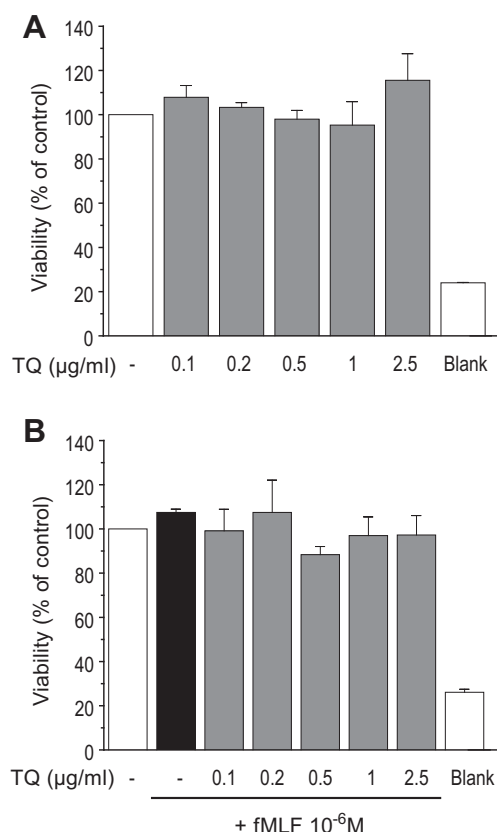


Fig. 4. TQ has no effect on PMN viability. Viability of unstimulated (A) and fMLF-stimulated PMN (B) treated or not with TQ was assessed using the Cyto-X Cell Proliferation/Cytotoxicity Kit as described in Section 2. In brief, neutrophils (2.5×10^6 in 500 µl of HBSS) were treated with increasing TQ concentrations for 15 min at 37 °C. Cells were stimulated or not with fMLF (10^{-6} M) for 5 min. PMN (2×10^5) were then recovered in 100 µl of RPMI and incubated with 10 µl of Cyto-X reagent for 2 h at 37 °C, and the absorbance at 450 nm was recorded. Blank assay contains Cyto-X + RPMI alone. Results were expressed as percentage of control (untreated PMN + Cyto-X). O.D._{450 nm} of control = 0.511 ± 0.01 . Values represent the mean of 3 experiments $\pm$ SEM.

3.2. TQ did not directly inhibit the catalytic activity of the neutrophil NADPH oxidase

First, to determine if TQ directly inhibits the catalytic activity of the neutrophil NADPH oxidase, we examined its effect on the pre-assembled active NADPH oxidase complex in a cell-free system. For this purpose, membrane fractions containing the pre-assembled active NADPH oxidase complex were prepared by treating PMNs with PMA, a direct activator of PKC that triggers the translocation of $p47^{PHOX}$, $p67^{PHOX}$ and Rac2 to the plasma membrane where they associate with the cytochrome b_{558} to form the catalytically active oxidase. Membrane fractions containing this catalytically active oxidase were then purified on a discontinued gradient of sucrose. As previously established, Western blotting of membrane fractions from PMA-stimulated neutrophils confirmed that $p67^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ and Rac2 were present at the membrane, indicating that PMA stimulation resulted in assembly of the NADPH oxidase complex (Fig. 5A). The effect of TQ on the catalytic activity of the pre-assembled NADPH oxidase complex was then assessed in a cell-free system using the SOD-inhibitable cytochrome C reduction method in the presence of GTP γ s and FAD and by initiating the reaction with NADPH. As expected, membranes prepared from PMA-stimulated PMN produce significant amounts of O₂⁻ as

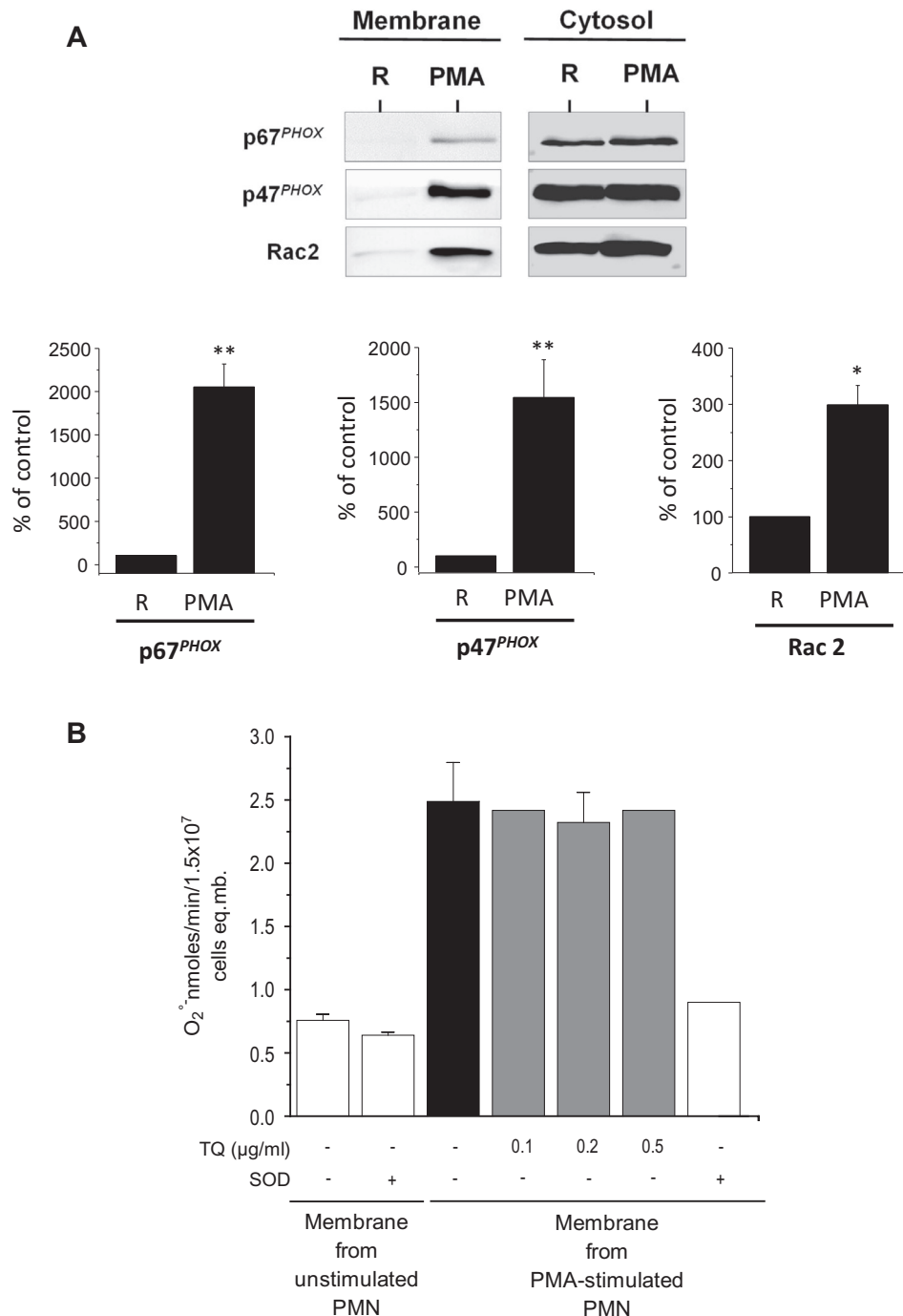


Fig. 5. TQ does not inhibit the catalytic activity of the NADPH oxidase complex. (A) Membrane fractions containing the pre-assembled active NADPH oxidase complex were prepared from PMA-stimulated PMN as described in Section 2. Upper: Western blots show that the cytosolic subunits (p67^{PHOX}, p47^{PHOX} and Rac2) were detected in membranes derived from PMA-stimulated PMN, while they were not present in membranes from resting PMN; Lower: p67^{PHOX}, p47^{PHOX} and Rac2 in the membrane were quantified using Image J 1.43u software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Values are expressed as Mean $\pm$ SEM of 3 membrane preparations. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ as compared to the control (membrane of resting PMN). (B) The effect of different concentrations of TQ on the cell-free activity of the pre-assembled NADPH oxidase complex was assessed using the SOD-inhibitable cytochrome C reduction method. TQ was pre-incubated with 1.5×10^7 cell equivalents of the previously prepared membranes, 10 μ M GTP γ S, 10 μ M FAD, and 100 μ M cytochrome C. The reaction was initiated by adding 200 μ M NADPH. Values are representative of 2 experiments.

compared to membranes from unstimulated PMNs (Fig. 5B). When TQ was pre-incubated with membranes from PMA-stimulated PMNs, O₂⁻ production by the pre-assembled NADPH oxidase remained unchanged, even at the concentration of 0.5 μ g/ml that was previously shown to completely abolish fMLF-induced O₂⁻ production by intact PMNs (see Fig. 1). Therefore, TQ does not directly inhibit the catalytic activity of the neutrophil NADPH

oxidase, but rather acts by interfering with the activation process of the NADPH oxidase complex.

3.3. TQ impairs the phosphorylation of p47^{PHOX} on Ser304 and Ser328

As phosphorylation of p47^{PHOX} is a crucial event for NADPH oxidase activation, we next examined if TQ could interfere with

this process. PMNs were incubated with increasing concentrations of TQ prior to their stimulation by fMLF, and the phosphorylation of p47^{PHOX} Ser304 and Ser328, which is essential for the activation of the NADPH oxidase [23,24], was analyzed by Western blotting using anti-phospho-Ser304 and anti-phospho-Ser328 specific antibodies developed in our laboratory [17,18]. Fig. 6A and B show that TQ inhibited in a concentration-dependent manner the strong fMLF-induced phosphorylation of both Ser304 and Ser328, with a more pronounced effect on Ser304. Western blot analysis using an antibody directed against total p47^{PHOX} showed that the same amount of proteins was loaded into each well. The effects of TQ were quantified by densitometry of the protein bands and by calculation of the ratio between phospho-p47^{PHOX} and total p47^{PHOX}. The data clearly show that TQ strongly inhibited p47^{PHOX} phosphorylation on Ser304 and Ser328 and that this inhibition was highly significant ($p < 0.005$) starting from 0.2 $\mu\text{g/ml}$ of TQ (Fig. 6A and B). These data suggest that TQ inhibits superoxide production in fMLF-stimulated neutrophils by impairing the phosphorylation of p47^{PHOX} and thus preventing the activation of NADPH oxidase.

3.4. TQ inhibits fMLF-induced granules exocytosis in human PMN

Exocytosis of specific and azurophilic granules also plays a pivotal role in several neutrophil functions by modifying the molecular composition of the targeted membrane [25]. The effect of TQ on fMLF-induced specific granules exocytosis was evaluated by measuring the membrane expression of gp91^{PHOX} and CD11b, which are both contained in these granules. Flow cytometry analysis, using PE-conjugated anti-human CD11b monoclonal antibody and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human flavocytochrome b558 monoclonal antibody 7D5 showed that TQ was able to reduce both gp91^{PHOX} and CD11b surface expression (Fig. 7A and B). This inhibition was strongly significant at 1 and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of TQ as the signal obtained was equal to that from unstimulated neutrophils. In presence of 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of TQ, CD11b membrane expression was even lower than its basal expression

in resting neutrophils ($p < 0.05$) (Fig. 7B). These data suggest that TQ inhibits fMLF-induced specific granules release. However TQ had no effect on PMA-induced neutrophils specific granule exocytosis (Fig. 8). This suggests that PMA involves a pathway that was not inhibited by TQ regarding this function. Next, the effect of TQ on fMLF-induced azurophilic granule exocytosis was analyzed by evaluating the extracellular release of MPO in the supernatant. Western-blot analysis of supernatants using an anti-MPO specific antibody showed that TQ exerted a strong and significant inhibitory effect on the extracellular release of MPO ($p < 0.01$) (Fig. 7C) from 1 $\mu\text{g/ml}$ of TQ. Therefore, in addition to its inhibitory effect on fMLF-induced ROS production, TQ also prevented fMLF-induced specific and azurophilic granule release, though a higher TQ dose was required.

3.5. Effect of TQ on the intracellular signaling pathways stimulated by fMLF

In neutrophils, ROS production and degranulation induced by fMLF are under the control of several intracellular signaling pathways. In particular, Protein Kinase C has been shown to be involved in fMLF-induced ROS production and p47^{PHOX} phosphorylation [7], while MAPK pathway is involved in fMLF-induced degranulation [26]. As these functions were inhibited by TQ, we investigated whether TQ was able to prevent activation of these pathways. First, the effect of TQ on PKC activation in fMLF-stimulated neutrophils was analyzed. As PKC activity is regulated in part through autophosphorylation of Ser-660 that is located at the carboxy-terminal site common to many PKC isoforms, a specific antibody directed against this site was used. As shown in Fig. 9A, the antibody recognizes three phospho-proteins of approximately 60–85 kDa. All three proteins were also recognized by an anti-PKC-pan antibody, indicating that they correspond to different PKC isoforms. Among these three isoforms, phosphorylation of the two lower ones, bands 2 and 3, was significantly decreased by TQ in a concentration-dependent manner (Fig. 9A–C), while

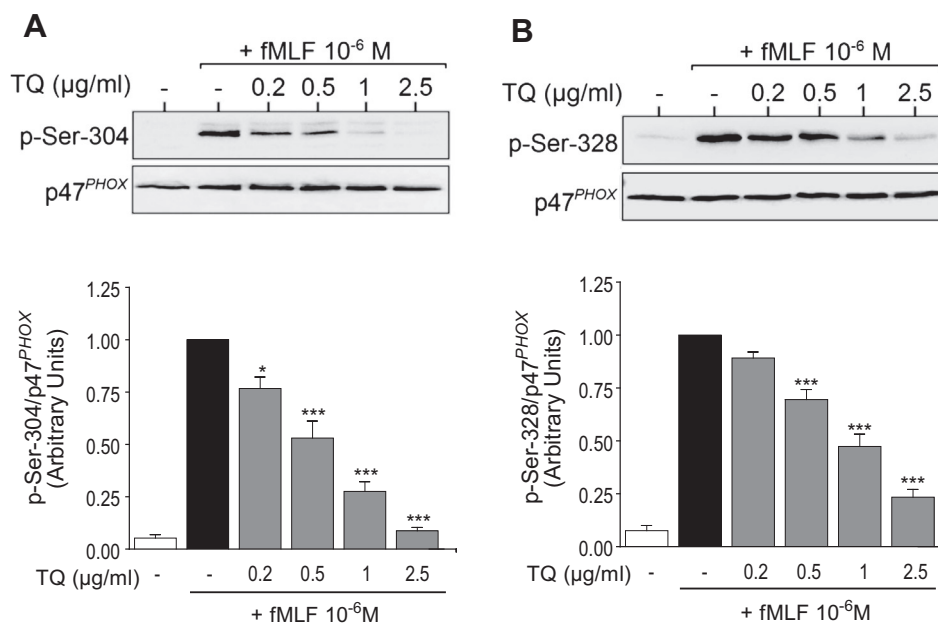


Fig. 6. TQ inhibits fMLF-induced phosphorylation of p47^{PHOX} on serine 304 (A) and serine 328 (B). PMN (5×10^6 in 500 μl of HBSS) were incubated with increasing concentrations of TQ at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min, then stimulated with fMLF (10^{-6} M) for 10 s. The reaction was stopped by adding 5X concentrated modified Laemmli sample buffer. After denaturation, the cell lysates (eq. of 4×10^5 cells/well) were subjected to SDS-PAGE (10%) and analyzed by Western blotting using specific rabbit anti-phospho-Ser304p47^{PHOX} and anti-phospho-Ser328p47^{PHOX} polyclonal antibodies. The blots were reprobed with rabbit anti-p47^{PHOX} antibody as loading control. The ratio of phospho-p47^{PHOX} to the total amount of p47^{PHOX} was quantified using Image J 1.43u software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Values are expressed as Mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.005$ as compared to the control (fMLF-stimulated PMN).

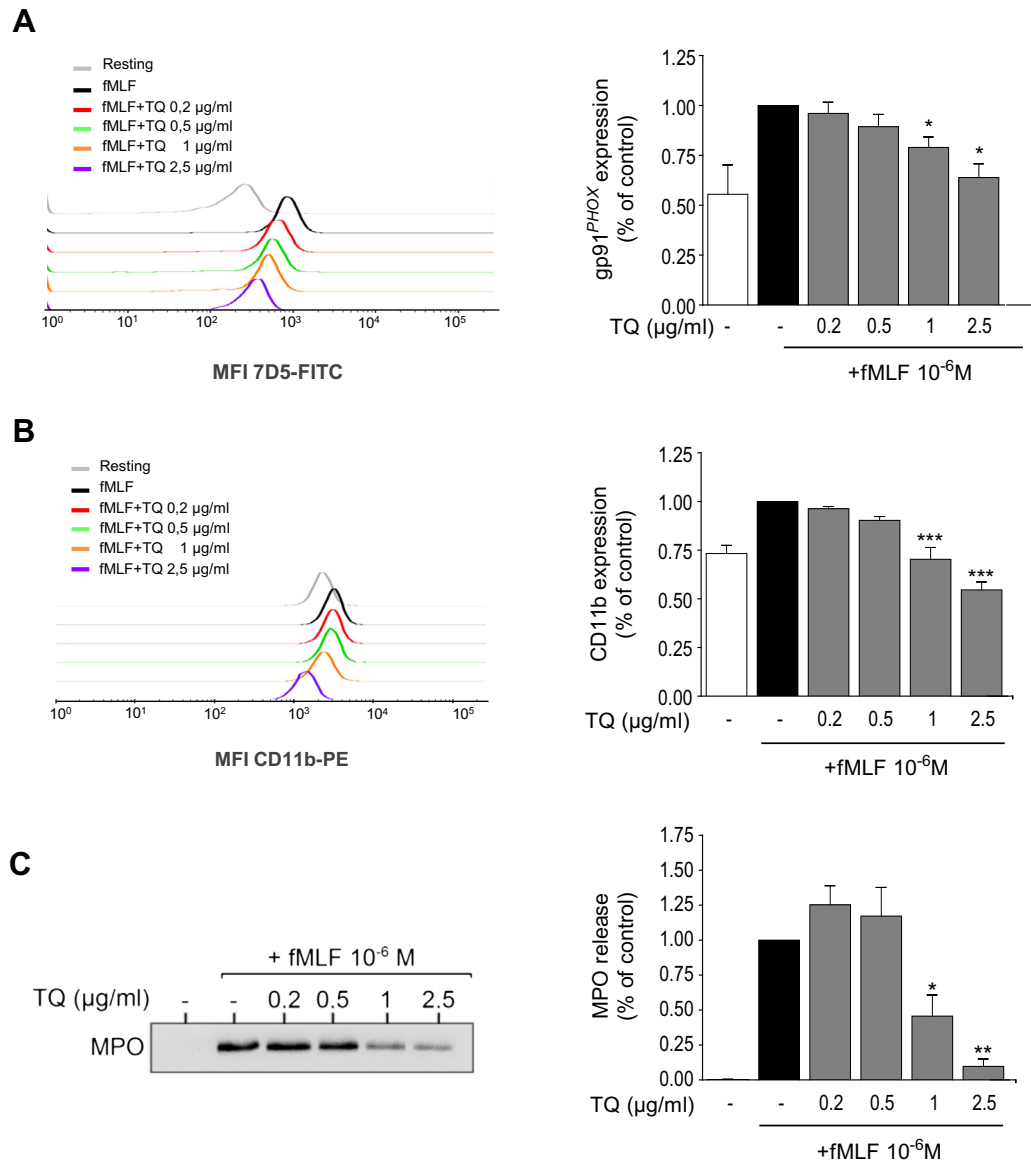


Fig. 7. TQ inhibits fMLF-induced degranulation of PMN. TQ inhibits specific granule release as shown by the decrease in the cell surface expression of gp91^{PHOX} (A) and CD11b (B). Neutrophils (5×10^6 /ml in HBSS) were incubated with or without increasing concentrations of TQ for 15 min prior to stimulation with fMLF (10^{-6} M) for 5 min at 37 °C. Cells were then stained with FITC-conjugated anti-gp91^{PHOX} or PE-conjugated anti-CD11b antibodies for 15 min at 4 °C and analyzed by flow cytometry. *Right:* Results were expressed as percentage of control (fMLF-stimulated PMN); *Left:* representative graph of FACS data; (C) TQ inhibits MPO-containing azurophilic granule release. Neutrophils (20×10^6 /ml in HBSS) were pretreated or not with TQ for 15 min. Degranulation of azurophilic granules was triggered by 10^{-6} M fMLF for 2 min in the presence of 5 µg/ml of cytochalasin B. PMN were removed by a 30-s centrifugation at 13,000 rpm, and MPO in the supernatant was detected by Western blotting and quantified using Image J 1.43u software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The values on histograms are the means of 3–4 independent experiments $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.005$ versus TQ-untreated control.

phosphorylation of the upper band seems to be barely affected (Fig. 9A). These data show that TQ is able to inhibit the activity of some of the PKC isoforms. The effect of TQ on MAP Kinases activation (ERK1/2 and p38 MAPK) in fMLF-stimulated neutrophils was then analyzed with phospho-MAPK antibodies. As shown in Fig. 10A and B, the strong phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK induced by fMLF was significantly reduced by increasing concentrations of TQ. As calcium is an important second messenger for degranulation [26], we also examined whether TQ inhibited fMLF-induced intracellular calcium changes in PMN. Fig. 11 shows that fMLF induced a transient and sharp increase in intracellular calcium as expected (Fig. 11, left). Surprisingly, TQ by itself induced a slow but significant increase in intracellular calcium which masked the increase induced by fMLF. Indeed, upon stimulation of PMN with

fMLF in the presence of TQ, a further increase in intracellular calcium was observed but the peak was less visible due to the own effect of TQ (Fig. 11, right). Therefore it seems that TQ did not inhibit fMLF-induced intracellular calcium increase, rather it induced a calcium increase on its own.

These data suggest that the inhibitory effects of TQ on fMLF-induced ROS production, p47^{PHOX} phosphorylation and granule release might be due to the inhibition of the PKC and MAP Kinase pathways.

3.6. TQ inhibits λ -carrageenan induced pleurisy in rats

Pleurisy induced by carrageenan (CG) is a well-known model of experimental inflammation, which is characterized by massive

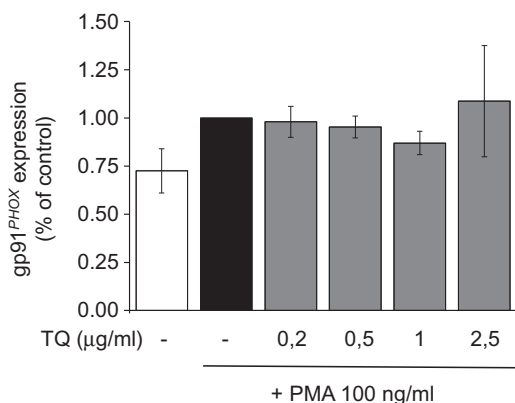


Fig. 8. TQ does not affect PMA-induced specific granules exocytosis in human PMN. Effect of TQ on specific granule release was shown by analyzing the cell surface expression of gp91^{PHOX}. Neutrophils (5×10^6 /ml in HBSS) were incubated with or without increasing concentrations of TQ for 15 min prior to stimulation with PMA (100 ng/ml) for 8 min at 37 °C. Cells were then stained with FITC-conjugated anti-gp91^{PHOX} for 15 min at 4 °C and analyzed by flow cytometry. The values on histograms are the means of 3 independent experiments.

infiltration of PMN and ROS-induced injury to the lung [22,27]. The resulting oxidative stress leads to activation of redox-sensitive transcription factors, such as nuclear factor- κ B (NF- κ B), which controls the expression of inflammatory cytokines and chemokines thereby amplifying the recruitment of PMN and the severity of the inflammatory response [28]. This model has been widely used to investigate the pathophysiology of acute inflammation and to evaluate the efficacy of drugs in inflammation, but TQ has never been tested in this model. In order to determine if TQ exerts an anti-inflammatory effect in this *in vivo* model of acute inflammation, rats were treated with 10 and 50 mg/kg TQ prior to the intrapleural injection of λ -carrageenan. Results in Fig. 12 showed that TQ significantly attenuated in a concentration-dependent manner the lung inflammation induced by intrapleural injection of λ -carrageenan as shown by the decreased number of neutrophils in the pleural space. Thus, TQ not only inhibits PMN functions, but also exerts anti-inflammatory properties *in vivo*.

4. Discussion

N. sativa, also known as black seed or black cumin, is one of the most used plants in traditional medicine in the Mediterranean region and West Asia [29,30]. Its biological activities have been attributed to thymoquinone (TQ), the most abundant constituent of the seed essential (volatile) oil (30–48%) [15]. TQ has been shown to exert anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-neoplastic effects [30], and therefore holds interesting therapeutic potential. However, its mode of action and targets are still unclear.

In the present study, we show that TQ strongly inhibits fMLF-induced neutrophil functions, including superoxide production and granules exocytosis by affecting PKC and MAPK pathways.

Contrary to previous studies [31,32], we could not find any scavenging effect of TQ on superoxide anion. Indeed, production of superoxide anion followed by reduction of cytochrome C in the cell-free xanthine/xanthine oxidase system was not affected at any of the TQ concentrations used. Furthermore, the absence of scavenging effect of TQ on superoxide anion was supported by the fact that TQ was unable to inhibit the activity of the pre-assembled NADPH oxidase. In addition, we checked that TQ itself could not reduce directly cytochrome C. The reason for this discrepancy is not clear, except that in previous studies tetrazolium salts, NBT (nitroblue tetrazolium) and INT (iodophenyl-nitrophenyl-phenyltetrazolium), were used as the

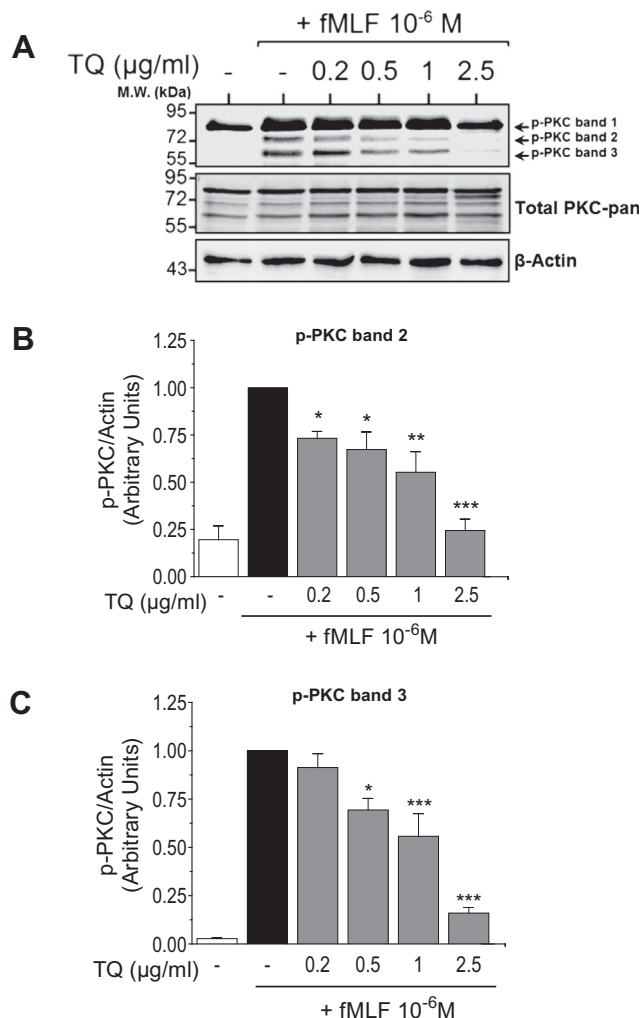


Fig. 9. TQ inhibits fMLF-induced phosphorylation of PKC. PMN (5×10^6 in 500 μl of HBSS) were incubated with increasing concentrations of TQ at 37 °C for 15 min, and then stimulated with fMLF (10^{-6} M) for 3 min. The reaction was stopped by adding 5X concentrated modified Laemmli sample buffer. After denaturation, the cell lysates (eq. of 4×10^5 cells/well) were subjected to SDS-PAGE (10%) then analyzed by Western blotting using specific rabbit anti-phospho Ser660-PKC-pan and PKC-pan antibodies (A). The blots were reprobed with a mouse anti-β-Actin antibody as loading control. The ratio of phosphorylated PKC to β-Actin was quantified using Image J 1.43u software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) (B and C). Values are expressed as Mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$ as compared to control (fMLF-stimulated PMN).

electron acceptor instead of cytochrome C. Cytochrome C is the only acceptor to be reduced by one electron and is therefore more specific for superoxide anion. Reduction of tetrazolium salts requires two electrons and results in the formation of formazan, an insoluble precipitate, rendering the quantitation more difficult; therefore, we believe that following cytochrome C reduction is more reliable.

TQ has also been shown to react slowly with NADPH in a spontaneous reaction [33]. Thus, one possibility is that TQ could inhibit the neutrophil NADPH oxidase activity by depleting NADPH. However, this reaction occurs very slowly after several hours [33], whereas the inhibitory effect of TQ on fMLF-induced NADPH oxidase activation takes place very quickly after a few minutes of pre-incubation with TQ, making it unlikely to be the cause of the NADPH oxidase activity inhibition. In addition, the fact that TQ did not affect the cell-free system with the pre-assembled active NADPH oxidase complex performed in the presence of exogenously added NADPH supports this view.

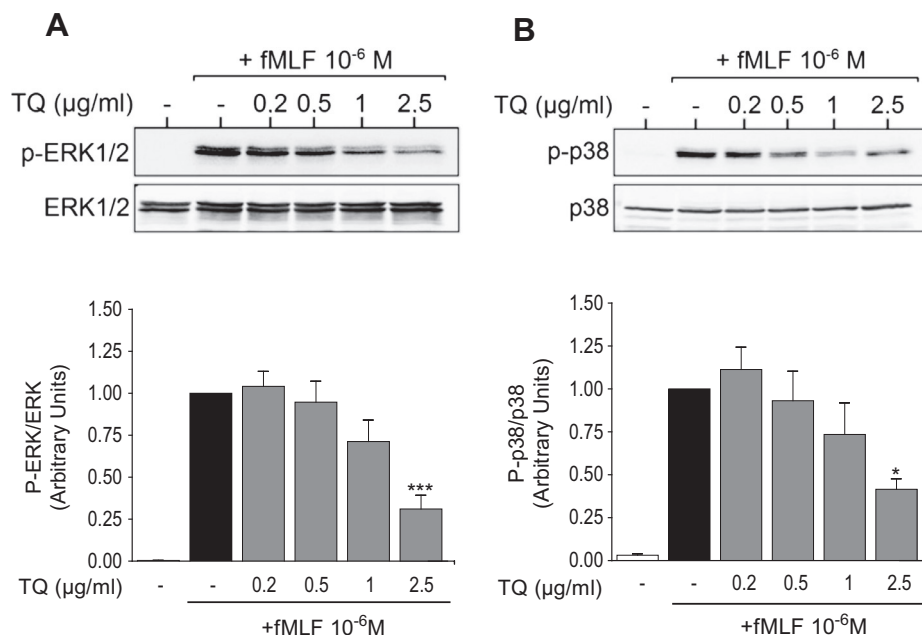


Fig. 10. TQ inhibits fMLF-induced phosphorylation of ERK1/2 (A) and p38 MAPK (B). PMN (5×10^6 in 500 μ l of HBSS) were incubated with increasing concentrations of TQ at 37 °C for 15 min, and then stimulated with fMLF (10^{-6} M) for 3 min. The reaction was stopped by adding 5X concentrated modified Laemmli sample buffer. After denaturation, the cell lysates (eq. of 4×10^5 cells/well) were subjected to SDS-PAGE (10%) then analyzed by Western blotting using specific rabbit anti-phospho-ERK1/2 and anti-phospho-p38MAPK antibodies. The blots were reprobbed with rabbit anti-ERK1, anti-ERK2 and anti-p38 antibodies as loading controls. The ratio of phosphorylated ERK1/2 or phosphorylated p38 MAPK to the total amount of ERK1/2 or p38MAPK was quantified using Image J 1.43u software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Values are expressed as Mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$ as compared to control (fMLF-stimulated PMN).

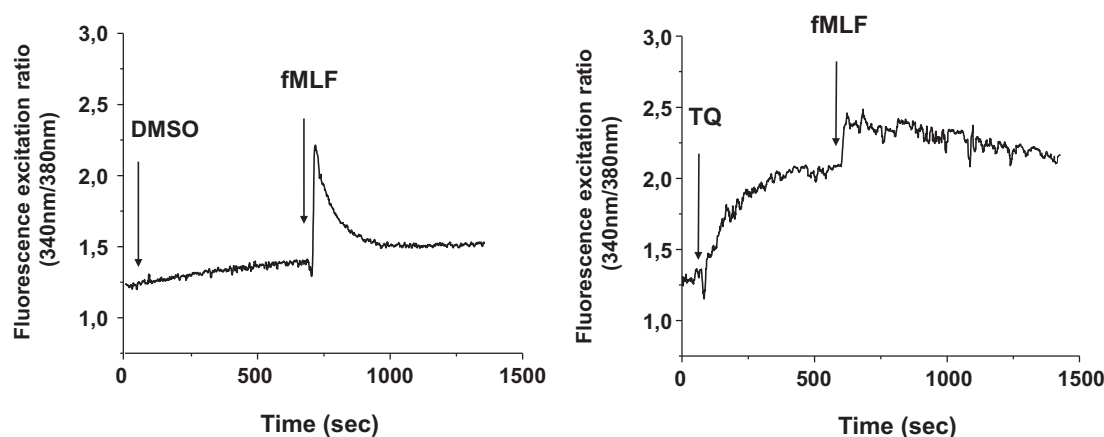


Fig. 11. Effect of TQ on fMLF-induced intracellular calcium changes. Intracellular calcium was measured with Fura-2/AM. Neutrophils (2.5×10^6 cells/ml) in HBSS were loaded with 5 μ mol/L Fura-2/AM for 45 min at 37 °C. They were then washed in HBSS, and changes in intracellular Ca^{2+} induced by fMLF (10^{-6} M) were monitored in the presence (right) or absence (left) of TQ 1 μ g/ml. Fluorescence was measured using a dual-wavelength excitation fluorimeter at 340 and 380 nm for excitation and 510 nm for emission. Results are representative of 3 experiments.

In fact, our work shows that TQ inhibits fMLF-induced ROS production by interfering with the activation of the NADPH oxidase complex. Indeed, TQ significantly inhibits p47^{PHOX} phosphorylation on Ser-304 and Ser-328, a process which is essential for the activation of the NADPH oxidase [23,24]. These two serine residues are located in a PKC consensus phosphorylation site [7], and TQ also inhibits PKC phosphorylation. Three phospho-PKC bands, probably corresponding to different PKC isoforms, were identified. Neutrophils indeed express five PKC isozymes, α , β I, β II, δ and ζ [34,35]. Among these isotypes, PKC α , β II, and δ were shown to phosphorylate all the major PKC sites on p47^{PHOX} while PKC ζ was shown to phosphorylate only a subset of selective sites, in particular Ser-303/304 [36,37]. Along with their ability to

phosphorylate p47^{PHOX}, PKC α , β II, δ and ζ , have been shown to induce NADPH oxidase activation in cell-free system [37]. Although the identity of the PKC isotypes targeted by TQ remains to be determined, we can conclude that TQ probably prevents NADPH oxidase activation by impairing PKC-dependent phosphorylation of p47^{PHOX}, at least on serine 304 and 328.

We observed that TQ inhibits both PKC phosphorylation and fMLF-induced p47^{PHOX} over a concentration range that is higher than the one effective for inhibiting superoxide production, suggesting that other mechanisms may be involved in the inhibitory effect of TQ regarding fMLF-induced superoxide production. Rac-2 activation does not seem to be affected by TQ as its translocation towards the plasma membrane was not prevented by TQ in

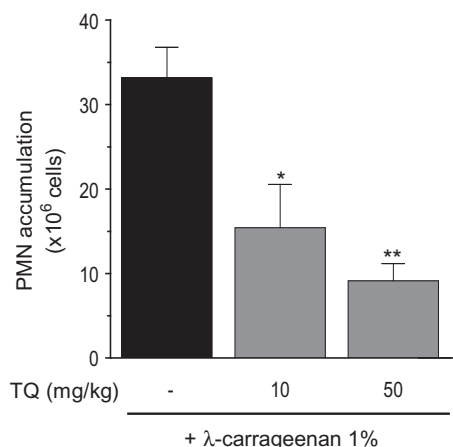


Fig. 12. TQ inhibits λ -carrageenan induced pleurisy. Animals were treated or not intraperitoneally with TQ 1 h prior to the induction of pleural inflammation by λ -carrageenan 1%. The exudate in the pleural cavity was recovered and the neutrophils counted. The results are expressed as means of 6 rats, values $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ versus TQ-untreated control.

fMLF-stimulated neutrophils (data not shown). Actually, we found that TQ was also able to inhibit specific granules exocytosis in fMLF-stimulated neutrophils as evidenced by the decrease of cell surface expression of gp91^{PHOX} and CD11b. The decrease of gp91^{PHOX} mobilization at the cell surface by TQ could affect NADPH oxidase assembly. Thus, the strong inhibitory effect of TQ on superoxide generation by neutrophils could result from a synergic effect of TQ on both processes, phosphorylation of p47^{PHOX} by PKC and mobilization of gp91^{PHOX} at the cell surface.

PMA is a direct activator of PKC; As TQ was shown to target PKC, it was expected that TQ prevents both superoxide generation and granules exocytosis induced by PMA. However only superoxide generation was inhibited by PMA. This might reflect a differential effect of TQ on the different isoforms of PKC or to an effect of PMA on a pathway other than PKC that remains to be characterized. fMLF-induced degranulation in neutrophils has been shown to be regulated by the MAP Kinases, especially p38MAPK [38]. We indeed found that the inhibitory effect of TQ on specific and azurophilic granules exocytosis correlated with its inhibitory effect on p38 MAPK phosphorylation. Thus, TQ may inhibit granule release in fMLF-stimulated PMN by inhibiting p38 MAPK. The inhibitory effect of TQ on p38 MAPK has also been observed in TNF α -stimulated fibroblasts isolated from the synovium of patient with rheumatoid arthritis [39]. Though ERK1/2 do not appear to be involved in fMLF-induced degranulation in neutrophils [38,40], we found that TQ inhibited their phosphorylation. The role of ERK1/2 in neutrophils is still unclear. There are controversial data regarding their role in fMLF-induced functions. For example, Hii et al. [40] showed that the ERK cascade is involved in neutrophil migration in response to fMLF, while Coffey et al. [41] showed that it was not.

Finally, we showed that, TQ not only inhibits PMN functions *in vitro*, it also exerts anti-inflammatory properties *in vivo* in a model of pleurisy induced by λ -carrageenan in rats, which is characterized by a massive infiltration of PMN and ROS-induced injury of the lung [22,27]. Our data show that TQ abolishes the accumulation of PMN in the pleural space in this model. This could be due to the impairment of neutrophil activation by TQ. Indeed, ROS can activate redox-sensitive transcription factors such as NF- κ B, which can control the expression of inflammatory cytokines and chemokines, thus favoring the recruitment of immune cells. Therefore, ROS generated by neutrophils may amplify their own recruitment and increase the severity of the inflammatory response [28]. However, we cannot exclude the possibility that TQ abolished the accumulation of PMN in this model by inhibiting

neutrophil migration or by exerting other anti-inflammatory mechanisms.

TQ has been shown to exert a beneficial effect in a variety of other inflammatory models. This includes experimental airway inflammation, arthritis [42,43] and ischaemia/reperfusion (I/R) induced gastric lesion [44]. The proposed mechanisms underlying the anti-inflammatory activity of TQ include the decrease in the production of leukotrienes and inhibition of cyclo-oxygenase and lipoxygenase activity by leukocytes [45], but also the decrease of pro-inflammatory cytokines expression such as IL-1 β and TNF- α [43]. Our study showed that inhibition of superoxide generation and granules exocytosis by PMN is another mechanism by which TQ could exert its anti-inflammatory effect. Indeed, excessive production and accumulation of ROS, which are highly unstable and reactive molecules, may induce tissue injury through oxidative damage of cellular macromolecules resulting in lipid peroxidation, DNA oxidation and protein oxidation [46], while exocytosis of azurophilic and specific granules results in the release of proteolytic enzymes which, together with ROS, contribute to tissue damage at the inflammatory sites. Through the inhibition of these processes, TQ may limit the pathological inflammatory response.

Taken together, our data show that TQ strongly inhibits p47^{PHOX} phosphorylation, superoxide anion production and granules exocytosis in fMLF-stimulated neutrophils. This was associated with inhibition of PKC and MAP Kinases, the upstream signaling pathways involved in the regulation of these processes. Furthermore, TQ had a protective effect *in vivo* in a model of pleurisy induced by λ -carrageenan in rats by inhibiting PMN accumulation to the inflammatory site. Thus, one of the mechanisms through which TQ exerts its anti-inflammatory effect involves the inhibition of neutrophil function. In this regard, TQ holds promising therapeutic potential and needs to be investigated further.

Acknowledgements

The authors wish to thank Martine Torres for her editorial help. This work was supported by Inserm and CNRS.

References

- [1] W.M. Nauseef, N. Borregaard, Neutrophils at work, *Nat. Immunol.* 15 (7) (2014) 602–611.
- [2] W.L. Lee, R.E. Harrison, S. Grinstein, Phagocytosis by neutrophils, *Microbes Infect.* 5 (14) (2003) 1299–1306.
- [3] W.M. Nauseef, How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view, *Immunol. Rev.* 219 (2007) 88–102.
- [4] B.M. Babior, NADPH oxidase: an update, *Blood* 93 (5) (1999) 1464–1476.
- [5] H. Sumimoto, K. Miyano, R. Takeya, Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (1) (2005) 677–686.
- [6] Y. Groemping, K. Rittinger, Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective, *Biochem. J.* 386 (2005) 401–416.
- [7] J. El Benna, L.P. Faust, B.M. Babior, The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases, *J. Biol. Chem.* 269 (38) (1994) 23431–23436.
- [8] M.T. Quinn, K.A. Gauss, Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 760–781.
- [9] P.M. Dang, A.R. Cross, B.M. Babior, Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (6) (2001) 3001–3005.
- [10] W.M. Nauseef, Assembly of the phagocyte NADPH oxidase, *Histochem. Cell Biol.* 122 (2004) 277–291.
- [11] J. El Benna, L.P. Faust, J.L. Johnson, B.M. Babior, Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6374–6378.
- [12] G.M. Bokoch, Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6 (1994) 212–218.
- [13] A. Sheshachalam, N. Srivastava, T. Mitchell, P. Lacy, G. Eitzen, Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils, *Front. Immunol.* 5 (2014) 448.

- [14] H.L. Wright, R.J. Moots, R.C. Bucknall, S.W. Edwards, Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases, *Rheumatology* 49 (9) (2010) 1618–1631.
- [15] C.C. Woo, A.P. Kumar, G. Sethi, K.H. Tan, Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer, *Biochem. Pharmacol.* 83 (4) (2012) 443–451.
- [16] S. Darakhshan, A. Bidmeshki Pour, A. Hosseinzadeh Colagar, S. Sisakhtnezhad, Thymoquinone and its therapeutic potentials, *Pharmacol. Res.* 95–96C (2015) 138–158.
- [17] P.M. Dang, A. Stensballe, T. Boussetta, H. Raad, C. Dewas, Y. Kroviarski, et al., A specific p47phox-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites, *J. Clin. Invest.* 116 (7) (2006) 2033–2043.
- [18] T. Boussetta, M.A. Gougerot-Pocidalo, G. Hayem, S. Ciappelloni, H. Raad, R. Arabi Derkawi, et al., The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- α -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils, *Blood* 116 (26) (2010) 5795–5802.
- [19] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (5259) (1970) 680–685.
- [20] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1979) 4350–4354.
- [21] A. Al-Ali, A.A. Alkhawajah, M.A. Randhawa, N.A. Shaikh, Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats, *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad* 20 (2) (2008) 25–27.
- [22] A.R. Moore, Pleural models of inflammation: immune and nonimmune, *Methods Mol. Biol.* 225 (2003) 123–128.
- [23] T. Ago, H. Nunoi, T. Ito, H. Sumimoto, Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33644–33653.
- [24] T. Ago, F. Kuribayashi, H. Hiroaki, R. Takeya, T. Ito, D. Kohda, et al., Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (8) (2003) 4474–4479.
- [25] M. Faurschou, N. Borregaard, Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation, *Microbes Infect.* 5 (14) (2003) 1317–1327.
- [26] P. Lacy, Mechanisms of degranulation in neutrophils, *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2 (3) (2006) 98–108.
- [27] S. Cuzzocrea, M.C. McDonald, H.M. Filipe, G. Costantino, E. Mazzon, S. Santagati, A.P. Caputi, C. Thiemermann, Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy, *Eur. J. Pharmacol.* 390 (2000) 209–222.
- [28] G. Gloire, S. Legrand-Poels, J. Piette, NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later, *Biochem. Pharmacol.* 72 (11) (2006) 1493–1505.
- [29] M. El-Dakhakhny, Studies on the chemical constitution of Egyptian *N. sativa* L. seeds, *Planta Med.* 11 (1963) 465–470.
- [30] H. Gali-Muhtasib, A. Roessner, R. Schneider-Stock, Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (8) (2006) 1249–1253.
- [31] M.A. Mansour, M.N. Nagi, A.S. El-Khatib, A.M. Al-Bekairi, Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action, *Cell Biochem. Funct.* 20 (2) (2002) 143–151.
- [32] O.A. Badary, R.A. Taha, A.M. Gamal el-Din, M.H. Abdel-Wahab, Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger, *Drug Chem. Toxicol.* 26 (2) (2003) 87–98.
- [33] K.H. Khalife, G. Lupidi, Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions, *Free Radic. Res.* 41 (2) (2007) 153–161.
- [34] P.M. Dang, J. Hakim, A. Périanin, Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils, *FEBS Lett.* 349 (3) (1994) 338–342.
- [35] J.D. Kent, S. Sergeant, D.J. Burns, L.C. McPhail, Identification and regulation of protein kinase C- δ in human neutrophils, *J. Immunol.* 157 (10) (1996) 4641–4647.
- [36] P.M. Dang, A. Fontayne, J. Hakim, J. El Benna, A. Périanin, Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst, *J. Immunol.* 166 (2) (2001) 1206–1213.
- [37] A. Fontayne, P.M. Dang, M.A. Gougerot-Pocidalo, J. El Benna, Phosphorylation of p47phox Sites by PKC α , β II, δ , and ζ : effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation, *Biochemistry* 41 (2002) 7743–7750.
- [38] A. Mócsai, Z. Jakus, T. Vántus, G. Berton, C.A. Lowell, E. Ligeti, Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases, *J. Immunol.* 164 (8) (2000) 4321–4331.
- [39] S. Umar, O. Hedaya, A.K. Singh, S. Ahmed, Thymoquinone inhibits TNF- α -induced inflammation and cell adhesion in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by ASK1 regulation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 287 (3) (2015) 299–305.
- [40] C.S. Hii, K. Stacey, N. Moghaddami, A.W. Murray, A. Ferrante, Role of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in human neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and in migration, *Infect. Immun.* 67 (3) (1999) 1297–1302.
- [41] P.J. Coffer, N. Geijsen, L. M'rabet, R.C. Schweizer, T. Maikoe, J.A. Raaijmakers, et al., Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function, *Biochem. J.* 329 (Pt 1) (1998) 121–130.
- [42] M.L. Salem, Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed, *Int. Immunopharmacol.* 5 (2005) 1749–1770.
- [43] F. Vaillancourt, P. Silva, Q. Shi, H. Fahmi, J.C. Fernandes, M. Benderdour, Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis, *J. Cell. Biochem.* 112 (2011) 107–117.
- [44] M.A. Magdy, el-A Hanan, el-M Nabila, Thymoquinone: novel gastroprotective mechanisms, *Eur. J. Pharmacol.* 697 (1–3) (2012) 126–131.
- [45] P.J. Houghton, R. Zarka, B.D.L. Heras, J.R. Houlst, Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation, *Planta Med.* 61 (1995) 33–36.
- [46] M. Schieber, N.S. Chandel, ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Biol.* 24 (10) (2014) R453–R462.

Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of *Nigella Sativa* Seed Extracts *In Vitro* and *In Vivo*

Asma Meziti, Hicham Meziti, Kaouthar Boudiaf, Benboubetra Mustapha, Hemama Bouriche.

Abstract—*Nigella sativa* L. is an aromatic plant belonging to the family Ranunculaceae. It has been used traditionally, especially in the middle East and India, for the treatment of asthma, cough, bronchitis, headache, rheumatism, fever, influenza and eczema. Several biological activities have been reported in *Nigella sativa* seeds, including antioxidant. In this context we tried to estimate the antioxidant activity of various extracts prepared from *Nigella sativa* seeds, methanolic extract (ME), chloroformic extract (CE), hexanic extract (HE : fixed oil), ethyl acetate extract (EAE) water extract (WE). The Folin-Ciocalteu assay showed that CE and EAE contained high level of phenolic compounds 81.31 and 72.43 µg GAE/mg of extract respectively. Similarly, the CE and EAE exhibited the highest DPPH radical scavenging activity, with IC₅₀ values of 106.56 µg/ml and 121.62 µg/ml respectively. In addition, CE and HE showed the most scavenging activity against superoxide radical generated in the PMS-NADH-NBT system with respective IC₅₀ values of 361.86 µg/ml and 371.80 µg/ml, which is comparable to the activity of the standard antioxidant BHT (344.59 µg/ml). Ferrous ion chelating capacity assay showed that WE, EAE and ME are the most active with 40.57, 39.70 and 22.02 mg EDTA-E/g of extract. The inhibition of linoleic acid/β-carotene coupled oxidation was estimated by β-carotene bleaching assay, this showed a highest relative antioxidant activity with CE and EAE (69.82% of inhibition). The antioxidant activities of the methanolic extract and the fixed oil are confirmed by an *in vivo* assay in mice, the daily oral administration of methanolic extract (500 and 800 mg/kg/day) and fixed oil (2 and 4 ml/kg/day) during 21 days, resulted in a significant enhancement of the blood total antioxidant capacity (measured by KRL test) and the plasmatic antioxidant capacity towards DPPH radical.

Keywords—Antioxidant Capacity, Chelating, Phenolic Compounds, *Nigella Sativa*, Scavenger

I. INTRODUCTION

IT is commonly recognized that reactive oxygen species (ROS) are involved in a variety of physiological processes, including cellular signal transduction, cell proliferation, differentiation and apoptosis [1]-[2]. In healthy individuals, ROS production is continuously balanced by natural antioxidative defence systems. Oxidative stress is a process where the physiological balance between pro-oxidants and antioxidant is disrupted in favor of the former, ensuing in potential damage for the organism [3]. ROS production can induce DNA damage, protein carbonylation, and lipid peroxidation, leading to a variety of chronic health problems, such as cancer, aging, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis [4]-[5].

A. Meziti. is with the laboratory of applied biochemistry, Department of biochemistry, Setif University, CP 19000, Algeria (e-mail: asma84_misa@yahoo.fr).

H.Meziti, K.boudiaf. M.benboubetra and H.bouriche, are with the laboratory of applied biochemistry, Department of biochemistry, Setif University, CP 19000, Algeria.

Dietary antioxidant intake may be an important strategy for inhibiting or delaying the oxidation of susceptible cellular substrates, and is thus relevant to disease prevention in many paradigms. Phenolic compounds such as flavonoids, phenolic acids and tannins have received attention for their high antioxidative activity [6]. There has been an increasing interest in the use of natural antioxidants, such as tocopherols, flavonoids and plant extracts for the preservation of food materials in recent years, because these natural antioxidants avoid the toxicity problems which may arise from the use of synthetic antioxidants, such as butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT) and propyl gallate (PG) [7]-[8]. Plants, including herbs and spices, have many phytochemicals which are potential sources of natural antioxidants, *Nigella sativa* L. is a spices plant belonging to the family Ranunculaceae. It has been used traditionally, especially in the Middle East and India, for the treatment of asthma, cough, bronchitis, headache, rheumatism, fever, influenza and eczema [9].

The objective of the present study was to evaluate the antioxidant activity of *Nigella sativa* seed extracts *in vitro* and *in vivo*.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Materials

1. Chemicals

PMS (Phenazine-Methosulphate), β-NADH (β-Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide), NBT (Nitroblue-Tetrazolium), Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonicacid)-1,2,4-triazine), FeCl₂, Tween40, *t*-BHP (tert-butyl hydroperoxide), Gallic acid, Quercetin, BHT (butylated hydroxytoluen), α-tocophérol, and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from de Sigma. DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), linoleic acid and β-carotene were obtained from Fluka. All other chemicals and solvents used were of analytical grade

2. Animals

Swiss albino mice weighing 20–25 g were purchased from Pasteur Institute of Algiers, Algeria. The mice were divided into different groups each consists of 6-9 animals, and were allowed to acclimatize to the animal room conditions for one week and had free access to food and water *ad libitum*.

3. Plant material

Nigella sativa seeds were harvested in June 2007 from Bordj Bou Arréridj, Algeria. The plant material was identified by Dr. Houssine Laouar, University of Setif. The voucher specimen was deposited at the laboratory of botanic in the

University of Sétif, Algeria. The fixed oil of *Nigella sativa* seed was purchased from a local herbstore.

B. Methods

1. Preparation of *Nigella Sativa* Seeds Extracts

100 g of seeds were ground to powder and soaked in 70% aqueous-methanol (1/10, w/v) for 24 hours with frequent agitation. After filtration and solvent evaporation in a rotary evaporator, the methanolic extract (ME) was further fractionated through solvent-solvent partitioning to obtain different fractions according to the operation flowchart given in “Fig. 1” The solvents used to achieve low to high polarity for solvent-solvent partitioning were hexane, chloroform, and ethyl acetate. After solvent evaporation, The ME and its four fractions of hexane (HE) chloroform (CE) ethyl acetate (EAE) and water (WE). Were stored in darkness at 4 C°.

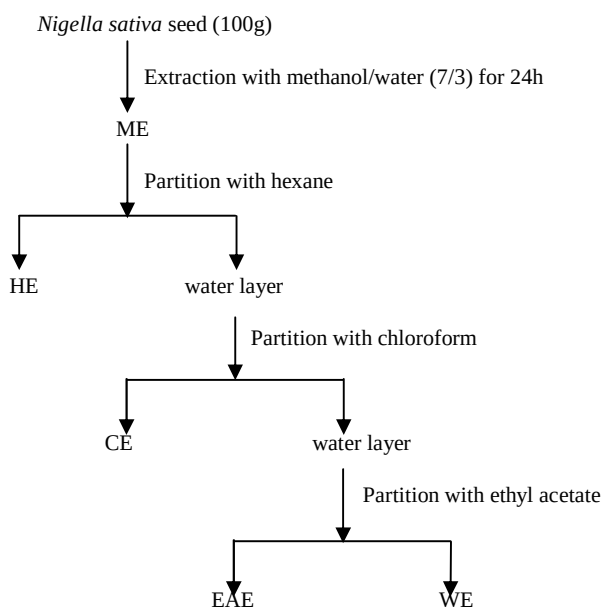


Fig. 1 Preparation of *Nigella sativa* seed extracts

2. Determination of Total Phenolics

Total phenolic content was estimated by the Folin–Ciocalteu method [10]. Two hundred microlitres of diluted sample were added to 1 ml of 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent. After 4 min, 800 µl of saturated sodium carbonate (75 g/l) was added. After 2 h of incubation at room temperature, the absorbance at 765 nm was measured. Gallic acid (0–160 µg/ml) was used for the standard calibration curve. The results were expressed as Gallic acid equivalent (GAE)/g extracts.

3. Determination of Total Flavonoids

The total flavonoid content was determined according as the aluminum chloride colorimetric method described by Bahorun *et al.* [11]. Briefly, 1 ml of 2% aluminium trichloride (AlCl₃) in methanol was mixed with the same volume of extracts, Absorption readings at 430 nm were taken after 10 min against a blank sample consisting of a 1 mL extract solution with 1 ml

methanol without AlCl₃. Quercetin was used for the standard calibration curve. The data were expressed as milligram Quercetin equivalents (QE)/g extract.

4. Antioxidant Activity In Vitro

i. DPPH Free Radical Scavenging Assay

The radical scavenging assay was conducted as described by Mansouri *et al.* [12]. The DPPH solution was prepared by dissolving 2.5 mg DPPH in 100 ml of methanol. 25 µl of extract or standard antioxidant (quercetin, BHT) were added to 975 µL of DPPH solution. The mixture was shaken vigorously and incubated for 30 min in the dark at room temperature and the decreases in the absorbance values were measured at 517 nm. The percentage of DPPH scavenging activity was calculated using the following equation.

$$\% \text{DPPH scavenging activity} = 100(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})$$

Where A_{control} is the absorbance of the control reaction mixture without the test compounds, and A_{sample} is the absorbance of the test compounds. IC₅₀ values, which represented the concentration of the extract that caused 50% neutralization of DPPH radicals, were calculated from the plot of inhibition percentages against concentration.

ii. Superoxide Anion Scavenging Assay

The superoxide scavenging ability of *Nigella sativa* seed extract was assessed according to the method of Ani *et al.* [13] Superoxide anions were generated in samples that contained 100 µl each of 1.0mM NBT, 3.0mM NADH and 0.3mM PMS and the final volume was adjusted to 1ml with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.8) at ambient temperature. The reaction mixture (NBT and NADH) was incubated with or without extract at ambient temperature for 2 min. Quercetin and BHT were used as standard antioxidants. The reaction was started by adding PMS. The absorbance at 560 nm was measured against blank samples after 3 min. Decrease in absorbance in the presence of extracts indicated superoxide anion scavenging activity. The percent inhibition was calculated by using the following equation.

$$\% \text{superoxide scavenging activity} = 100(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})$$

Where A_{control} is the absorbance of the control reaction mixture without the test compounds, and A_{sample} is the absorbance of the test compounds. IC₅₀ values, which represented the concentration of the extract that caused 50% neutralization of superoxide radicals, were calculated from the plot of inhibition percentages against concentration.

iii. Ferrous Ion Chelating Activity

Ferrous ion chelating activity was measured by inhibition of the formation of iron (II)–ferrozine complex after treatment of test material with Fe²⁺ following the method of Le *et al* [14]. The reaction mixture contained 500 µl of *Nigella sativa* seed extracts or the standard chelator EDTA, 100 µl of FeCl₂ (0.6

mM in water) and 900 of μl methanol. The control contained all the reaction reagents except the extracts or EDTA. The mixture was shaken well and allowed to react at room temperature for 5 min. One hundred microliters of ferrozine (5 mM in methanol) was then added, the mixture shaken again, followed by further reaction at room temperature for 10 min to complex the residual Fe^{2+} ion. The absorbance of the Fe^{2+} -ferrozine complex was measured at 562 nm against a methanol blank. The chelating effect was calculated as a percentage, using the equation below.

$$\% \text{chelating activity} = 100(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}$$

Where A_{control} is the absorbance of the control reaction mixture without the test compounds, and A_{sample} is the absorbance of the test compounds. IC_{50} values, which represented the concentration of the extract that caused 50% of Fe^{2+} ion chelation, were calculated from the plot of chelating percentage against concentration.

iv. β -Carotene Bleaching Assay

In this assay, antioxidant capacity is determined by measuring the inhibition of the volatile organic compounds and the conjugated diene hydroperoxides arising from linoleic acid oxidation according to the method of Kartal *et al.*[15]. A stock solution of β -carotene/linoleic acid mixture was prepared as follows: 0.5 mg β -carotene was dissolved in 1 ml of chloroform, and 25 μl linoleic acid and 200 mg Tween 40 were added. Chloroform was completely evaporated using a vacuum evaporator. Then, 100 ml distilled water, saturated with oxygen (30 min 100 ml/min), were added with vigorous shaking; 2.5 ml of this reaction mixture were dispersed into test tubes and 350 μl portions of the extracts prepared at 2 mg /ml concentrations, were added. Then emulsion was incubated for 48 h at room temperature and the absorbance (490 nm) was recorded at different time intervals. The same procedure was repeated with the synthetic antioxidant, BHT, α -tocopherol, and a blank (containing only methanol). The relative antioxidant capacity (RAC) was calculated as follow.

$$\text{RAC} = 100 (A_{t=48\text{h sample}} / A_{t=48\text{h BHT}})$$

Where $A_{t=48\text{h sample}}$ is the absorbance of the test compounds after 48h and $A_{t=48\text{h BHT}}$ is the absorbance of BHT after 48 h.

5. Antioxidant Activity In Vivo

i. Animals Treatment and Blood Collection

After an adaptation period of 6 days, the mice were randomly divided into six groups of 6-animals. Three groups (ME1, ME2, ME3) were given orally 300, 500 et 800 mg/kg of Methanolic extract (ME). Two other groups (FO1, FO2) were given 2 and 4 ml/kg of *Nigella sativa* fixed oil (FO). The control group received the same volume of normal saline solution.

After twenty one days of daily treatment, blood (0.5-1 ml) was collected by cardiac puncture after diethyl-ether

anesthesia. A subsample of whole blood 100 μl was immediately diluted in 2.4 mL of PBS (NaCl 125 mM, sodium phosphate 10 mM, pH 7.4). The remaining quantity of the blood was centrifuged (1500g/5min/4°C). The obtained plasma was used to assess plasma antioxidant capacity.

ii. Blood Total Antioxidant Capacity

The global potential of antioxidizing defense was measured by KRL test (kit of dosage of the Free Radicals) according to the protocol described by Girard *et al.*[16]. With some modifications by replacing the radical AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl] by the tert-butyle hydroperoxide (t-BHP) [17]. The principle of the test is to submit whole blood to a thermo-controlled free radical Aggression. All families of antioxidant present in the blood are mobilized to fight off the oxidant attack and to protect the integrity of erythrocytes resulting in the delay of hemolysis.

Briefly, Aliquots of 80 μL of diluted blood was deposited in 96-well microplate with 136 μL of t-BHP (166 μM in solution) and then incubated at 37°C. The kinetic of hemolysis was followed using a 96-well microplate reader by measuring optical density decrease at 630 nm. The blood resistance to free radical attack is expressed by the time needed to hemolyze 50% of the red blood cells (half-Hemolysis Time, HT_{50} in min)

iii. Plasma Antioxidant Capacity

The capacity of the plasma to trap the DPPH radical was estimated according to the method of Hasani *et al* [18] with some modifications. Briefly, 50 μL of plasma were added to 950 μl of the DPPH methanolic solution (2.4 mg /100 ml of methanol). After 30 min of incubation in the darkness followed by a centrifugation, the absorbance of supernatant is measured at 517. The plasmatic antioxidant power was then calculated (see the part *in vitro*).

C. Statistical Analysis

Data obtained *in vitro* and *in vivo* are expressed as mean $\pm$ SD and mean $\pm$ SEM respectively. The sigmoid hemolysis curves were fitted by computer analysis Software (Graph Pad. Prism.V5.00). Differences between the control and the treatments in these experiments were tested for significance using analysis of variance followed by Dunnet's/tukey's test. A probability of $P < 0.05$ was considered significant.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Preparation of *Nigella Sativa* Seed Extracts

Due to the complicated constituents and pharmacological diversities of plants, *in vitro* bioassay-guided fractionation has been effectively applied to screen the biological activities that contribute important indications for investigating the characteristics of active components [19]-[20]. As shown in "Fig. 1", the methanolic extract (ME) of *Nigella sativa* was fractionated through solvent-solvent partitioning to obtain four fractions of hexane (HE), chloroform (CF), ethyl acetate (EAE), and hexane (HE). The recoveries of ME, HE, CE,

EAE, and WE were about 21,5 %,3,05 %, 0.41%, 0.62 %and 14,08% respectively, indicating that the constituents of *Nigella sativa* seed belong mainly to the two opposing extremes of polarity.

B. Total Phenolics and Flavonoids Content

A number of studies have focused on the biological activities of phenolic compounds and flavonoides , which are potential antioxidants and free radical-scavengers [21].the obtained results “Table I” show that CE in *Nigella sativa* samples contained the highest amount of total phenolic compounds and flavonoids (81.31 $\mu\text{g GAE/mg}$ of extract, 5.20 QE/mg of extract) followed by EAE (72.43 $\mu\text{g GAE/mg}$ of extract, 4.19 $\mu\text{g QE/mg}$ of extract), ME (33.64 $\mu\text{g GAE/mg}$, 3.80 $\mu\text{g QE/mg}$ of extract) and WE (27.07 $\mu\text{g GAE/mg}$ of extract, 2.45 $\mu\text{g QE/mg}$ of extract) while the HE contains only (15,95 $\mu\text{g GAE /mg}$ of extract, 0.43 $\mu\text{g QE/mg}$ of extract).

TABLE I
PHENOLICS AND FLAVONOIDS CONTENT OF *NIGELLA SATIVA* SEED EXTRACTS

Extract	Total Phenolics ($\mu\text{g GAE/mg}$ of extract)	Flavonoids ($\mu\text{g QE/mg}$ of extract)
ME	33.64 $\pm$ 0.34	3.80 $\pm$ 0.07
HE	15.95 $\pm$ 0.58	0.43 $\pm$ 0.06
CE	81.31 $\pm$ 1.97	5.20 $\pm$ 0.02
EAE	72.43 $\pm$ 2.94	4.19 $\pm$ 0.09
WE	27.07 $\pm$ 0.58	2.45 $\pm$ 0.06

The results are given as means $\pm$ SD of three measurements

C. DPPH Radical Scavenging Activity

The 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) is a stable radical with a maximum absorbance at 517 nm that can readily undergo reduction by an antioxidant. Because of the ease and convenience of this reaction, it has now widespread use in the free radical-scavenging activity assessment [22]. IC_{50} values for DPPH scavenging activities of *Nigella sativa* extracts and standards antioxidant are given in “Table II”.

The CE and EAE show the best radical scavenging activity with IC_{50} values 106.56 and 121.62 $\mu\text{g/ml}$ respectively, followed by ME (IC_{50} =237.79 $\mu\text{g/ml}$) and HF (IC_{50} =394.53 $\mu\text{g/ml}$). The WE show the lowest radical scavenging activity (IC_{50} =447.76 $\mu\text{g/ml}$). Compared with quercetin and BHT the CE and EAE were less active. The scavenging effect of CE and EAE is most likely due to their high phenolic and flavonoid content. The activity of HE which represents the poorest extract in phenolics and flavonoids seems to be ascribed to essential oils, whose radical scavenging activity has been widely studied. Carvacrol, t-anthenol, 4-terpineol and thymoquinone, are powerful scavengers of DPPH, hydroxyl radical [9].

TABLE II
DPPH-SCAVENGING ACTIVITIES OF *NIGELLA SATIVA* SEED EXTRACTS,
QUERCETIN AND BHT

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
BHT	43.48 $\pm$ 0.58

Quercetin	1.48 $\pm$ 0.03
ME	237.79 $\pm$ 3.15
HE	394.53 $\pm$ 4.78
CE	106.56 $\pm$ 1.28
EAE	121.62 $\pm$ 2.60
WE	447.76 $\pm$ 1.48

The results are given as means $\pm$ SD of three measurements

The obtained results indicate the existence of significant linear correlation between IC_{50} values of radical-scavenging activity and total phenolic ($r^2 = 0.98$, $p < 0.01$) and flavonoids ($r^2 = 0.70$, $p < 0.01$) contents of all extracts. Indeed, phenolic compounds, especially flavonoids are recognized as potentially antioxidant substances with the ability to scavenge free radical species and reactive forms of oxygen, the scavenging effect of flavonoids (FIOH) is attributed to their low potential redox making them thermodynamically able of reducing free radicals ($\text{R}^\bullet$) by a transfer of hydrogen from hydroxyl groups. This reaction gives rise to aroxyle radical ($\text{FLO}^\bullet$) and the stabilized radical (RH), the ($\text{FLO}^\bullet$) subsequently undergo a structural rearrangement allowing the redistribution of the unpaired electron on the aromatic ring and the stabilization of aroxyl radicals [23].

D. Superoxide Anion Scavenging Activity.

In the PMSNADH- NBT system, superoxide anion derived from dissolved oxygen by PMS-NADH coupling reaction reduces NBT. The decrease of absorbance at 560 nm with antioxidants thus indicates the consumption of superoxide anion in the reaction mixture.

The obtained results “Table III” show that HE and CE are the most active with IC_{50} values 361.86 $\mu\text{g/ml}$ and 371.80 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The scavenging effect of these two extracts (HE and CE) was statistically similar ($p < 0.001$) to that of standard antioxidant BHT ($\text{IC}_{50} = 344.59 \mu\text{g/ml}$) which is 10 times less active than quercetin ($\text{IC}_{50} = 33.69$). Unlike CE and HE, the scavenging effect of EAE, ME, WE is very low with IC_{50} values 5.58 mg/ml , 6.88 mg/ml and 9.24 mg/ml respectively.

TABLE III
SUPEROXYDE ANION SCAVENGING ACTIVITIES OF *NIGELLA SATIVA* SEED
EXTRACTS, QUERCETIN AND BHT

	IC_{50}
BHT	344.59 $\pm$ 35.3 $\mu\text{g/ml}$
Quercetin	33.69 $\pm$ 0.35 $\mu\text{g/ml}$
ME	6.88 $\pm$ 0.068 mg/ml
HE	371.80 $\pm$ 7.10 $\mu\text{g/ml}$
CE	361.86 $\pm$ 22.42 $\mu\text{g/ml}$
EAE	5.58 $\pm$ 0.28 mg/ml
WE	9.24 $\pm$ 0.067 mg/ml

The results are given as means $\pm$ SD of three measurements.

The effect of CE appears to be related to its richness in polyphenols and flavonoids. However, this is not the case for the HE, the poorest in polyphenols and flavonoids. Its activity is probably attributed to the presence of other substances more active than those found in other extracts. These substances are probably essential oils which represent between 0.18 to 0.50% in seed weight and between 1.4-1.9% by weight of the fixed oil [24]. The scavenging effect of reactive oxygen species by pure compounds contained in the essential oil of *Nigella sativa* seeds has been widely studied. Thymoquinone, one of the major compounds of this oil, inhibits the generation of $O_2^{\bullet-}$ radical by xanthine / xanthine oxidase ($IC_{50} = 3.35 \mu M$) without having any effect on the activity of the enzyme [25].

Except the HE, all extracts tested in this study show a significant linear correlation between their superoxide anion scavenging effect and their phenolics ($r^2 = 0.76$, $p < 0.01$) and flavonoids ($r^2 = 0.91$, $p < 0.01$) contents.

E. Chelating Activity

It has been well recognized that transition metal ions such as those of iron and copper are important catalysts for the generation of the first few free radicals to initiate the radical chain reaction or the radical mediates lipid peroxidation [26]. Chelating agents may inhibit radical generations by stabilizing transition metals, consequently reducing free radical damage. To better estimate the potential antioxidant activities of the *Nigella sativa* seed extracts, chelating activity of each extract was evaluated against Fe^{2+} .

The results are shown in "Table IV". The IC_{50} values of the different extracts showed a wide variation ranging from 0.169 mg / ml to 13.137 mg/ml. The WE and EAE appear to have the most important chelating activity with IC_{50} values of 0.169 mg / ml and 0.173 mg/ml respectively (40.578 and 39.704 mg EDTA-E/g extract), followed by the ME ($IC_{50} = 0.316$ mg / ml). compared with quercetin, these three extracts are from 1.75 to 3.27 times more active. This is probably explained by a synergistic effect between the components of these extracts. The chelating effect of CE and HE is very low ($IC_{50} = 4.10$ and 13.137 mg / ml), 24 to 77 times less active than the WE and 7 to 24 times less active than quercetin.

TABLE IV
CHELATING ACTIVITIES OF EDTA, QUERCETIN AND *NIGELLA SATIVA* SEED EXTRACTS

	IC_{50} (mg/ml)	ChelatingActivity (mgEDTA-E/g extract)
EDTA	6.87 ± 0.131^a	—
Quercetin	0.55 ± 0.024	12.402 ± 0.535
ME	0.316 ± 0.003	22.021 ± 0.227
HE	13.137 ± 0.376	0.523 ± 0.007
CE	4.103 ± 0.104	1.675 ± 0.042
EAE	0.173 ± 0.011	39.704 ± 2.637
WE	0.169 ± 0.000	40.578 ± 0.114

^a $\mu g/ml$

The results are given as means $\pm$ SD of three measurements

The chelating activity of methanolic extract of the stems and roots of *Nigella sativa* was investigated by Bourgou *et al* [27], this study reveals a very low activity, the obtained IC_{50} values were 7.5 mg/ml and 3.8 mg/ml for roots and stems respectively. Phenolic compounds have been reported to be chelators of free metal ions [28] [29]. But in this study a low and no significant correlation ($r^2 = 0.15$, $p \square 0.05$) was observed between the chelating extracts of *Nigella sativa* seeds and their contents in phenolic compounds. Similar results have been reported in other works, for example in a study on extracts of fourteen varieties of barley, Zhao *et al* [26] have found a very weak correlation between the chelating activity of these extracts and their contents in phenolic compounds. This might indicate that phenolic compounds might not be the main chelators of iron. In a complex mixture, organic acids, amino acids and sugars can be sequesters of transition metal ions. [30]. In addition, the ability for phenolic compounds to chelate metal ions depends on the availability of properly oriented functional groups [31]. Therefore, a sample high in polyphenols might not chelate metal if the polyphenols present did not have suitable groups that could chelate the cation. Also, when a phenolic group is conjugated with a carbohydrate group, as in naturally-occurring phenolic glycosides, it can no longer bind metals [30].

F. β -Carotene Bleaching Assay

In this assay, oxidation of linoleic acid produces hydroperoxide-derived free radicals which attack the chromophore of β -carotene, resulting in a bleaching of the reaction emulsion. An extract capable of retarding/inhibiting the oxidation of α -carotene may be described as a free radical scavenger and primary antioxidant [32]

As can be seen in "Fig. 2" all the extracts were capable of inhibiting the bleaching of β -carotene by scavenging linoleate-derived free radicals.

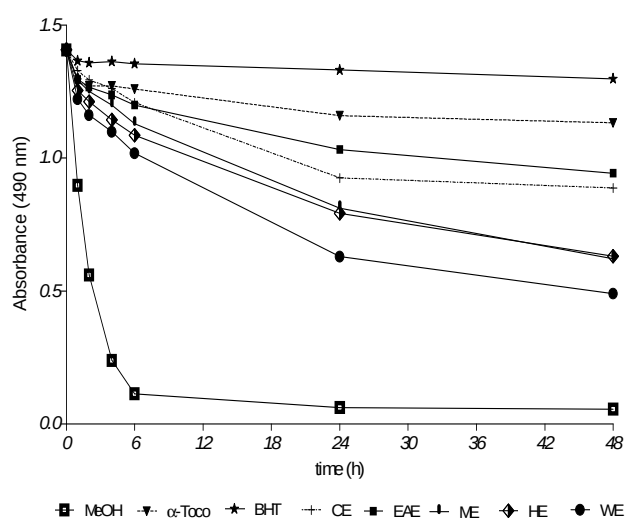


Fig. 2 Kinetics of β -carotene bleaching at 490 nm in the absence and presence of *Nigella sativa* extracts, BHT, α -tocopherol (Each value is the average of three tests)

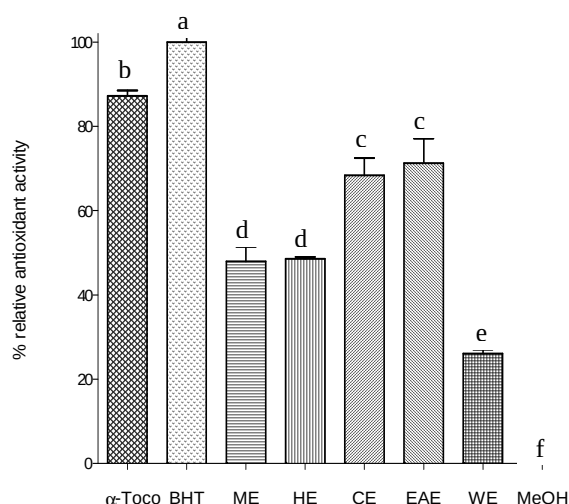


Fig. 3 Relative antioxidant activities of *Nigella sativa* seeds extracts, BHT and α -tocopherol in β -carotene/ linoleic acid system (values are the average of three measurements $\pm$ SD), bars with different letters indicate activities significantly different ($p \leq 0.01$).

The relative antioxidant activities are shown in “Fig. 3” The order of decreasing efficacy was EAE (71.29%) and CE (68.34%) (Statistically indistinguishable) > HF (48.58%) and ME (47.91%) (Statistically indistinguishable) > WE (26.02%). Compared to standards antioxidants, the CE and EAE are 1.2 times less active than α -tocopherol and 1.4 times less active than BHT.

The high activity of CE and EAE is most likely attributed to their phenolic and flavonoid content, the low activity of WE is probably explained by its high polarity. Indeed, Frankel and Meyer [33] have suggested that the polarity of an extract is important in water:oil emulsions, viz., apolar extract exhibit most important antioxidant properties as they are concentrated within lipid-water interface, thus helping to prevent radical formation and lipid oxidation of β -carotene. While polar extract are diluted in the aqueous phase and are thus less effective in protecting lipids.

G. Blood Total Antioxidant Capacity

It is largely accepted that diet enriched with fruits, vegetables and vegetal oils increase the antioxidant potential

of the body resulting in many beneficial effects on health [34]. In this context, the effect of treatment with the ME and the FO of *Nigella sativa* seeds, on the total antioxidant status of mice was evaluated using the KRL assay which is based on the whole blood resistance to free radical aggression, taking into account all the body reserves since blood contains every kind of the molecular and enzymatic antioxidant equipment [35]. These antioxidants are mobilized during an ROS attack induced *ex vivo* by t-BHP, to protect erythrocytes integrity and then delay their hemolysis.

From the obtained sigmoid hemolysis curves “Fig. 4”, it appears that treatment with the ME and the FO causes a delay of hemolysis which is evident in a shift of the curves to the right. The HT_{50} values “Fig.5” reveal an extension of half hemolysis time in all treated groups compared with controls (CTL). For the group ME1 treated with ME (300 mg / kg), the increase in HT_{50} ($HT_{50}=117.3 \pm 3.23$ min) is statistically no significant compared with the control group ($HT_{50}=106.77 \pm 2.36$ min). However, administering a higher doses of ME for the group ME2 (500 mg / kg), ME3 (800mg / kg) caused a significant delay of hemolysis ($HT_{50} = 125.17 \pm 7.15$ min, $p \leq 0.05$), ($HT_{50}= 136.01 \pm 3.11$, min, $p \leq 0.001$). These results indicate that the ME increases the total antioxidant capacity in dose dependent manner.

Similarly, treatment of groups FO1 and FO2 by two doses (2ml/Kg and 4ml/kg) of FO has also caused a significant ($p \leq 0.01$) delay of hemolysis with HT_{50} values of 132.15 ± 2.96 min and 133.6 ± 4.46 min respectively. Similar results were obtained by Kökdil *et al.* [36]-[37] which showed that oral administration of the fixed oil of *Nigella unguicularis*, *Nigella orientalis* and *Nigella segetalis* seeds at a dose of 1ml/kg in rats during four weeks, resulting in improved blood parameters and a significant increase in total antioxidant status without affecting the level of serum MDA. In the same context, *in vitro* studies have shown that extracts of *Nigella sativa* seeds protect erythrocytes against lipid peroxidation, degradation, loss of deformability and increased osmotic fragility caused by the hydrogen peroxide H_2O_2 [38].

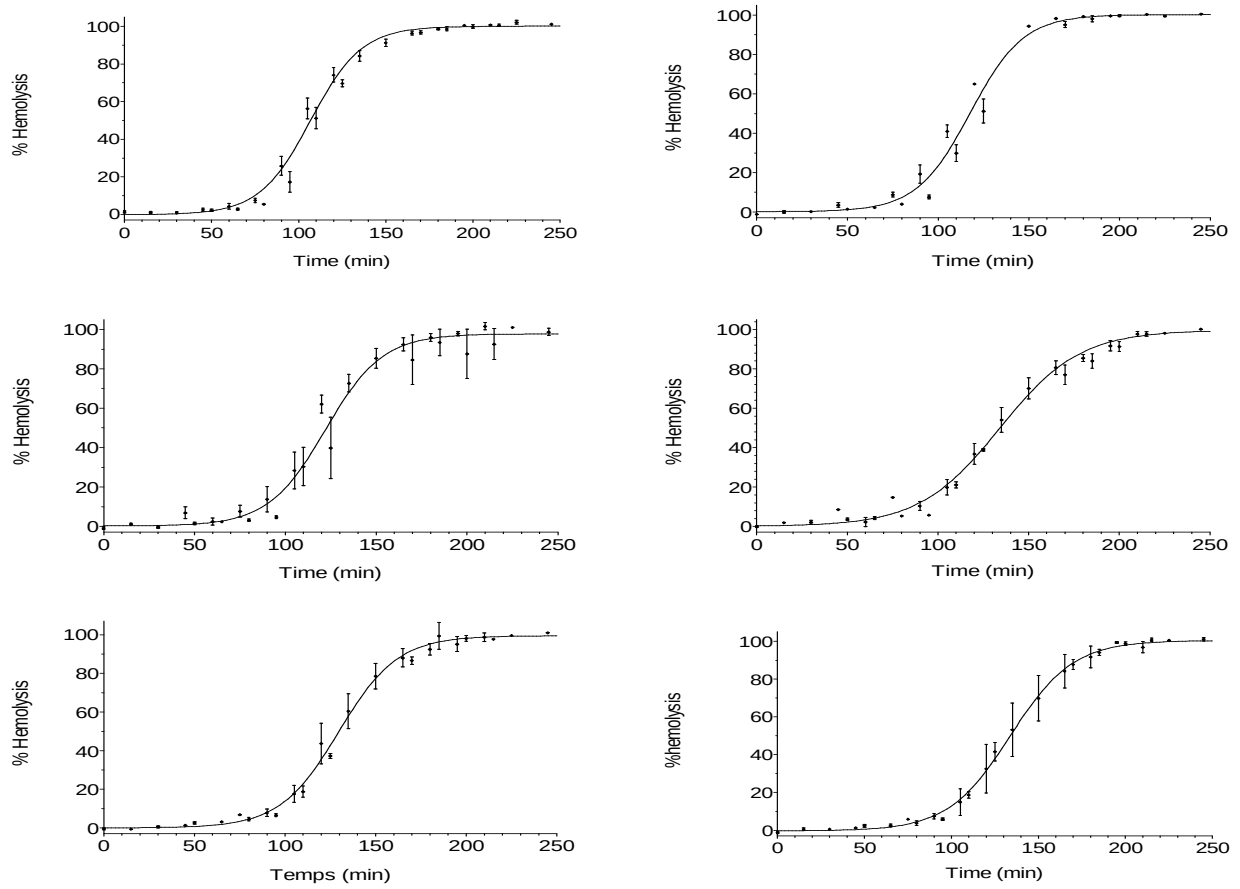


Fig. 4 Kinetics of hemolysis in the presence of t-BHP for different studied groups. The values are means $\pm$ SEM (n = 6-7).

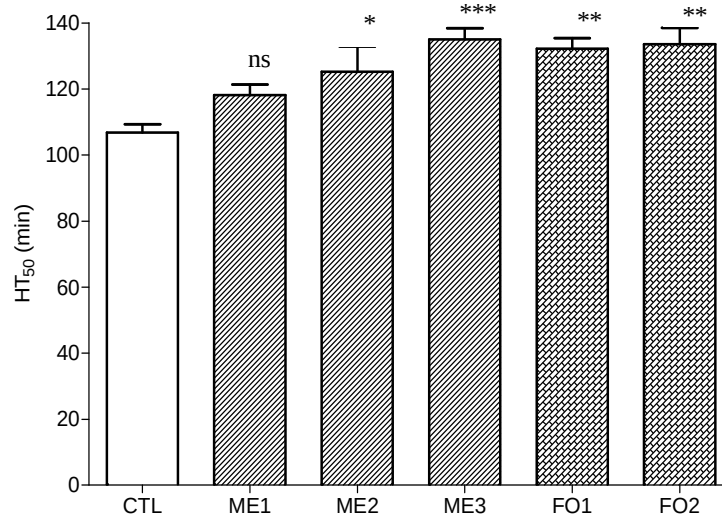


Fig. 5 Half-Hemolysis Time (HT50) for different studied groups. The values are means $\pm$ SEM (n = 6-7). Comparisons are made relative to The control group, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant

H. Plasma Antioxidant Capacity

Plasma antioxidant capacity (PAC) is one of the most commonly used biomarkers to assess the effectiveness of dietary supplementation or antioxidant treatment. Due to the large number of antioxidants present in plasma, several methods have been developed: the ferric reducing antioxidant power (FRAP), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), total radical absorption potential (TRAP) and the DPPH radical scavenging activity [39]-[40]. In our study, the obtained results "Fig.6" show that oral administration of ME (300 mg / ml) for the group ME1 leads to increased plasma antioxidant capacity ($41.63 \pm 4.36\%$ for EM1 group *versus* $26.34 \pm 6.14\%$ for the control group), this increase is statistically not significant compared with the control group, however the administration of two higher doses 500 mg/kg and 800 mg/kg for the groups ME2 and ME3 respectively has significantly increased ($p \leq 0.01$) the antioxidant capacity ($49.62 \pm 2.26\%$ and $48.18 \pm 3.73\%$). Similarly, the administration of FO (2 ml / kg and 4 ml / kg) for the groups FO1 and FO2 has significantly increased the plasma antioxidant capacity ($44.32 \pm 4.98\%$, $P \leq 0.05$) ($49.44 \pm 2.45\%$, $p \leq 0.01$).

In fact, the plasma contains a network of endogenous antioxidants such as (albumin, bilirubin, reduced glutathione and uric acid) as well as exogenous antioxidants derived from food. These antioxidants may act in a complementary and synergistic manner to provide a better protection against ROS. The increase in plasma antioxidant capacity is probably attributed to the elevated levels of exogenous antioxidants acquired following treatment with *Nigella sativa* seeds extracts (fixed oil, methanolic extract).

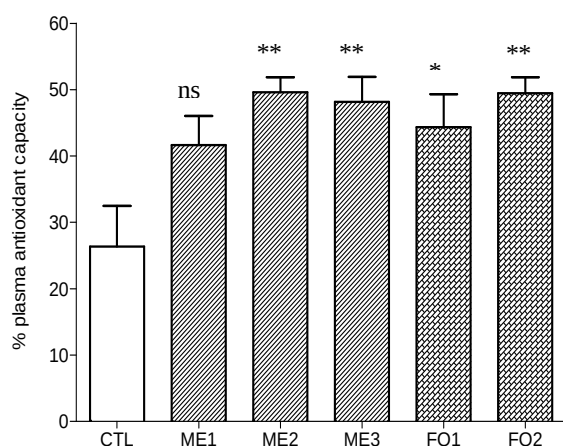


Fig. 6 Plasma antioxidant capacity toward DPPH radical for different groups. Values are means $\pm$ SEM ($n = 6-7$). Comparisons are made relative to the control group, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ns: not significant

The study of the relation between total antioxidant capacity of blood (HT50) and plasma antioxidant capacity (%) shows a significant positive linear correlation ($r^2 = 0.48$, $p \leq 0.01$) "Fig.7", this suggests that the blood total antioxidant capacity is partially attributed to antioxidant and free radical scavengers present in the plasma.

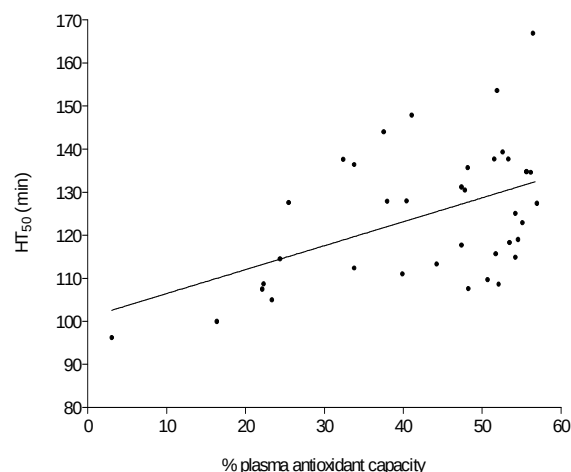


Fig. 7 Relationship between plasma antioxidant capacity and blood total antioxidant capacity (HT50) in mice of different groups ($N = 37$)

IV. CONCLUSION

From the obtained data in the present study we can say that *Nigella sativa* seeds have a considerable antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*. This activity is mainly concentrated in the extracts CE, EAE and HE (fixed oil). The activity of CE and EAE is probably related to their high phenolic content. However, the activity of HE could be attributed to essential oils. Consequently, further work should be made to isolate the active constituents in each extract and to clarify their mode of action.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (M.E.S.R.S) and by the Algerian Agency for the Development of Research in Health (A.N.D.R.S).

REFERENCES

- [1] G. B. N. Ames, M. K. Shigenaga and T. M. Hagen, "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90, pp. 7915-793, 1993.
- [2] J. S. Bland, "Oxidants and antioxidants in clinical medicine: Past, present and future potential," J Nutr Environ Med, vol. 5, pp. 255-280, 1995.
- [3] A. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, "The antioxidant of human extracellular fluids," Arch. Biochem. Biophys, vol. 280, pp. 1-8, 1990.
- [4] R. Collin, "Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer," Bio-Essays, vol. 21, pp. 238-246, 1999.

- [5] R. A. Floyd, "Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 222, pp. 236–245, 1999.
- [6] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Rad Biol Med*, vol. 20, pp. 933–956, 1996.
- [7] R. Amarowicz, M. Naczek and F. Shahidi, "Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls," *J. Agric. Food Chem*, vol. 48, pp. 2755–2759, 2000.
- [8] O. I. Aruoma, B. Halliwell, R. Aeschbach and J. L. Olligiers, "Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid," *Xenobiotica*, vol. 22, no. 2, pp. 257–268, 1992.
- [9] M. Burits and F. Bucar, "Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil," *Phytother. Res*, vol. 14, pp. 323–328, 2000.
- [10] H.B. Li, K.W. Cheng, C.C. Wong, K.W. Fan, F. Chen and Y. Jiang, "Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae," *Food Chem*, vol. 102, pp. 771–776, 2007.
- [11] T. Bahorun, B. Gressier, F. Trotin, C. Brunete, T. Dine, J. Vasseur, J.C. Gazin, M. Pinkas, M. Luycky and M. Gazin, "Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations," *Drug Res*, vol. 46, pp. 1086–1089, 1996.
- [12] A. Mansouri, G. Embarek, E. Kokkalou and P. Kefalas, "Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*)," *Food Chem*, vol. 89, pp. 411–420, 2005.
- [13] Ani, M.C. Varadaraj and K. Akhilender Naidu, "Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.)," *Eur. Food Res. Technol*, vol. 224, pp. 109–115, 2006.
- [14] K. Le, F. Chiu F and K. Ng, "Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*," *Food Chem*, vol. 105, pp. 353–363, 2007.
- [15] N. Kartal, M. Sokmen, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou and A. Sokmen, "Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L using a suitable extraction procedure," *Food Chem*, vol. 100, pp. 584–589, 2007.
- [16] A. Girard, S. Madani, F. Boukourt, M. Cherkaoui-Malki, J. Belleville and J. Prost, "Fructose-aeriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats," *Nutrition*, vol. 22, pp. 758–766, 2006.
- [17] C. Manna, S. D'angelo, V. Migliardi, E. Loffredi, O. Mazzoni, P. Morrica, P. Galletti and V. Zappia, "Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells," *J. Agric. Food Chem*, vol. 50, pp. 6521–6526, 2002.
- [18] P. Hasani, N. Yasa, S. Vosough-Ghanbari, A. Mohammadirad, G. Dehghan and M. Abdollahi, "In vivo antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol," *Acta Pharm*, vol. 57, pp. 123–127, 2007.
- [19] S. Garg, G. P. Talwar, and S. N. Upadhyay, "Immunocontraceptive activity guide fractionation and characterization of active constituents of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts," *J Ethnopharmacol*, vol. 60, pp. 235–246, 1998.
- [20] E. Yesilada, K. Tsuchiya, Y. Takaishi and K. Kawazoe, "Isolation and characterization of free radical scavenging flavonoid glycosides from the flowers of *Spartium juncifolium* by activity-guided fractionation," *J Ethnopharmacol*, vol. 73, pp. 471–478, 2000.
- [21] K. Suresh Kumar, K. Ganesan and P.V. Subba Rao, "Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed," *Food Chem*, vol. 107, pp. 289–295, 2008.
- [22] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT*, vol. 28, pp. 25–30, 1995.
- [23] S.V. Javanovic, S. Steenken, M. Tosic and B. Marjanovic, M.J. Simic, "Flavonoids as antioxidants," *J. Am. Chem. Soc*, vol. 116, pp. 4846–4851, 1994.
- [24] F. Benkaci-Ali, A. Baalouamer and B.Y. Meklati, "Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa* L. Seeds," *Chromatographia*, vol. 64, pp. 227–231, 2006.
- [25] O.A. Badary, R.A. Taha, A.M. Gamal El-Din and M.H. Abdel-Wahab, "Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger," *Drug Chem. Toxicol*, vol. 26, pp. 87–98, 2003.
- [26] H. Zhao, W. Fan, J. Dong, J. Lu, J. Chen, L. Shan, Y. Lin and W. Kong, "Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties," *Food Chem*, vol. 107, pp. 296–304, 2008.
- [27] S. Bourgou, R. Ksouri, A. Bellila, I. Skandrani, H. Falleh and B. Marzouk, "Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots," *C R Biol*, vol. 331, pp. 48–55, 2008.
- [28] C.J. Morris, J.R. Earl, C.W. Trenam and D.R. Blake, "Reactive oxygen species and iron—a dangerous partnership in inflammation," *Int. J. Biochem. Cell Biol*, vol. 27, pp. 109–122, 1995.
- [29] J.E. Brown, H. Khodr, R.C. Hider and C. Rice-Evans, "Structural dependence of flavonoids interactions with Cu^{2+} ions: implication for their antioxidant properties," *Biochem. J*, vol. 330, pp. 1173–1178, 1998.
- [30] S.P. Wong, L.P. Leong and J.H. William Koh, "Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants," *Food Chem*, vol. 99, pp. 775–783, 2006.
- [31] S.A.B.E. Van Acker, D.J. Van Den Berg, M.N.L. Tromp, D.H. Griffioen, W.P.V. Bennenkom, W.J.F. Van Der Vijgh and A. Bast, "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids," *Free Radical Biol. Med*, vol. 20, pp. 331–342, 1996.
- [32] C.M. Liyana-Pathirana and F. Shahidi, "Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions," *J Sci Food Agric*, vol. 86, pp. 477–485, 2006.
- [33] E.N. Frankel and A.S. Meyer, "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants," *J Sci Food Agric*, vol. 80, pp. 1925–1940, 2000.
- [34] Y.F. Chu, J. Sun, X. Wu and R.H. Liu, "Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables," *J. Agric. Food Chem*, vol. 50, pp. 6910–6916, 2002.
- [35] P. Stocker, J. F. Lesgards, N. Vidal, F. Chalier and M. Prost, "ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1621, pp. 1–8, 2003.
- [36] G. Kökdil, L. Tamer, B. Ercan, M. Çelik and U. Atik, "Effects of *Nigella orientalis* and *N. segetalis* fixed oils on blood biochemistry in rats," *Phytother. Res*, vol. 20, pp. 71–75, 2006.
- [37] G. Kökdil, L. Tamer, B. Ercan, A. Ilcim, N. Aras and U. Atik, "Effects of *Nigella unguicularis* fixed oil on blood biochemistry and oxidant/antioxidant balance in rats," *J Ethnopharmacol*, vol. 99, pp. 131–135, 2005.
- [38] S.M. Suboh, Y.Y. Bilito and T.A. Aburjai, "Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes," *Phytother. Res*, vol. 18, pp. 280–284, 2004.
- [39] A. Janaszewska and G. Bartosz, "Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma," *Scand J Clin Lab Invest*, vol. 62, pp. 231–236, 2002.
- [40] D. Huang, B. Ou and R.L. Prior, "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays," *J. Agric. Food Chem*, vol. 53, pp. 1841–1856, 2005.

Evaluation of Antioxidant and Anti-Xanthine Oxidoreductase Activities of *Nigella sativa* Linn seeds' extracts

Kaouthar BOUDIAF¹

Zahira HOUCHE¹

Widad SOBHI²

Mustapha BENBOUBETRA¹

¹Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Setif, ALGERIA

²Department of Physical and Chemical Biology, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Bejaia, ALGERIA

*Corresponding Author

e-mail: benboubetra@yahoo.co.uk

Received : January 12, 2010

Accepted : February 17, 2010

Abstract

Nigella sativa, one of the most studied medicinal plants over the world, possesses a number of well established pharmacological properties. In this study, we have prepared different extracts from *Nigella sativa*'s seeds. The results show that hexane (HxE), chloroform (ChE) and ethyl acetate (AcE) extracts present an apparent inhibitory effect on both xanthine oxidase (XO) and xanthine dehydrogenase (XDH) activities of the enzyme xanthine oxidoreductase (XOR), with a markedly better efficiency for XDH activity.

Scavenging power on radical anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$) by different *N. sativa* extracts has been evaluated using chemiluminescence assay where two extracts, HxE and ChE, exhibited good scavenger activity, with IC_{50} of 0.18 μ g/ml and 0.3 μ g/ml, respectively. Reducing power (RP) of the different obtained extracts has been assessed by the FRAP assay. ChE and AcE showed the highest RP, which is proportional to the polyphenol content. The obtained data revealed that the antioxidant activity of *Nigella sativa*'s seeds resides in the oil fraction of HxE (inhibition of XO and XDH, and scavenging $O_2^{\cdot-}$) and in ChE and AcE fractions expressing the most important reducing power.

Key Words: Antioxidants; Reactive oxygen species (ROS); *Nigella sativa*; Reducing power (RP); Xanthine oxidoreductase (XOR).

Research funded by : The Algerian Ministry of Higher Education (MESR) (Grant number F01220060052 to MB) and the Algerian Agency for the Development of Research in Health (ANDRS) (Grant number 03/04/03/04/48 to MB)

INTRODUCTION

It is generally accepted that free radicals and reactive oxygen species (ROS) play an important role in the development of tissue damage and pathological changes. At moderate concentrations, ROS play an important role in physiological control of cell function. At high concentrations however, they may cause major damage of cellular constituents of living organisms [1]. Free radicals and their derivatives (also called pro-oxidants) exist in living tissues at low concentrations that are determined by the balance between their production and clearance, by antioxidants, rates. An antioxidant is therefore defined as a compound capable of preventing the pro-oxidation process, or biological oxidative damage [2]. Halliwell and Gutteridge [3] took a much wider view and defined an antioxidant as "any substance that, when present at low concentration, compared to that of an oxidizable substrate, significantly delays, or inhibits, oxidation of that substrate" [4]. The organism must confront and control the presence of both pro-oxidants and antioxidants continuously. Changing the balance toward an increase in the pro-oxidants over the capacity of antioxidants is defined as oxidative stress [5]. Antioxidants can influence the oxidation process by different means. In this regard, antioxidants can be

categorized into two major types capable of preventing oxidative damage by direct and indirect interaction with ROS [5]. The indirect mechanism includes suppression of ROS formation by inhibition of enzymes or chelating transition metals that prevents them for participating in the metal-mediated Haber-Weiss reaction [6]. The direct acting molecules share a similar chemical trial that allows them to donate electrons to the oxygen radical so that they can scavenge the radical and prevent it from attacking the biological target [5].

There is increasing evidence that oxidative stress leads to many biochemical changes and is an important contributing factor in several human chronic diseases, such as atherosclerosis and cardiovascular diseases, cancer, several neurodegenerative disorders, diabetes and likely the aging process [1]. Oxidative stress can result either from the weakening of cellular antioxidant defense and also excess of endogenous ROS production. Xanthine oxidoreductase (XOR) is one of the important biological sources of ROS and is therefore incriminated in several pathological processes [7].

The enzyme XOR catalyses the oxidation of hypoxanthine and xanthine to uric acid, which plays a crucial role in gout [8]. XOR occurs as a homodimer of approximately 300 kDa; each subunit contains four redox centers; a molybdenum cofactor (Mo-co), one FAD

and two Fe_2S_2 sites [9]. Mammalian XOR exists under two interconvertible forms; xanthine dehydrogenase (XDH; EC 1.1.1.204), which predominates *in vivo*, and xanthine oxidase (XO; 1.1.3.22). These forms can be interconverted reversibly by sulphide reagents or irreversibly (XDH to XO) by proteolysis [10]. XDH preferentially reduces NAD^+ , whereas XO cannot reduce NAD^+ , preferring molecular oxygen. Reduction of molecular oxygen by either forms of the enzyme yields superoxide and hydrogen peroxide and it is the capacity of XOR to generate such ROS that is of major interest in clinically related studies [7]. To date, the only commercially available XOR inhibitor is allopurinol, a purine analogue in clinical use for treatment of gout [11]. Despite generally acceptable efficacy and safety profiles, very rare but serious adverse reactions of allopurinol administration can occur [8]. Therefore, the research of new natural molecules is a priority, finding compounds with such pharmacological properties is of great medical importance.

Medicinal plants constitute an inexhaustible source of interesting bioactive compounds. *Nigella sativa* (*N. sativa*), an herbaceous annual plant (family Ranunculaceae), is one of the important medicinal plants which has long been used as a natural remedy for a number of human illnesses and disorders. *Nigella sativa* L. seeds have many acclaimed medicinal properties such as bronchodilatory, hypotensive, antibacterial, antifungal, analgesic, anti-inflammatory and immunopotentiating and are universally accepted as a panacea [12]. Therefore, this interesting plant has been widely studied with regard to its composition and its biological activities. *N. sativa* seeds have been reported to possess anti-inflammatory [13], anti-diabetic [14-16], immuno-potentiating [17,18], anti-tumoral [19,20], antihepatotoxic [21] and antinephrotoxic [22] properties. *N. sativa* has also been reported to have antioxidant activities *in vitro* [23, 24] and *in vivo* [25,26], principally related to lipidic compounds of the seeds. Besides, Atta and Imaizumi [26] demonstrated that ethanolic and aqueous extracts of delipidated *N. sativa* seeds show important antioxidant activity which was comparable to the activity of TBHQ. The present study aims to investigate, *in vitro*, antioxidant activities of different extracts from *Nigella sativa*'s seeds, as well as their inhibitory effects on both XO and XDH activities of XOR.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Xanthine, NAD^+ , allopurinol, SOD (superoxide dismutase), heparin-agarose gel TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), FeCl_3 , luminol, salts and standard polyphenols (gallic acid, quercetin, rutin) were purchased from Sigma-Aldrich. All other reagents and solvents were of analytical grade and came from Panreac, Cheminova, Prolabo, Organics et Janssen Chemica.

Preparation of *Nigella sativa* crud extract and its fractions

Nigella sativa's seeds were purchased from a local market (Batna city, Algeria) and their identification was confirmed in the laboratory. The seeds (100g) were first grounded to a fine powder, soaked in 1L of a hydroalcoholic mixture (methanol/water 7:3 v/v) and left overnight under slight agitation. The filtrate was evaporated at 50°C to eliminate methanol; an aqueous extract was then obtained and considered as *N. sativa* crude extract or CrE. Fractionation of CrE was carried out by using solvents with increasing polarities as described by Gilani *et al* (2001) with modifications. Solvents used were hexane, chloroform and ethyl acetate. This series of extractions gave rise to four fractions; hexane fraction (HxE), chloroform fraction (ChE), ethyl acetate fraction (AcE) and residual aqueous fraction (AqE). CrE and AqE were lyophilized and conserved with the other extracts at -20°C until use.

Total polyphenols and flavonoid content

Total phenolic content of prepared *N. sativa* extracts was determined according to the Prussian blue method [27] modified by Graham [28]. The reaction mixture consisted of 0,1ml of extract (dissolved in methanol), 3ml of distilled water, 1ml of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0.016 M) and 1ml of FeCl_3 (0.02 M). The flasks were mixed and allowed to stand for 15min. 5ml of stabilizing solution (30ml of gum Arabic 1% v/v + 30ml phosphoric acid + 90ml of distilled water) were then added and absorbance at 700nm was measured. The total phenolic content was determined as μg of gallic acid equivalents per milligram of extract (μg GAE/mg). Flavonoid content of *N. sativa* extracts was determined by aluminum chloride method [29]. One ml of each sample, with appropriate dilution, was added to 1ml of AlCl_3 (2% in methanol). After 10min, absorbencies were measured at 430nm. Flavonoid concentration was expressed in microgram of quercetin equivalents per milligram of extract (μg QE/mg).

Inhibition of XO and XDH activities of the enzyme XOR

XOR was purified from fresh bovine milk according to the procedure described by Sanders *et al* [30]. Purified XOR is 100% under XO form in the absence of reducing agents. XDH form was obtained by incubating the enzymatic solution with 10mM DTT for 1h at 37°C in sodium phosphate buffer (50mM, pH 7.4) containing 0,1mM EDTA [31,32]. DTT was eliminated by gel filtration on G-25 sephadex column. The rate of prepared XDH form must be higher than 50%. All activity and inhibition tests of XOR were carried out in ambient temperature in sodium phosphate buffer (50mM, pH 7.4) containing 0.1mM EDTA.

XO activity was determined spectrophotometrically following production of uric acid at 295nm ($\epsilon_{\text{uric acid}} = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in presence of 100 μM of xanthine in

air-saturated phosphate buffer [32]. XDH activity was measured spectrophotometrically following increasing absorbance at 340nm corresponding to the reduction of NAD^+ to NADH ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in presence of 100 μM of xanthine and 500 μM of NAD^+ . Enzymatic reactions were initiated by adding 0.1 to 0.2 UI/ml (final concentration) of XOR to the reaction mixture [31].

The percentage of inhibition of XO and XDH activities of XOR by prepared *N. sativa* extracts was calculated as follows: $[\% \text{ inhibition} = (A-B/A) \times 100]$ (A and B correspond respectively to the enzymatic activity in the absence and presence of the inhibitor). IC_{50} of the different extracts were then determined by 'Logit-Log probit' method. Solutions of different extracts were prepared in dimethyl sulphoxide (DMSO), which never exceeded 0.2% (v/v) in the final reaction volume.

Superoxide anion scavenger activity

Superoxide scavenging activity of *N. sativa* extracts was determined by chemiluminescence method. The method is based on the inhibition of light generated by a radical intermediate of the oxidation of luminol. The xanthine-XO system produces superoxide subsequently detected by luminol-dependent chemiluminescence. The reaction was carried out at 37°C in PBS buffer (50 mM, pH 7.4 + 0.1 mM EDTA) in presence of xanthine (160 μM) and luminol (100 μM) [33]. Superoxide generation was induced by addition of XO solution (0.1UI/ml final concentration) and the reaction was then monitored for 90min in a Microlumat LB 96P Luminometer (EG & G Berthold, Wildbad, Germany). The specificity of the reaction was controlled by SOD (100 UI/ml) as a specific inhibitor of superoxide-induced luminescence.

Scavenging ability of the extracts was defined as the percentage of luminescence inhibition with reference to positive control. IC_{50} of tested extracts were determined by the "Logit-Log probit" method with different concentration ranges of 0-50 $\mu\text{g/ml}$, 0-1 $\mu\text{g/ml}$, 0-1 $\mu\text{g/ml}$, 0-5 $\mu\text{g/ml}$, and 0-200 $\mu\text{g/ml}$ for CrE, HxE, ChE, AcE and AqE, respectively.

Ferric Reducing/Antioxidant Power

FRAP assay (Ferric Reducing/Antioxidant Power)

was performed according to the method initially described by Benzie and Strain [34] and modified by Pulido *et al* [35]. In the FRAP assay, reductants ("antioxidants") in the sample reduce Fe^{3+} /tripyridyltriazine complex, present in stoichiometric excess, to the blue ferrous form (Fe^{2+} -TPTZ), with an increase in absorbance at 593 nm. ΔA is proportional to the combined (total) ferric reducing/antioxidant power (FRAP value) of the antioxidants in the sample. Fresh solution of FRAP reagent was prepared by mixing 2.5ml of TPTZ solution (10mM in 40mM HCl) with 2.5ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20mM) and 25ml of acetate buffer (300 mM sodium acetate, pH driven to 3.6 par acetic acid). 900 μL of FRAP reagent, warmed at 37 °C, was mixed with 90 μL of bidistilled water and 30 μL of test sample (with appropriate dilutions). The increasing of absorbance in reaction mixtures was followed at 593nm for 30min at 37°C. Lectures were performed against bidistilled water. Absorbencies of reagent blanks (in which sample volume was replaced by either bidistilled water or methanol) and sample blanks (in which the FRAP reagent is absent) were subtracted from the final absorbance value.

A calibration curve of reducing standard ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) was achieved with a concentration range of 0-2000 $\mu\text{mole/L}$. Reducing power was then expressed in micromoles of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ equivalents per mg of sample ($\mu\text{mole Eq FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O /mg}$). The parameter Equivalent Concentration 1 or EC1 was also determined; it has been defined by Pulido *et al* [36] as the concentration of antioxidant having a ferric-TPTZ reducing ability equivalent to that of 1mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Statistical Analysis

The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Student test was used for simple comparisons, one way ANOVA followed by Dunnett test were performed for multiple comparisons (significance level $p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic and flavonoid content

Results show that *N.sativa* crude extract (CrE) contains considerable amounts of polyphenols ($24.36 \pm 2.89 \mu\text{gGAE/mg}$) and flavonoids ($3.28 \pm 0.16 \mu\text{gQE/}$

Table 1. Total polyphenol and flavonoid content of *N.sativa* extracts

Extract	Total polyphenol content ^(a)	Flavonoid content ^(b)
CrE	24.36 ± 2.89	3.28 ± 0.16
HxE	11.95 ± 1.36	0.49 ± 0.07
ChE	191.06 ± 23.34	6.93 ± 0.28
AcE	79.48 ± 8.8	5.96 ± 0.25
AqE	23.81 ± 2.67	3.17 ± 0.16

(a) μg of gallic acid equivalents per milligram of extract

(b) μg of quercetin equivalents per milligram of extract

Values are means of 3 to 4 measures $\pm$ SD.

mg). After fractionation of CrE by different solvents, these compounds were principally concentrated in ChE and AcE fractions. ChE contains the highest amounts of both polyphenols and flavonoids (Table 1), the lowest amounts were found in HxE. According to the data, and comparing with other studies in which similar extraction and analysis procedures were used [36], *N.sativa* crude extract is relatively poor in polyphenols and flavonoids, however, ChE content in polyphenols is considerably important.

Inhibition of XO and XDH activities of XOR/Superoxide anion scavenger activity

N.sativa extracts exert relatively important inhibition on XO and XDH activities of XOR (Table 2) in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). HxE activity is remarkably important especially on XDH form ($IC_{50} = 42.02 \mu\text{g/ml}$). The weakest inhibitions were observed with CrE and AqE. At $500 \mu\text{g/ml}$, CrE can only reduce XO activity by 55%. At the same dose, Jiwajinda *et al* [37] considered methanolic extract of *N.sativa* seeds as inactive toward XO activity (inhibition $< 30\%$). Inhibitions exerted by HxE, ChE and AcE on XO were approximately similar (Table 2), on XDH however, the inhibitions were distinctly remarkable with the following order of efficiency: HxE > ChE > AcE.

Inhibition of XOR by *N. sativa* extracts is related to the presence of compounds acting independently or in synergy. With the exception of AqE, all extracts inhibit XDH form more efficiently than XO (Table 2). This could be explained by the presence, in the extracts, of compounds exerting inhibition on both Mo and FAD active sites of the enzyme. Those extracts might contain inhibitors of XO which react at the Mo site; other compounds could react at the FAD site, more accessible in XDH form of the enzyme. In fact, XDH to XO conversion results in conformational changes affecting mostly FAD site [9]. Combined action of compounds

acting at Mo and at FAD sites contributes to the increase of inhibition in the case of XDH.

Inhibition of XDH presents a great interest not only because it is the most predominant form *in vivo* [7], but also because, as well as XO, XDH can produce ROS by its NADH oxidase activity [38]. With NADH as reducing substrate, XDH is more active than XO, and amounts of ROS produced are more important [30,31]. Numerous studies aimed to evaluate inhibitory effects of different plant extracts on XO activity. The inhibitory activities were attributed to polyphenols [39], flavonoids [40] and anthocyanosids [41]. In the present study, inhibitory activity can be partially attributed to flavonoids. With the exception of HxE, we observed a satisfactory correlation between flavonoid content and XO inhibition by *Nigella sativa* extracts ($r = 0.645$, $p < 0.01$); the correlation was more pronounced with XDH form ($r = 0.833$, $p < 0.01$). Flavonoids are well known as potent XO inhibitors [42,11], their activity is related to their chemical structure [43,44], mostly the similarity between purinic cycle of XO substrates (xanthine and hypoxanthine) and A cycle of flavonoids [42].

Scavenging effect on superoxide anion produced by XO

Superoxide scavenging activity of *N. sativa* extracts was determined by chemiluminescence in a xanthine/XO/luminol system. The extracts inhibit light emission in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). They showed impressive scavenging activities, with IC_{50} ranging from 0.179 to $12.23 \mu\text{g/ml}$ (Table 2). The most important activities were obtained with HxE, ChE and AcE. In this method, inhibition of superoxide generation by XO can be caused by either direct removal (scavenging effect) or inhibition of XO by the inhibitors present in the extracts. To distinguish between XO inhibition and superoxide scavenging activities of the extracts we used allopurinol as reference.

Table 2. Inhibitory effect of *N.sativa* extracts on XO and XDH activities, and on superoxide generation by XO.

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	XO inhibition	XDH inhibition	Inhibition of superoxide generation by XO
Allopurinol	6.66 ± 0.41	6.16 ± 0.82 ^{ns}	0.0365 ± 0.0007 ^{**}
EBr	432.99 ± 11.3	382.874 ± 22.97 [*]	6.86 ± 0.59 ^{**}
EHx	295.7 ± 12.7	42.02 ± 2.68 ^{**}	0.179 ± 0.023 ^{**}
ECh	355.87 ± 6.71	76.16 ± 9.43 ^{**}	0.2 ± 0.05 ^{**}
EAc	313.29 ± 53.43	157.98 ± 12.85 ^{**}	1.41 ± 0.35 ^{**}
EAq	620.11 ± 41.82	698.73 ± 34.18 ^{ns}	12.23 ± 0.34 ^{**}

Values are means of 3 to 4 essays $\pm$ SD. Comparisons were set in regard to XO inhibition (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: no significant).

Allopurinol is a strict inhibitor of XO and has no scavenging effect on superoxide produced by this enzyme [8]. IC_{50} obtained for allopurinol in chemiluminescence test reflects its inhibitory effect on XO; it is 182 times smaller than that obtained in XO inhibition using spectrophotometric method. Table 3 shows ratios between IC_{50} for all extracts obtained in spectrophotometric and in chemiluminescence methods. The extracts that inhibit XO without any scavenging properties should have a Spect/Lum ratio close to that of allopurinol, as in the case of AcE which may have slight scavenging activity. However, if this ratio is higher, this means that, beside inhibition of XO, the extract exerts scavenging effect on superoxide produced by this enzyme (cases of HxE and ChE).

HxE scavenging activity is probably due to essential oils, which are considered to be good antioxidants *in vivo* [15, 25] and *in vitro* [23]. It has been demonstrated that thymoquinone, a major compound of *N. sativa* essential oil, inhibits superoxide generation by XO with no effect on enzymatic activity [23]. Oil fraction of *N. sativa* contains also tocopherols, phenols and lipids having antiradical properties [15]. Those compounds could contribute to the high scavenging activity observed with HxE. In the case of ChE and AcE, scavenging activity of superoxide is mostly related to their high content of flavonoids. In fact, we observed a linear and highly significant correlation ($r=0.995$, $p<0.01$) between flavonoid content and superoxide scavenging activity for all extracts studied. Moreover, Flavonoids are known for their superoxide radical scavenging properties [43]; their minor redox potential makes them thermodynamically able to reduce oxidative free radicals such as superoxide [44].

Ferric Reducing/Antioxidant Power

Reducing power of *N. sativa* extracts as well as known antioxidants (gallic acid, quercetin, rutin and ascorbic acid) was determined by FRAP assay. In the original method of Benzie and Strain [45], measurements were monitored for 4min since the absorbance of the reduced ferrous-TPTZ complex was stable at this time. In their study, Pulido and coworkers observed that the reaction with certain antioxidants had not finished after 4 min and reduction of the ferric-TPTZ complex continued [35]. They prolonged the reaction for 30 min because, at this interval, the order of antioxidant efficiency of the studied samples was maintained. Lectures at 4 min were yet kept for comparison with the original method.

Figure 1 shows the kinetics of TPTZ- Fe^{3+} to TPTZ- Fe^{2+} reduction by standard antioxidants and *N. sativa* extracts. Some antioxidants continue to react after 4 initial min; their corresponding absorbance even doubled after 30min (case of quercetin). For others, 4min were

sufficient to get stabilized lectures (case of ascorbic acid). The behavior of tested extracts was not different, the reaction with some of them (HxE and ChE) was fast in initial times and stabilized right after. For the others, absorbance continued to increase with time.

EC1 and RP values for chosen antioxidants and *N. sativa* extracts were calculated (Table 4). Results show that gallic acid is the strongest among the four standard antioxidants used. Their order of antioxidant efficiency was as follows: gallic acid>quercetin>ascorbic acid>rutin (EC1 expressed in $\mu g/ml$). When EC1 is expressed in $\mu mole/L$, the order of antioxidant efficiency changed to Quercetin>gallic acid>rutin>ascorbic acid. The same order was obtained by Pulido *et al* (2000). Among *N. sativa* extracts, ChE and AcE expressed the most important reducing power. Their RP values were quite similar in the initial times of the reaction (4 min). After 30min, AcE showed significantly higher RP ($p<0.05$).

Reducing power of HxE estimated with FRAP assay was very weak. This extract which showed impressive superoxide scavenging capacity didn't react in this system. In fact, antioxidant activity is not necessarily equal to reducing capacity. For example, glutathione has a very weak reducing power in FRAP assay [45] because its redox potential is lower than Fe^{3+}/Fe^{2+} couple [48].

Comparisons between RP obtained with ChE and AcE and those of standard antioxidants (Figure 2) show that the two extracts are 20-28 times less efficient than gallic acid, 12-23 times than quercetin, 8-13 times than rutin and only 4 to 6 times weaker than ascorbic acid. These extracts are good source of antioxidants as, in spite of their complexity, they exhibited reducing capacity not much different from ascorbic acid which is considered as one of the most powerful antioxidants [5].

High RP of ChE and AcE could be related to their high flavonoid and polyphenolic content; a linear and highly significant correlation was observed between reducing power and flavonoid content in the four extracts CrE, ChE, AcE and AqE ($r=0.976$, $p<0.001$). Phenolic compounds, particularly flavonoids, are strong antioxidants. In FRAP assay, they express the most important activities compared to other antioxidants [35]. FRAP assay was used in many studies to evaluate total antioxidant capacity of dietary plants [47-50]. It has been found that reducing power depends mostly on fruit's content in polyphenols, anthocyanins and ascorbic acid [50].

It is worth mentioning that various methods are used in different laboratories for the evaluation of total antioxidant capacity. The results of various assays of the same material can differ significantly [51], mainly because of the differences in the reactivity of various antioxidants with respective indicators.

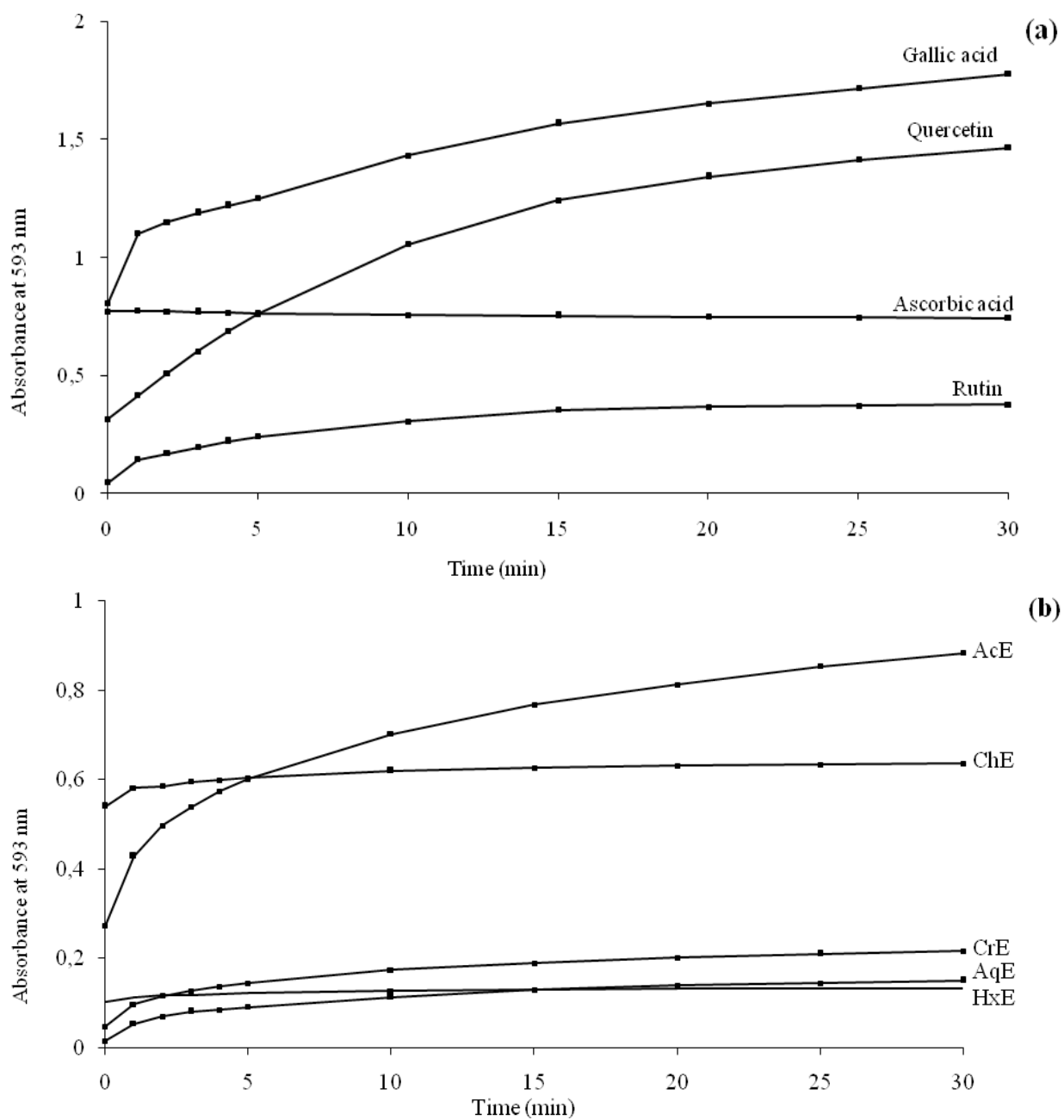


Figure 1. TPTZ-Fe³⁺ to TPTZ-Fe²⁺ Reduction kinetics by (a) standard antioxydants (100 µg/ml), and (b) *Nigella sativa* extracts (1 mg/ml) (n=4).

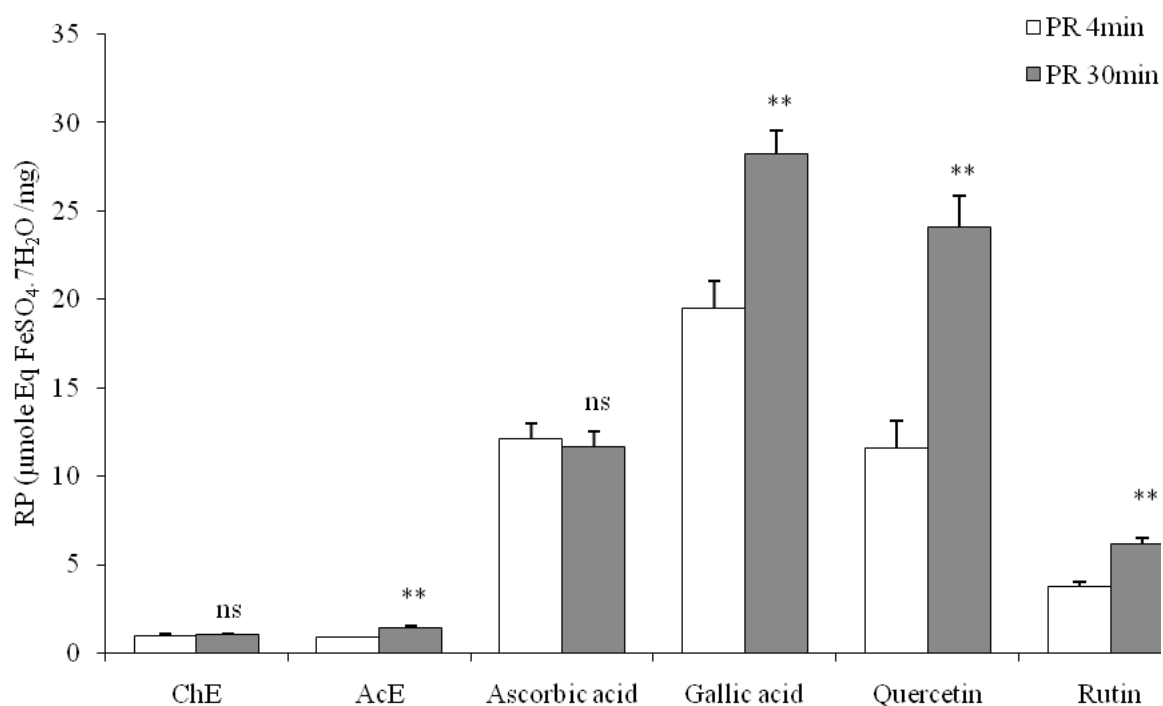


Figure 2. Reducing power of ChE and AcE, compared to standard antioxidants. Comparisons set between PR at 4 and at 30 minutes. ** $p \leq 0.01$; ns: no significant. (n=8).

Table 3. Ratios between IC₅₀ obtained in XO inhibition test (Spectrophotometry) and those obtained in chemiluminescence test (Lum).

	IC ₅₀ Spect #	IC ₅₀ Lum #	Spect/Lum ratio
Allopurinol	6.66	0.0365	182.45
CrE	432.99	6.86	63.12
HxE	295.7	0.179	1651.2
ChE	355.87	0.2	1779.35
AcE	313.29	1.41	222.19
AqE	620.11	12.23	50.7

IC₅₀ in μg/ml

Table 4. EC1 and RP obtained for standard antioxidants and *N.sativa* extracts in FRAP assay

	EC1 ^(a)		PR ^(c)	
	4 min	30 min	4 min	30 min
Ascorbic acid	83.83 ± 1.07 ^(a)	86.7 ± 1.63 ^{ns}	12.12 ± 0.88	11.68 ± 0.81 ^{ns}
Gallic acid	50.77 ± 2.12 ^(a)	36.47 ± 0.15 [*]	19.46 ± 1.57	28.19 ± 1.34 ^{**}
Quercetin	80.62 ± 1.79 ^(a)	42.55 ± 0.94 ^{**}	11.62 ± 1.54	24.07 ± 1.82 ^{**}
Rutin	253.82 ± 5.94 ^(a)	162.64 ± 1.32 ^{**}	3.73 ± 0.3	6.14 ± 0.37 ^{**}
CrE	5.01 ± 0.076 ^(b)	3.33 ± 0.08 ^{**}	0.19 ± 0.03	0.3 ± 0.03 ^{**}
HxE	3.76 ± 0.19 ^(b)	3.36 ± 0.05 ^{ns}	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.02 [*]
ChE	1.032 ± 0.1 ^(b)	0.98 ± 0.09 ^{ns}	0.98 ± 0.06	1.017 ± 0.075 ^{ns}
AcE	1.12 ± 0.03 ^(b)	0.75 ± 0.03 [*]	0.92 ± 0.042	1.41 ± 0.09 ^{**}
AqE	5.89 ± 0.18 ^(b)	3.69 ± 0.13 ^{**}	0.16 ± 0.029	0.26 ± 0.04 ^{**}

(a) EC1 expressed in µg/ml

(b) EC1 expressed in mg/ml

(c) RP expressed in µmole Eq FeSO₄·7H₂O /mg.

Values are means of 6 to 12 assays ± SD. Comparisons were performed between values calculated at 4 and 30min (**p*<0.05, ***p*<0.01, ns: no significant).

CONCLUSION

In the present study, we evaluated the *in vitro* antioxidant capacity of *N. sativa* extracts by different methods. In all tests used, we observed a significant correlation between flavonoid content and antioxidant efficiency, suggesting that the observed antioxidant activity could be due, at least partly, to flavonoids; although, the contribution of other compounds such as the oil fraction cannot be ruled out. Further studies would be necessary to identify the molecules responsible for antioxidant activity especially in HxE, ChE and AcE fractions.

REFERENCES

- [1] W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82, 47 (2002).
- [2] R.L. Prior, G. Cao, In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods, *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1173 (1999).
- [3] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. (Oxford University Press, London, 1998).
- [4] J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell, Antioxidant Protection and Oxygen Radical Signaling, in: D.L. Gilbert, C.A. Colton (Eds), *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. (Kluwer Academic Publishers, New York, 2002).
- [5] R. Kohen, A. Nyska, Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification, *Toxicol. Pathol.* 30, 620 (2002).
- [6] P.G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.* 63, 1035 (2000).
- [7] R. Harrison, Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now?, *Free Radic. Biol. Med.* 33, 774 (2002).
- [8] M.R. Tarkka, S. Kaukinen, P. Holm, U. Kaukinen, T. Sisto, J. Kataja, W.Q. Huang, Allopurinol does not increase free radical scavenging capacity during reperfusion in coronary artery bypass graft patients, *Scand. Cardiovasc.* 34, 409 (2000).
- [9] C. Enroth, B.T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino, E.P. Pai, Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 10723 (2000).
- [10] E. Della Corte, F. Stirpe, The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme, *Biochem. J.* 126, 739 (1972).
- [11] F. Borges, E. Fernandes, F. Rolivera, Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 9, 195 (2002).
- [12] B.H. Ali, G. Blunden, Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytother. Res.* 17, 299 (2003).
- [13] M. El-Dakhkhny, N.J. Madi, N. Lember, H.P.T. Ammon, *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leucocytes from

- rats, *J. Ethnopharmacol.* 81, 161 (2002).
- [14] K.M. Fararh, Y. Atoji, Y. Shimuzu, T. Takewaki, Insulinotropic properties of *Nigella sativa* oil in streptozotocin plus nicotinamide diabetic hamster, *Res. Vet. Sci.* 73, 279 (2002).
- [15] M. Kanter, I. Meral, Z. Yener, H. Ozbek, H. Demir, Partial regeneration / proliferation of the β -cells in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin induced diabetic rats, *Tohoku J. Exp. Med.* 201, 213 (2003).
- [16] Z. Houcher, K. Boudiaf, M. Benboubetra, B. Houcher, Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats, *Pteridins* 18, 8 (2007).
- [17] A. Haq, P.I. Lobo, M. Al-Tufail, N. Rama, S.T. Al-Sedairy, Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography, *Int. J. Immunopharmacol.* 21, 283 (1999).
- [18] K.M. Fararh, Y. Atoji, Y. Shimuzu, T. Shiina, H. Nikami, T. Takewaki, Mechanisms of hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters, *Res. Vet. Sci.* 77, 123 (2004).
- [19] H. Gali-Muhtasib, M. Diab-Assaf, C. Boltz, J. Al-Hmaira, R. Hartig, A. Roessner, R. Schneider-Stock, Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cell via p53-dependant mechanism, *Int. J. Oncology*, 25, 857 (2004).
- [20] E.M. Awad, In vitro decrease of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil, *Phytomedicine*. 12, 100 (2005).
- [21] M.S. Al-Ghamdi, Protective effect of *Nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage, *Am. J. Chin. Med.* 31, 721 (2003).
- [22] B.H. Ali, The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats, *Am. J. Chin. Med.* 32, 49 (2004).
- [23] O.A. Badary, R.A. Taha, A.M. Gamal El-Din, M.H. Abdel-Wahab, Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger, *Drug Chem. Toxicol.* 26, 87 (2003).
- [24] M.F. Ramadan, L.W. Kroh, J-T Mörsel, Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seeds oils and oil fractions, *J. Agric. Food Chem.* 51, 6961 (2003).
- [25] S.C. El-Saleh, O.A. Al-Sagair, M.I. Al-Khalaf, Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats, *Int. J. Cardiol.* 93, 19 (2004).
- [26] M.B. Atta, K. Imaizumi, Antioxidant activity of nigella (*Nigella sativa* L.) seeds extracts, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 47, 49 (1998).
- [27] M.L. Price, L.G. Butler, Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of the tannin content of sorghum grain, *J. Agric. Food Chem.* 25, 1269 (1977).
- [28] H.D. Graham, Modified Prussian blue assay for total polyphenols, *J. Agric. Food Chem.* 40, 801 (1992).
- [29] T. Bahorun, B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, T. Dine, M. Luckv, J. Vasseur, M. Cazin, J.C. Cazin, M. Pinkas, Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations, *Arzneimittelforschung* 46, 1086 (1996).
- [30] S.A. Sanders, R. Eisenthal, R. Harrison, Oxidation of NADH by human xanthine oxidoreductase: generation of superoxide anion, *Eur. J. Biochem.* 245, 541 (1997).
- [31] A. Baghiani, R. Harrison, M. Benboubetra, Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase, *Arch. Physiol. Biochem.* 111, 407 (2003).
- [32] D. Atmani, A. Baghiani, M. Benboubetra, R. Harrison, NADH oxidation and superoxide production of goat milk xanthine oxidoreductase. *Int. Dairy J.* 15, 1113 (2005).
- [33] H. Bouriche, Modulation of inflammation by *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin, studied in vitro and in vivo. Ph. D. Thesis, University of Setif, Algeria, 2005.
- [34] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239, 70 (1996).
- [35] R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power, *J. Agric. Food Chem.* 48, 3369 (2000).
- [36] I. Parejeo, F. Viladomat, J. Bastida, A. Rosas-Romero, G. Saavedra, M.A. Murcia, C. Codina, Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity, *Life Sci.* 73, 1667 (2003).
- [37] S. Jiwajinda, V. Santisopasri, A. Murakami, O.K. Kim, H.W. Kim, H. Ohigashi, Suppressive Effects of Edible Thai Plants on Superoxide and Nitric Oxide Generation, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 3, 251 (2002).
- [38] Z. Zhang, D.R. Blake, C.R. Stevens, J.M. Kanczler, P.G. Winyard, M.C.R. Symons, M. Benboubetra, R. Harrison, A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: The role of NADH as an electron acceptor, *Free Rad. Res.* 28, 151 (1998).
- [39] L. Costantino, A. Albasini, G. Rastelli, S. Benvenuti, Activity of polyphenolic crude extracts

- as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase, *Planta Med.* 58, 342 (1992).
- [40] R.J. Safitri, P. Tarigan, H.J. Freisleben, R.J. Rumampuk, A. Murakami, Antioxidant activity in vitro of two aromatic compounds from *Caesalpinia sappan* L, *Bio. Factors*, 19, 71 (2003).
- [41] S. Martín-Aragón, B. Basabe, J.M. Benedit, A.M. Villar, In vitro and in vivo antioxidant properties of *Vaccinium myrtillus*, *Pharm. Biol.* 37, 109 (1999).
- [42] N. Cotelle, Role of flavonoids in oxidative stress, *Curr. Top. Med. Chem.* 1 (2001) 569-590.
- [43] P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A.V. Vlietinck, D.K. Berghe, Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *J. Nat. Prod.* 61, 71 (1998).
- [44] D.E.C. Van Hoorn, R.J. Nijveldt, P.A.M. Van Leeuwen, Z. Hofman, L. M'Rabet, D.B.A. De Bont, K. Van Norren, K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids, *Eur. J. Pharmacol.* 451, 111 (2002).
- [45] S.V. Javanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M.J. Simic, Flavonoids as antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4846 (1994).
- [46] G. Cao, R.K. Prior, Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, *Clin. Chem.* 44, 1309 (1998).
- [47] B. Ou, D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan, E.K. Deemer, Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study, *J. Agric. Food Chem.* 50, 3122 (2002).
- [48] B.L. Halvorsen, K. Holte, M.C.W. Myhrstad, I. Barikmo, E. Hvattum, S.F. Rernberg, A.B. Wold, K. Haffner, H. Baugerød, L.F. Andersen, J. Ø. Moskaug, D.R. Jacobs, R. Blomhoff, A systematic screening of total antioxidants in dietary plants, *J. Nutr.* 132, 461 (2002).
- [49] N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti, Total antioxidant capacity of plant foods, brverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro methods, *J. Nutr.* 133, 2812 (2003).
- [50] I. Tosun, S. Ustun, S. An investigation about antioxidant capacity of fruit nectars, *Pak. J. Nutr.* 2, 167 (2003).
- [51] A. Janaszewska, G. Bartosz, Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62, 231 (2002).

Strategies of antioxidant drug discovery

Kaouthar BOUDIAF

Laboratoire de Chimie des Matériaux et du vivant. Activité
et Réactivité (LCMVAR).

Department of Nature and Life Sciences, Faculty of
Sciences, El Hadj Lakhdar University
Batna, Algeria
boudiafkaouthar@yahoo.fr

Mustapha BENBOUBETRA

Laboratory of Applied Biochemistry
Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Ferhat
Abbes1 University
Setif, Algeria

Abstract—Oxidative stress, a state of imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, is known to be implicated in a wide range of diseases including cancer and many inflammatory, cardiovascular and neurodegenerative diseases. The high reactivity of the oxidants (known as reactive oxygen species or ROS) allows them to attack biological structures; membrane lipids, nucleic acids, proteins and enzymes, resulting in irreversible cellular damage. To counter this harmful wave, chemical antioxidants have been widely used as food complements despite their side effects. Recently, more attention has been offered to natural antioxidants, found mostly in plants, because of their extraordinary diversity and above all their inoffensive nature. Normally, living organisms are equipped with an arsenal of enzymatic and non-enzymatic endogenous antioxidants. In oxidative stress condition, this natural wall of defense is overwhelmed by oxidants (coming from the outside, or produced by the cellular enzymes) causing the balance to succumb. That's the reason behind the importance of providing the organism with exogenous antioxidants. An antioxidant is defined as "a molecule capable of slowing or preventing the oxidation of other molecules". To do so, it can act as a free radical scavenger, a chelating agent (catching bivalent ions involved in primary ROS to much more toxic species), a reducing agent or an inhibitor of one the most important producers of ROS in living cells (xanthine oxidase and NADPH oxidase). This work offers an enlarged overview of the recent and most effective strategies used in discovering antioxidants in natural sources, from in vitro tests to clinical trials.

Keywords—Oxidative stress, antioxidants, scavenger, animal models, NADPH oxidase

I. INTRODUCTION

The "oxygen paradox" is defined by the fact that aerobic organisms require oxygen for survival but oxygen is also inherently toxic to these organisms due to its association with free radical generation and oxidative stress. Various free radicals are common products of respiration and other biochemical reactions in cells that are normal physiological processes essential for survival. To survive in an unfriendly oxygen environment, living organisms generate water- and lipid-soluble antioxidants that can neutralize these highly reactive free radicals [1]. For healthy living, a delicate balance must be maintained between oxidative stress and antioxidant defense of the body. If the body's antioxidant mechanism does

not operate optimally, excess free radicals can damage various biomolecules, including lipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids [2].

Dietary, natural or synthetic antioxidants are essential to maintain a healthy redox statue. The objective of this paper is to show the different steps followed in evaluating antioxidant properties of a given substance in order to be used in antioxidant therapy.

II. FREE RADICALS AND OXIDATIVE STRESS

A. Free Radicals and Their Sources

Free radicals are defined as molecules or molecular fragments containing one or more unpaired electrons in the outer orbit. This unpaired electron(s) is unstable and usually gives a significant degree of reactivity to the free radical. Reactive Oxygen species (ROS) includes superoxide ($O_2^{\bullet -}$), hydroxyl ($\bullet OH$), peroxy ($ROO^{\bullet}$), lipid peroxy ($LOO^{\bullet}$), alkoxyl ($RO^{\bullet}$) radicals. Reactive Nitrogen Species (RNS) includes nitric oxide ($NO^{\bullet}$) and nitrogen dioxide ($NO_2^{\bullet}$). Oxygen and nitrogen free radicals can be readily converted to other non-radical reactive species which are also dangerous for health. Hydrogen peroxide (H_2O_2), ozone (O_3), singlet oxygen (1O_2), hypochlorous acid ($HOCl$), nitrous acid (HNO_2), peroxyxynitrite ($ONOO^-$), dinitrogen trioxide (N_2O_3), lipid peroxide ($LOOH$) are not free radicals and generally named oxidants and can easily lead to free radical reactions in living organisms. Oxidants are also capable of nitrosylating proteins thereby disrupting biological function. Thus, ROS and RNS include radical and non-radical species. These reactive species are produced in animals and humans under physiologic and pathologic conditions [3-6].

ROS and RNS can be produced from both endogenous and exogenous substances. Production of these reactive species in the body is continuous and a normal part of our physiology. The biological process associated with free radical generations includes the following [6-9 cited 10]:

- *Immune system*: Immune system cells generate ROS in response to pathogens.

- *Metabolic process*: Free radicals can generate during metabolism of arachidonic acid, platelets, macrophages and smooth muscle cells. Lipid peroxidation an important source of free radicals and can formed from several sources like mitochondrial cytochrome oxidase, xanthine oxidases, NADPH oxidase of neutrophils. Mitochondria generate continuously and abundantly oxy-radicals and ROS as toxic waste through a number of metabolic processes, each of which can produce different free radicals.

- *Inflammation*: Inflammation releases cytokines and initiates neutrophils and macrophages to produce free radicals.

- *Stress*: Mental and body's stress can trigger the production of free radicals as a toxic by-product. Additionally, the hormones that mediate the stress reaction in the body like cortisol and catecholamine themselves degenerate into destructive free radicals.

- *Pollution*: The different type of pollutants like air pollutants (asbestos, benzene, carbon monoxide, chlorine, formaldehyde, ozone, and toluene), chemical solvents (cleaning products, glue, paints, paint thinners, perfumes, and pesticides), and water pollutants (chloroform and other trihalomethanes) are all potent generator of free radicals. Burning of organic matter during cooking, forest fires, and volcanic activities also can generate free radicals.

- *Radiation*: UV radiations, medical and dental x-rays, gamma rays, and microwave radiation can lead to free radical generation.

- *Dietary factors*: Additives, alcohol, coffee, foods from animal origin, foods that have been barbecued, broiled fried, grilled, or otherwise cooked at high, temperatures, foods that have been browned or burned, herbicides, hydrogenated vegetable oils, pesticides, sugar and processed foods containing high levels of lipid peroxides, and can produce free radicals.

- *Toxins and drugs*: Carbon tetrachloride, paraquat, benzo pyrene, aniline dyes, toluene and drugs like adriamycin, bleomycin, mitomycin C, nitrofurantoin, chlorpromazine etc. increases free radical productions.

- *Other factors*: Automobile exhausts fumes, smoking of tobacco products, cause free radicals generation.

B. Damage of Biomolecules by Free Radicals

Due to high reactivity, free radicals can damage virtually all biomolecules, including lipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids.

Lipids are major targets for oxidative damage induced by free radicals.

Lipid peroxidation can cause cell membrane damage by alteration of membrane fluidity and permeability. Lipid peroxidation mediated by free radicals is a series of chain reactions involving initiation, propagation, and termination.

Free radicals that can initiate lipid peroxidation include the hydroxyl radical (most reactive), alkoxyl radicals, peroxy radicals, and peroxyxynitrite. Metal ions such as cuprous and ferrous ions can also contribute catalytically in chain initiation. All polyunsaturated fatty acids can undergo lipid peroxidation, but the rate of reaction for lipid peroxidation is docosahexaenoic acid.eicosapentaenoic acid.arachidonic acid.linoleic acid [2]. Major end products of lipid peroxidation are aldehydes such as malondialdehyde, acrolein, and 4-hydroxy-2-nonenal. Acrolein and, to some extent, 4-hydroxy-2-nonenal, are highly reactive compounds that can damage proteins, DNA, and phospholipids. Secondary oxidation products are a series of prostaglandin-like products known as isoprostanes as well as monocyclic and serial cyclic peroxides. Isoprostanes, especially F2-isoprostane, are excellent markers of endogenous lipid peroxidation and oxidative stress [11].

Amino acids and proteins are susceptible to oxidative damage by hydroxyl radicals. Oxidation of proteins by reactive oxygen species and reactive nitrogen species involves side chains of all amino acid residues of proteins. In particular, sulfur-containing cysteine and methionine residues of proteins are very susceptible to oxidation by both reactive oxygen and reactive nitrogen species. Oxidation of cysteine residue leads to the formation of disulfides, and methionine is oxidized to methionine sulfoxide residues. However, disulfide reductase enzymes present in the human body can repair such damage, but these are the only oxidized form of protein that can be repaired. Peptide bond cleavage may occur due to reaction of reactive oxygen species with glutamyl, aspartyl, and prolyl side chain. As a result of protein oxidation, protein carbonyl derivatives are generated that can be used as a marker of the extent of free radical-induced protein damage [12].

Hydroxyl radicals can damage DNA and are implicated in mutagenesis, carcinogenesis, and aging. Reactive oxygen and reactive nitrogen species can lead to DNA oxidation including direct modification of nucleotide base, formation of apurinic/apyrimidinic sites, DNA single-strand breaks, and, less frequently, DNA double-strand breaks. Of all the nucleotides, guanine is the most susceptible to oxidative damage where the hydroxyl radical can interact with C4, C5, and C8 positions in the imidazole ring of guanine, and formation of 8-hydroxyguanine (also known as 8-oxo-7,8-dihydroguanine) can be utilized as a marker of DNA damage. Peroxynitrite can also react with guanine with formation of 8-nitroguanine, which is considered a marker of nitrosative DNA damage. Single-strand break is a result of interaction of hydroxyl radicals with deoxyribose and subsequent generation of peroxy radicals responsible for nicking phosphodiester bonds that form the backbone of each helical strand of DNA [13].

C. The organism's antioxidant defense

Continuous exposure to various types of oxidants from numerous sources has led the cell and the entire organism to develop defense mechanisms for protection against reactive metabolites.

Various antioxidants with different functions play their respective roles in the defense network in vivo. Some antioxidants are proteins and enzymes, while others are small molecules. The body's defense antioxidants consist of both endogenous and diet-derived exogenous antioxidants [2] (Table 1). From the viewpoint of mechanistic functions, the antioxidants may be classified into preventing antioxidants, scavenging antioxidants, and repair and de novo antioxidants (Fig. 1) [14].

The preventing antioxidants function as the first line defense by suppressing the formation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) by, for example, reducing hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides to water and lipid hydroxides, respectively, or by sequestering metal ions such as iron and copper [15]. Antioxidants, which directly interact with ROS of various kinds, belong to two major groups: antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants. The enzyme-containing group is composed of direct-acting proteins, such as SOD (superoxide dismutase). The enzyme activity itself is capable of enhancing the spontaneous dismutation of superoxide radicals to H_2O_2 [16]. The end product of the dismutation reaction (H_2O_2) can be removed

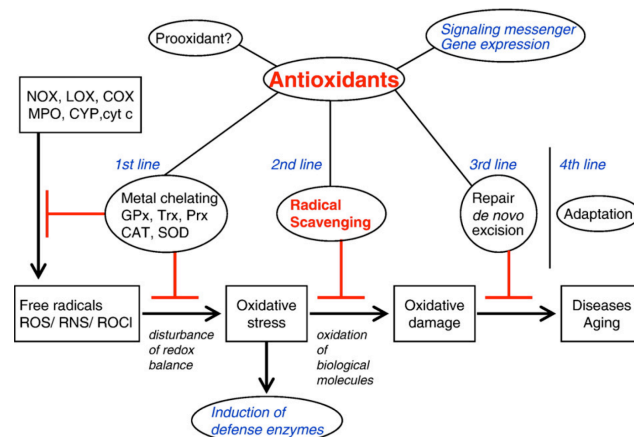


Fig. 1. Defense network in vivo against oxidative stress. Various antioxidants with different functions play their roles in the defense network, the free radical scavenging antioxidants being one of the players [15].

by the activity of the enzyme catalase and members of the peroxidase family including glutathione peroxidase [17].

Scavenging antioxidants act as the second line defense in vivo [15]. These molecules share a similar chemical trait that allows them to donate electrons to the oxygen radical so that they can scavenge the radical and prevent it from attacking the biological target. Scavengers possess many advantages over the group of enzymatic antioxidants. Because scavengers are small molecules, they can penetrate cellular membranes and be localized in close proximity to the biological target. The cell can regulate their concentrations, and they can be regenerated within the cell. They possess a wide spectrum of activities toward a large variety of ROS. The scavenging mechanism can proceed only if the concentration of the scavenger is sufficiently high to compete with the biological target on the deleterious species [18].

Scavengers originate from endogenous sources, such as biosynthetic processes and waste-product generation by the cell, and exogenously from diet. That the number of LMWA synthesized by the living cell or generated as waste products is so limited is surprising (eg, histidine dipeptides [19], glutathione [20], uric acid [21], lipoic acid [22], and bilirubin [23]); most LMWA are derived from dietary sources [24].

Various enzymes function in the third line defense by repairing damages, clearing the wastes, and reconstituting the lost function [15].

The DNA repair system, for example, can identify a DNA-oxidized adduct, remove it, and incorporate an undamaged base [25-26]. Molecules that can donate hydrogen atoms to damaged molecules are also considered repair compounds; one such example is the donation of a hydrogen atom by ascorbate or tocopherol to a fatty acid radical that was previously attacked by a radical and lost its hydrogen [24].

TABLE 1. Classification of antioxidants [10].

A. CLASSIFICATION BASED UPON THEIR NATURE	
1. Enzymatic antioxidant	Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx), and Glutathione reductase (GR).
2. Non-enzymatic antioxidant	
a) Metabolic antioxidants	Reduced glutathione (GSH), lipid acid, L-arginine, coenzyme Q ₁₀ , melatonin, uric acid, bilirubin, metal-chelating proteins, transferrin, etc
b) Nutrient antioxidants	Vitamin E, vitamin C, carotenoids, trace metals (selenium, manganese, zinc), flavonoids, omega-3 and omega-6 fatty acids, etc
B. CLASSIFICATION BASED UPON SOURCE	
1. Endogenous Antioxidants	Bilirubin, glutathione, lipoic acid, N-acetyl cysteine, NADPH and NADH, ubiquinone (coenzyme Q ₁₀), uric acid, enzymes (SOD, CAT, GPx, GR).
2. Dietary Antioxidants	Vitamin C, Vitamin E, Beta carotene and other carotenoids and oxcarotenoids (lycopene and lutein), polyphenols (flavonoids, flavones, flavonols, and proanthocyanidins
3. Metal Binding Proteins	Albumin (copper), ceruloplasmin (copper), metallothionein (copper), ferritin (iron), myoglobin (iron), transferrin (iron).
C. CLASSIFICATION BASED MECHANISM OF ACTION	
1. Catalytic systems to neutralise or divert ROS	SOD, CAT, GPx
2. Binding/inactivation of metal ions prevents production of ROS by Haber-Weiss reaction	Ferritin, caeruloplasmin, catechins
3. Self suicidal and chain breaking antioxidants scavenge, destroy ROS	Vitamin C, vitamin E, uric acid, glutathione, flavonoids
4. Quenching ROS, chemical traps/sinks to 'absorb' energy	Carotenoids, anthocyanidins

In addition, the adaptation mechanism functions as the fourth line defense, in which appropriate antioxidants are generated at the right time and transferred to the right position in right concentration. Furthermore, there is now increasing evidence showing that some antioxidants act as a cellular signaling messenger to regulate the level of antioxidant compounds and enzymes [15].

D. Oxidative Stress

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are the by-products resulting from the cellular redox process. These reactive species play a dual role in human as both toxic and beneficial compounds. The delicate balance between their two opposite effects is undoubtedly a key aspect of life [10]. At low or moderate levels, reactive species exert beneficial effects on cellular redox signalling and immune function, but at high concentrations, they produce oxidative stress, a harmful process that can damage cell function and structures [6,9].

The term oxidative stress refers to a condition where the levels of ROS significantly overwhelm the capacity of antioxidant defenses in a biological system. Oxidative stress condition can be caused by either increased ROS formation or decreased activity of antioxidants or both in a biological system. Oxidative stress condition is associated with oxidative damage to biomolecules, including proteins, lipids, and nucleic acids. Moderate oxidative stress may cause cell dysfunction, whereas overt oxidative stress usually causes cell death [27].

The disease conditions in which oxidative stress plays a role usually involve sustained formation of relatively large amounts of ROS via various mechanisms, including activation of inflammatory cells.

Oxidative stress and inflammation are intimately related processes. On the one hand, inflammation leads to the production of ROS/RNS from cellular sources, including NAD(P)H oxidase and inducible nitric oxide synthase. Such formed ROS/RNS mediate the detrimental effects associated with dysregulated inflammation. On the other hand, ROS/RNS cause increased expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules, thus augmenting or propagating the dysregulated inflammatory process. Such a dysregulated inflammatory state is sometimes referred to as inflammatory stress. As oxidative stress and inflammation are closely intertwined, the compound term oxidative/inflammatory stress has been used in the literature to describe settings where both oxidative stress and dysregulated inflammation contribute to disease pathophysiology [27].

E. Oxidative stress and human disease

It has been increasingly realized that because of the ubiquitous biological toxicity of ROS, the similarity of ROS-induced pathology to that of many spontaneous diseases, and the relative ease with which ROS are produced, much disease,

from malignancy to cardiovascular disease and dementia, is associated with ROS [28].

Increased formation of ROS/RNS and subsequent oxidative damage to biomolecules have been consistently observed under various disease conditions. However, these observations do not necessitate a causal relationship between oxidative stress and disease development. Possible relationships between oxidative stress and diseases, and the effects of controlling ROS/RNS on disease development are summarized below [27].

- ROS/RNS act as the only initial cause of the disease. Control of the ROS/RNS will prevent or stop the disease development.
- ROS/RNS act as one of the initial causes of the disease. Control of the ROS/RNS will mitigate the disease development.
- ROS/RNS act as a contributing factor in the disease progression. Control of the ROS/RNS will slow the disease progression.
- ROS/RNS are formed as a consequence of the disease and contribute to the progression of the disease pathophysiology. Control of the ROS/RNS will slow the disease progression.
- ROS/RNS are formed as a consequence of the disease and play no role in disease initiation or progression. Control of the ROS/RNS will have no effects on disease process. Table 2 lists some of the disease processes and related conditions in which oxidative stress plays a role.

III. ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT CAPACITY

An antioxidant may be defined as a substance which, when present at low concentrations compared with those of an oxidizable substrate, such as fats, proteins, carbohydrates or DNA, significantly delays or prevents the oxidation of the substrate [29].

A compound might exert antioxidant actions *in vivo* or in food by inhibiting generation of ROS, or by directly scavenging free radicals. Additionally, *in vivo* an antioxidant might act by raising the levels of endogenous antioxidant defenses (e.g. by upregulating expression of the genes encoding SOD, catalase or glutathione peroxidase) [30]. In the stressful unhealthy 21st century's way of life, antioxidants have gained a considerable attention, and demand for intake of antioxidant food or dietary antioxidant is increasing with the hope of keeping the body healthy and free from diseases [31,32].

It is reasonable to expect the beneficial effects of antioxidants in maintaining our health and lowering disease risk. Thus the assessment of antioxidant capacity has been the subjects of extensive studies. There is no general, reliable method for assessment of antioxidant capacity even *in vitro*. The effects of antioxidants *in vivo* are far less understood. It is difficult to show unequivocally whether or not antioxidants are in fact effective for prevention and/or treatment of diseases and, if so, whether it is by the action of scavenging free

radicals. Solid data showing the correlation between antioxidant capacity and successful pharmacological properties has not been reported [15]. Fig.2 summarizes the overall strategy in evaluation antioxidant action, capacity and efficacy of antioxidants of different natures (natural or synthetic).

TABLE 2. Disease processes and related conditions in which reactive oxygen and nitrogen species play a causal or contributing role [27].

Disease	Description
Cardiovascular Diseases	Hypertension, Atherosclerosis Myocardial ischemia-reperfusion injury Heart failure, Cardiotoxicity
Diabetes and Metabolic Syndrome	Diabetes, Diabetic complications Obesity, Insulin resistance
Neurological Diseases	Alzheimer's disease, Parkinson's disease Stroke, Amyotrophic lateral sclerosis
Pulmonary Diseases	Chronic obstructive pulmonary disease Asthma, Hyperoxia-induced lung injury Pulmonary toxicity
Hepatic and Gastrointestinal Diseases	Alcoholic fatty liver disease Nonalcoholic fatty liver disease Hepatotoxicity, Inflammatory bowel disease Ischemia-reperfusion injury
Renal Diseases	Diabetic nephropathy Ischemia-reperfusion injury, Nephrotoxicity
Eye Diseases	Cataract Age-related macular degeneration
Skin Diseases	Ultraviolet light-induced skin injury Scleroderma, Contact dermatitis, Psoriasis
Cancer	Chemical carcinogenesis Spontaneous cancer development Angiogenesis, Cancer metastasis
Aging	Lifespan Aging-related organ degeneration
Arthritic Diseases	Rheumatoid arthritis Other types of arthritis
Sepsis	Septic shock Multiple organ dysfunction
Infections	Viral infections Bacterial infections

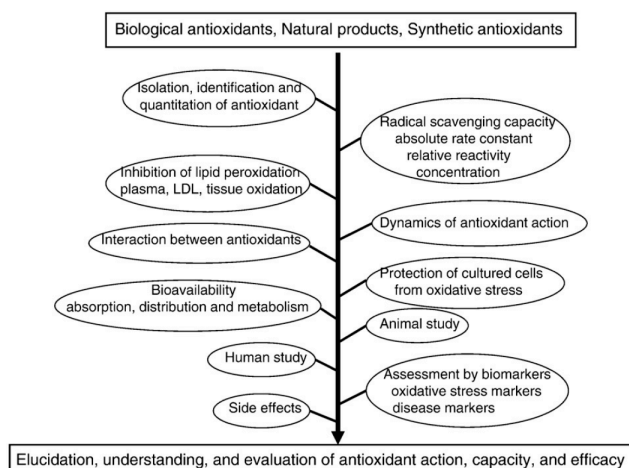


Fig. 2. Unit processes and factors for assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo [15].

A. Assessment of Free Radical Scavenging Capacity in vitro

Various assays have been described in which the putative antioxidant is added to a reaction mixture in which free radicals are generated. The mechanism involved and the type of assessment, antioxidant capacity assays can be divided in two main categories. The first category is an “assessment of antioxidant efficacy in relation to free radical species”. This category includes different reaction mechanisms models such as: (1) Hydrogen atoms transfer reactions model (HAT) based on the transfer of hydrogen atoms; (2) Single electron transfer reactions model (SET) based on the transfer of a single electron; (3) Hydrogen-electron transfer reactions model combining the two mechanisms HAT and SET [33].

The second category is an “assessment of antioxidant efficacy using biological significant markers and significant substrates” [34-36]. This category involves the determination of antioxidant efficacy via evaluation of the damaging effects on a biological substrate produced by reactive species of oxygen (ROS) or related nitrogen oxide species (RNOS) when reacting lipids, lipoproteins, DNA etc. [37].

According to the Halliwell's definition of an antioxidant [29], not all reductants involved in a chemical reaction are antioxidants; only those compounds which are capable of protecting the biological target meet these criteria. This protection may be based on several mechanisms of action, namely: (i) inhibition of generation and scavenging capacity against ROS/RNS; (ii) reducing capacity; (iii) metal chelating capacity; (iv) activity as antioxidative enzyme; (v) inhibition of oxidative enzymes [38]. Table 3 summarizes the most important in vitro tests for the assessment of antioxidant capacity:

TABLE 3. List of In-Vitro antioxidant methods [39]

Name of the method
Hydrogen Atom Transfer methods (HAT)
Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method
Lipid peroxidation inhibition capacity (LPIC) assay
Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP)
Inhibited oxygen uptake (IOC)
Crocin bleaching Nitric oxide radical inhibition activity
Hydroxyl radical scavenging activity by p-NDA (p-butiridunethyl aniline)
Scavenging of H ₂ O ₂ radicals
ABTS radical scavenging method
Scavenging of super oxide radical formation by alkaline (SASA)
Electron Transfer methods (ET)
Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) decolourization
Ferric reducing antioxidant power (FRAP)
DPPH free radical scavenging assay
Copper (II) reduction capacity
Total phenols by Folin-Ciocalteu
N,N-dimethyl-p-Phenylenediamine (DMPD) assay
Other Assays
Total oxidant scavenging capacity (TOSC)
Inhibition of Briggs – Rauscher oscillation reaction
Chemiluminescence
Electrochemiluminescence
Fluorometric Analysis
Enhanced chemiluminescence (ECL)
TLC bioautography
Cellular antioxidant activity (CAA) assay
Dye-substrate oxidation method

Measurements of lipid peroxidation should be the first line of tests to establish the potential antioxidant action of dietary antioxidant compounds. An antioxidant index based on the ability to scavenge peroxy radicals may then provide support for antioxidant efficacy in *in vitro* systems [40,41].

The deoxyribose assay allows the determination of rate constants of reactions with OH $\cdot$ radicals, the assessment of abilities to exert prooxidant action, and the assessment of abilities to chelate metal iron. Assays involving DNA damage have also been developed for assessing pro-oxidant actions. These assays have unique features. The positive pro-oxidant actions in the deoxyribose system rely on the ability of the compounds to interact with metal ions (i.e. to promote reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ chelates) and hence, to promote OH $\cdot$ formation in the presence of H₂O₂. The assays involving DNA rely on the ability to reduce the metal ions in the iron-bleomycin-DNA or the copper-1,10-phenanthroline-DNA complex [40].

During *in vitro* testing, it is essential to examine the action of a compound over a concentration range that is relevant to its intended use. For example, if the compound is present *in vivo* at low concentrations (less than 1 μ mol), its ability to inhibit lipid peroxidation only at high millimolar concentrations is irrelevant unless there is good reason to suspect that it concentrates at a particular site *in vivo*. The same is true if the compound exerts a pro-oxidant effect at high concentrations *in vitro* and is only present at low concentrations and exerts antioxidant action to different species [40].

There is considerable debate about which method is best and it is critical to understand that these tests are done in test tubes, not in people, since, there are different ways to measure antioxidant power, leaving research people seriously confused [39].

The commonly accepted methods for evaluating antioxidant capacity rely on the inhibition of radical chain reactions caused by a presumed antioxidant.

Most of the methods are based on the decrease of specific absorbance of a long-lived free radical in the presence of the antioxidant. The decrease of the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and of the radical cation derived from 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) are the stable radicals mainly used in 'in vitro' assays as they provide easily comparable results.

Despite the possibility of determining antioxidant capacity using important biological markers and substrates, the most frequently used methods are still based on the assessment of antioxidant efficacy as radical scavengers. This choice is due to the fact that methods using biological significant markers are affected by several drawbacks such as:

1. The lack of reproducibility when using the oxygen consumption method that is connected with the general lack of reproducibility of oxygen electrodes.

2. The lack of reproducibility when using lipoproteins which are obtained by extraction from tissues.

3. The complexity of the procedures used to follow the reaction(s).

4. The difficulties of automating these kinds of methods.

Finally, the ORAC, TEAC or DPPH assays are not strictly related to a compound's efficacy against ROS and consequently not strictly related to the antioxidant activity. These methods are more frequently used to assess the radical scavenging behaviour of food and raw materials [37].

In vitro assays can only rank antioxidant activity for their particular reaction system and their relevance in *in vivo* health protective activities is uncertain. Therefore, it is prudent to use more than one type of antioxidant assay to measure antioxidant activities, and to include at least one assay that has biological relevance [39].

As the total antioxidant capacity is dependent of a multitude of factors, a "battery" of assays measuring different aspects of the behaviour of antioxidants is strongly recommended to generate a complete antioxidant profile. In this context, a primary factor to consider when selecting a method is the mechanism of reaction and its relationship to what might occur in the envisioned application. It is also advantageous to select methods that are commonly accepted, validated and standardized, with a large body of comparable data available in the literature [38].

B. Antioxidant Capacity in Cultured Cells

The advantage of using cultured cells is that various different stressors and cell types including model systems for some specific disease can be used for evaluation of the antioxidant effects. The effects of antioxidants have been measured against oxidative stress in cultured cells for the suppression of ROS formation, oxidation of lipids, proteins and DNA, and cell death. The antioxidants are added to the cell culture medium simultaneously with the stressor or preincubated beforehand to incorporate into the cells. It is very important to measure the intake of antioxidant into the cells for sound evaluation of the antioxidant effect, because the rate of intake into the cells varies markedly with the antioxidants [15].

The amount of antioxidants, especially lipophilic antioxidant, added into the culture medium should be chosen carefully so they would not differ much from the physiological conditions.

C. Antioxidant capacity in vivo

Studies in order to evaluate the pharmacology of antioxidants (drug derived or plant-derived antioxidants) should balance the use of *in vivo* biomarkers with the choice of population, formulation and dose of antioxidants being used, the expected outcome variables, and the pathologic variables. Fig. 3 suggests one such rationale. The global direction would be for food and drug antioxidants to be

evaluated for their inherent properties using *in vitro* models. Assessment of their protective effects in human health and disease should then consider how the steady state levels of markers of oxidative damage are affected by the antioxidants [30].

The capacity of antioxidants *in vivo* is determined by many factors which should be taken into consideration in its assessment (Fig. 2). One of such factors is the bioavailability. The antioxidants should be absorbed, transported, distributed, and retained properly in the biological fluids, cells and tissues. The bioavailability of various antioxidants and effect of dosage and duration have been studied by analysis of biological fluids and tissues of humans and experimental animals after intake of antioxidants. The time-course change in the concentrations of metabolites as well as the parent antioxidant has been analyzed. Metabolism also affects the antioxidant capacity *in vivo* [15].

The capacity and efficacy of antioxidants *in vivo* may be assessed most accurately by the effect of antioxidant compounds and materials on the level of oxidation in biological fluids and tissues, such as plasma, erythrocytes, urine, and cerebrospinal fluids, from humans and experimental animals. Saliva and tear may also be used. Reliable biomarkers are essential for this purpose and many biomarkers for oxidative stress have been applied to measure the level of oxidation *in vivo* [42-45]. Oxidation products of lipids [46-51], oxidative modification and expression of proteins and sugars [52,53], strand breaks of DNA and oxidation products of DNA bases [54] have been used as oxidative stress biomarkers. Measurement of oxidative damage in humans is summarized in Table 4.

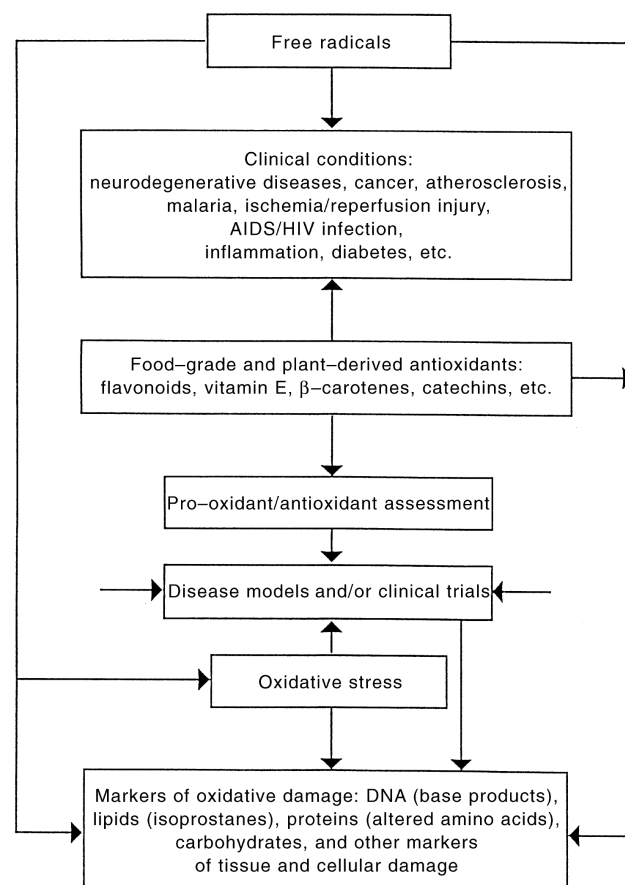


Fig. 3. Human antioxidant strategy [30].

TABLE 4. Measurement of oxidative damage in humans [30].

There are several indicators of the extent of oxidative damage in humans. Some of the most common include measuring:	
Oxidative DNA damage	
GC/MS/SIM detection of oxidized base products	
HPLC-based assays for oxidized base products	
Single gel electrophoresis assay (Comet assay)	
Oxidative damage to lipids	
Measurement of conjugated dienes	
Measurement of isoprostanes	
Measurement of hydroperoxides	
Measurement of thiobarbituric acid reactive materials by HPLC	
Assessment of the levels of antioxidant enzymes	
Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase	
Assessment of protein damage	
Steady state protein damage can be quantified in terms of the numbers of protein carbonyls and modified tyrosine residues.	
Total ongoing (repaired) protein damage can be indicated by the concentration of modified tyrosines and fluorescent bityrosines in the urine.	
Assessment of levels of low molecular weight antioxidants and vitamins	
Uric acid/allantoin, glutathione, flavonoids, vitamin E and C, β-carotene	

The effects of various antioxidants on the levels of oxidative stress biomarkers are evaluated in experimental animals under normal conditions and oxidative stress. The effects of antioxidants are further assessed in some clinical intervention cases and model animals for specific diseases. Some studies confirmed the positive effects of antioxidants and antioxidant rich diets to reduce the level of oxidative stress status *in vivo* as assessed by the biomarkers listed in Table 2, while others did not show any significant effects, in spite of the increase in the antioxidants. In contrast to the cultured cells which are often antioxidant-deficient and respond well to the added antioxidants, the beneficial effect of antioxidants is difficult to observe in normal healthy subjects with sufficient amounts of antioxidants [55,56]. Current evidence suggests that the antioxidant intake does not reduce oxidative stress biomarkers appreciably in healthy individuals with sufficient amounts of antioxidants under normal conditions, but that antioxidants lower such biomarkers in subjects in malnutrition, with increased oxidative stress or in patients of diseases related to oxidative stress [57].

Even in well-designed, randomized, cross-over, intervention studies, the data are contradictory and confusing, which may be ascribed to the complex effects of oxidative stress on pathogenesis, inadequate study design such as choice

of antioxidant, its dosage, starting time, duration, and methods of analysis [15]. The choice of subjects may also be critically important. It appears that the higher beneficial effects of antioxidants have been observed in animal studies than in human studies, which may be ascribed, at least in part, to the fact that animal studies are started often before the onset of disease, whereas those for humans after the onset of disease [15].

IV. CONCLUSION

Various biomarkers to determine the antioxidant capacity in a biological system have been developed and advanced. However it seems that there is not yet one system that predicts health outcomes, due to the various factors affecting the antioxidant capacity in a biological system such as interactions of antioxidants, genetic variance, and the origin of reactive oxygen species. Therefore, an important future direction of research would be to elucidate how best to improve our body defense systems against oxidative damage, which in turn might reduce the risk of chronic diseases, by means of dietary modification rather than by taking large amounts of antioxidant supplements [58].

REFERENCES

- [1] K.J. Davies, "Oxidative stress: the paradox of aerobic life," *Biochem. Soc. Symp.*, vol. 61, pp. 1-31, 1995.
- [2] A. Dasgupta, and K. Klein, "Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements," Elsevier Inc. 2014, pp. 1-18.
- [3] B. Halliwell, and J.M.C Gutteridge, "Free Radicals in Biology and Medicine," 3rd ed., Oxford University Press: New York, USA, 1999, pp. 10-121.
- [4] Y. Fang, S. Yang, and G. Wu, "Free radicals, antioxidants, and nutrition," *Nutrition*, vol. 18, pp. 872-879, 2002.
- [5] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, pp. 44-84, 2007.
- [6] L.A. Pham-Huy, H. He, and C. Pham-Huy, "Free radicals, antioxidants in disease and health," *Int. J. Biomed. Sci.*, vol. 4, pp. 89-96, 2008.
- [7] K. Bagchi, and S. Puri, "Free radicals and antioxidants in health and disease," *East. Mediterr. Health J.*, vol. 4, pp. 350-360, 1998.
- [8] A.D. Sarma, A.R. Mallick, and A.K. Ghosh, "Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview," *Int. J. Pharma Sci. Res.*, vol. 1, pp. 185-192, 2010.
- [9] S. Sen, R. Chakraborty, C. Sridhar, Y.S.R Reddy, and B. De, "Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: current status and future prospect," *Int. J. Pharma. Sci. Rev. Res.*, vol. 3, pp. 91-100, 2010.
- [10] S. Sen, and R. Chakraborty, "The Role of Antioxidants in Human Health," in *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, S. Andreescu, and M. Hepel, Eds. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2011, pp. 1-37.
- [11] G.L. Milne, H. Yin, K.F. Hardy, S.S. Davies SS, et al., "Isoprostane generation and function," *Chem. Rev.*, vol. 111, pp. 5973-5996, 2011.
- [12] B.S. Berlett, and E. Stadtman, "Protein oxidation and aging, disease and oxidative stress," *J. Biol. Chem.*, vol. 33, pp. 20313-20316, 1997.
- [13] M.A. Birch-Machin, E.V. Russell, and J.A. Latimer, "Mitochondrial DNA damage as a biomarker for ultraviolet radiation exposure and oxidative stress," *Br. J. Dermatol.*, vol. 169(Suppl. 2), pp. 9-14, 2013.
- [14] E. Niki, N. Noguchi, H. Tsuchihashi, and N. Gotoh, "Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 62, pp. 1322S-1326S, 1995.
- [15] E. Niki, "Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo," *Free. Radic. Biol. Med.*, vol. 49, pp. 503-515, 2010.
- [16] J.M. McCord, and I. Fridovich, "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, pp. 6049-6055, 1969.
- [17] B. Chance B, H. Sies, and A. Boveris, "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs," *Physiol. Rev.*, vol. 59, pp. 527-605, 1979.
- [18] R. Kohen, and I. Gati, "Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress," *Toxicology*, Vol. 148, pp. 149-157, 2000.
- [19] A.A. Boldyrev, "Does carnosine possess direct antioxidant activity?," *Int. J. Biochem.*, vol. 25, pp. 1101-1107, 1993.
- [20] B. Halliwell, and J.M. Gutteridge, "Free Radicals in Biology and Medicine," 3rd ed. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England. 1999.
- [21] B.N. Ames, K. Shigenaga, and T.M. Hagen, "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pp. 7915-7922, 1993.
- [22] L. Packer, K. Kraemer, and G. Rimbach, "Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications," *Nutrition*, vol. 17, pp. 888-895, 2001.
- [23] R. Stocker, Y. Yamamoto, A.F. McDonagh, A.N. Glaser, and B.N. Ames, "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance," *Science*, vol. 235, pp. 1043-1046, 1987.
- [24] R. Kohen, and A. Nyska, "Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification," *Toxicol. Pathol.*, vol. 30(n°6), pp. 620-650, 2002.
- [25] H. Atamna, I. Cheung, and B.N. Ames, "A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 97, pp. 686-691, 2000.
- [26] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, and H. Rodriguez, "Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement," *Free. Radic. Biol. Med.*, vol. 32, pp. 1102-1115, 2002.
- [27] Y. Li, "Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications," Nova Science Publishers, Inc. New York, pp. 3-19, 2011.
- [28] D.V. Parke, "Nutritional Antioxidants and Disease Prevention: Mechanisms of Action," In *Antioxidants in human health and disease*, T.K. Basu, N.J. Temple, and M.L. Garg, Eds. CABI Publishing, 1999, p.1.
- [29] B. Halliwell, "How to characterize a biological antioxidant," *Free. Radic. Res. Commun.*, vol. 9, pp. 1-32, 1990.
- [30] O.I. Aruoma, "Free radicals, antioxidants and international nutrition," *Asia. Pacific. J. Clin. Nutr.*, Vol. 8(1), pp. 53-63, 1999.
- [31] I.F.F. Benzie, "Evolution of dietary antioxidants," *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 136, pp. 113-126, 2003.
- [32] M. Serafini, "The role of antioxidants in disease prevention," *Medicine*, vol. 34, pp. 533-535, 2006.
- [33] B. Huang, B. Ou, and R.L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays," *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 53(6), pp. 1841-1856, 2005.
- [34] W.A. Pryor, "Bio-assay for oxidative stress status (BOSS)," Amsterdam: Elsevier Science, 2001.
- [35] S.W. Griffiths, and C.L. Cooney, "Development of a peptide mapping procedure to identify and quantify methionine oxidation in recombinant human α 1-antitrypsin," *J. Chromatogr. A*, vol. 942, pp. 133-143, 2002.
- [36] V. Roginsky, and E. Lissi, "Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food," *Food. Chem.*, vol. 92(2), pp. 235-254, 2005.
- [37] S.C. Litescu, S. Eremia, and G.L. Radu, "Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials," in *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, M.T. Giardi, G. Rea, and B. Berra, Eds. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 2010, pp. 241-249.
- [38] L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, and J.L.F. Lima, "Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties," *Anal. Chim. Acta*, vol. 613, pp. 1-19, 2008.

- [39] A.V. Badarinath, K. Mallikarjuna Rao, C. Madhu Sudhana Chetty, S. Ramkanth, T.V.S. Rajan, K. Gnanaprakash, "A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations," International Journal of PharmTech Research. Vol(n°2), pp. 1276-1285, 2010.
- [40] O.I. Aruoma, "Assessment of potential pro-oxidant and antioxidant actions," J. Am. Oil. Chem. Soc, Vol. 73, pp. 1617-1625, 1996.
- [41] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliger, and O.I. Aruoma, "The characterization of antioxidants," Fd. Chem. Toxicol, vol. 33, pp. 601-617, 1995.
- [42] H. Ohshima, B. Pignatelli, C.Q. Li, S. Baflast, I. Gilibert, and P. Boffetta, "Analysis of oxidized and nitrated proteins in plasma and tissues as biomarkers for exposure to reactive oxygen and nitrogen species," IARC. Sci. Publ, vol. 156, pp. 393-394, 2002.
- [43] I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, and A. Milzani, "Biomarkers of oxidative damage in human disease," Clin. Chem, vol. 52, pp. 601-623, 2006.
- [44] P. Voss, and W. Siems, "Clinical oxidation parameters of aging," Free Radic. Res, vol. 40, pp. 1339-1349, 2006.
- [45] B. Halliwell, "The wanderings of a free radical," Free Radic. Biol. Med, vol. 46, pp. 531-542, 2009.
- [46] H.A. Brown, "Lipidomics and bioactive lipids: Specialized analytical methods and lipids in disease," Methods in Enzymology, vol. 433; Academic Press; 1st ed, 2007. 296p.
- [47] M. Maoodi, A.A. Mir, N. A. Petasis, C. N. Serhan, and A. Nicolaou, "Simultaneous lipidomic analysis of three families of bioactive lipid mediators leukotrienes, resolvins, protectins and related hydroxyl-fatty acids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry," Rapid Commun. Mass Spectrom, vol. 22, pp. 75-83, 2008.
- [48] E. Niki, "Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects," Free Radic. Biol. Med, vol. 47, pp. 469-484, 2009.
- [49] E. Niki, "Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers," BioFactors, vol. 34, pp. 171-180, 2008.
- [50] H. Nakanishi, Y. Iida, T. Shimizu, and R. Taguchi, "Analysis of oxidized phosphatidylcholines as markers for oxidative stress, using multiple reaction monitoring with theoretically expanded data sets with reversed-phase liquid chromatography/ tandem mass spectrometry," J. Chromatogr. B, vol. 877, pp. 1366-1374, 2009.
- [51] H. Yin, B.E. Cox, W. Liu, N.A. Porter, J.D. Morrow, and G.L. Milne, "Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap mass spectrometry," J. Mass Spectrom, vol. 44, pp. 672-680, 2009.
- [52] C.L. Hawkins, P.E. Morgan, and M.J. Davies, "Quantification of protein modification by oxidants," Free Radic. Biol. Med, vol. 46, pp. 965-988, 2009.
- [53] N. Rabbani, and P.J. Thornalley, "Quantitation of markers of protein damage by glycation, oxidation, and nitration in peritoneal dialysis," Perit. Dial. Int, vol. 29 (Suppl 2), pp. S51-S56, 2009.
- [54] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, and H. Rodriguez, "Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement," Free Radic. Biol. Med, vol. 32, pp. 1102-1115, 2002.
- [55] L. Li, C.Y. Chen, G. Aldini, E.J. Johnson, H. Rasmussen, Y. Yoshida, E. Niki, J.B. Blumberg, R.M. Russell, and K-J. Yeum, "Supplementation with lutein or lutein plus green tea extracts does not change oxidative stress in adequately nourished older adults," J. Nutr. Biochem, vol. 21(6), pp. 544-549, 2010.
- [56] M.C. Polidori, J.C. Carrillo, P.E. Verde, H. Sies, J. Siegrist, and W. Stahl, "Plasma micronutrient status is improved after a 3-month dietary intervention with 5 daily portions of fruits and vegetables: implications for optimal antioxidant levels," Nutr. J, vol. 8, p.10, 2009.
- [57] B. Frei, "Efficacy of dietary antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit chronic disease," J. Nutr, vol. 134, pp. 3196S-3198S, 2004.
- [58] K-J. Yeum, R.M. Russell, and G. Aldini, "Antioxidant Activity and Oxidative Stress: An Overview," in Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications , G. Aldini, K-J. Yeum, E. Niki, and R.M. Russell, Eds. Blackwell Publishing, 2010, pp. 3-19.

RESUME

Les Polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) jouent un rôle clé dans la défense anti-infectieuse de l'hôte par l'intermédiaire de la production massive des formes réactives de l'oxygène (FRO) par la NADPH oxydase et la libération des protéines antibactériennes contenues dans les granules. Cependant, la libération inappropriée de ces molécules dans le milieu extracellulaire peut induire des dommages tissulaires sévères, contribuant ainsi à la physiopathologie de plusieurs maladies inflammatoires aiguës et chroniques.

Dans le présent travail, nous avons montré que la thymoquinone (TQ) inhibe fortement les fonctions du neutrophile humain induites par le fMLF, notamment la production des FRO ($IC_{50} = 0,08 \mu g/ml$) et la dégranulation. L'inhibition de la production des FRO n'est pas due à un effet scavenger, puisque la TQ n'inhibe pas la production d'anions superoxydes par le système xanthine/xanthine oxydase, ni à un effet cytotoxique sur les neutrophiles comme l'indique les tests de viabilité. De même, la TQ n'a montré aucun effet sur l'activité catalytique du complexe NADPH oxydase préassemblé, ni sur la translocation vers la membrane de ses composantes cytosoliques. De manière intéressante, la TQ inhibe la phosphorylation de la sous unité cytosolique $p47^{PHOX}$ de la NADPH oxydase sur les Sérines 304 et 328 induite par le fMLF. La TQ inhibe également la libération des granules spécifiques et azurophiles, comme en témoigne la diminution de l'expression à la surface cellulaire de la $gp91^{PHOX}$, et du CD11b ainsi que de la libération extracellulaire de la MPO. Parallèlement, les voies des PKC et des MAPKs, connues pour être impliquées dans la phosphorylation de la $p47^{PHOX}$ et la dégranulation respectivement, sont toutes deux affectées par la TQ. Enfin, dans un modèle de pleurésie induite par la λ -carraghénine chez le rat, la TQ réduit l'accumulation des PMN dans la cavité pleurale, montrant ainsi que non seulement elle inhibe les fonctions des neutrophiles, mais possède également des propriétés anti-inflammatoires *in vivo*. A cet égard, la TQ détiendrait un potentiel thérapeutique prometteur.

Mots clés : Thymoquinone ; neutrophiles ; NADPH Oxydase ; formes réactives de l'oxygène ; $p47^{PHOX}$; phosphorylation ; dégranulation.

SUMMARY

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are key players in host defense against pathogens through the robust production of reactive oxygen species (ROS) by NADPH oxidase, and the release of antibacterial proteins from granules. However, inappropriate generation and liberation of these molecules into the extracellular environment may induce severe tissue injuries, thereby contributing to the physiopathology of acute and chronic inflammatory disorders.

In the present study, we show that thymoquinone (TQ) inhibits fMLF-induced neutrophils functions, including ROS production ($IC_{50} = 0.08 \mu g/ml$) and granules exocytosis. The inhibition of ROS production was not due to a scavenger effect, as TQ did not inhibit superoxide anion produced by the xanthine/xanthine oxidase system, nor to a cytotoxic effect on neutrophils. In addition, TQ did not affect the catalytic activity of preassembled NADPH oxidase and also didn't affect the translocation of its cytosolic subunits towards the membrane. Interestingly, TQ impaired $p47^{PHOX}$ phosphorylation, a cytosolic subunit of NADPH oxidase, on Ser-304 and Ser-328 in response to fMLF. TQ also attenuated specific and azurophilic granules exocytosis in fMLF-stimulated neutrophils as shown by the decrease of cell surface expression of $gp91^{PHOX}$, CD11b and release of MPO. Concomitantly, both PKC and MAPK pathways, which have been involved in $p47^{PHOX}$ phosphorylation and granules exocytosis respectively, were inhibited by TQ in fMLF-stimulated neutrophils. Finally, in a model of λ -carrageenan-induced pleurisy in rats, TQ reduced neutrophil accumulation in pleural space, showing that not only it inhibits PMN functions but also holds anti-inflammatory properties *in vivo*. In this regard TQ exhibits promising therapeutic potential.

Keywords: Thymoquinone; neutrophils; NADPH Oxidase; reactive oxygen species; $p47^{PHOX}$; phosphorylation; degranulation.

الملخص

تلعب الخلايا المتعادلة متعددة النواة دوراً أساسياً في الإنتاج المكثف للأنواع الأكسجينية النشطة بواسطة إنزيم NADPH Oxydase، وكذا تحرير البروتينات المضادة للبكتيريا المحتواة في حبيباتها. غير أن الإنتاج والتحرير غير المناسبين لهذه الجزيئات في الوسط الخارجي للخلية يمكن أن يؤدي إلى تدمير حاد للأنسجة مما يساهم في الفيزيولوجيا المرضية لعدة أمراض التهابية حادة و مزمنة.

يبين هذا العمل أن الثيموكوينون (Thymoquinone ; TQ) يثبط بقوة وظائف الخلايا المتعادلة للإنسان المنشطة بـ fMLF، خاصة إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة وإفراز محتوى الحبيبات. تثبيط إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة بواسطة TQ لا يعزى إلى تأثير إزاحي لجذر ما فوق الأكسيد، بما أن TQ لم يثبط إنتاج هذا الجذر بواسطة الإنزيم المؤكسد المرجع للكراتينين، ولا إلى أي تأثير سمي تجاه الخلايا المتعادلة. بالإضافة إلى ذلك، لم يظهر TQ أي تأثير على نشاطية المعقد الإنزيمي NADPH Oxydase المجموع مسبقاً، ولا على انتقال مكوناته السيترولولية نحو الغشاء الخلوي. بل أن TQ تمكن من تثبيط فسفرة سيرين 304 و 328 في $p47^{PHOX}$ ، وهي واحدة من التحت وحدات السيترولولية للمعقد الإنزيمي NADPH Oxydase، في الخلايا المتعادلة للإنسان المنشطة بـ fMLF. تمكن TQ أيضاً من تثبيط إفراز محتوى الحبيبات النوعية (spécifiques) و اللازوردية (azurophiles)، كما بينه تناقص كميات كل من $gp91^{PHOX}$ و CD11b على الغشاء الخلوي و MPO المحررة خارج الخلية. موازاة مع هذا، تمكن TQ من التأثير على طرق التأثير الخلوية PKC و MAPK التي تتحكم على التوالي في فسفرة $p47^{PHOX}$ وإفراز محتوى الحبيبات. في الأخير، و في نموذج التهاب ذات الجنب (pleurésie) عند الجرذ المحفزة بالكاراتاجينان، تمكن TQ من الحد من تجمع الخلايا المتعادلة في التجويف الجنب للحرذان، مما يبين أن TQ ليس قادراً فقط على تثبيط وظائف الخلايا المتعادلة، و لكنه يملك أيضاً خصائص مضادة للالتهاب في الكائن الحي. و لذلك يمكن القول أن TQ تتمتع بإمكانات علاجية واعدة.

الكلمات المفتاحية: ثيموكوينون، الخلايا المتعادلة، NADPH Oxydase، الأنواع الأكسجينية النشطة، $p47^{PHOX}$ ، فسفرة، إفراز محتوى الحبيبات.