

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT Abbas –SETIF
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie

Mémoire
Présenté pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER
EN BIOCHIMIE
Option: Biochimie Appliquée

Par
KHITHER Hanane

THEME

**Etude des effets des huiles polaires et apolaires des graines
de *Nigella sativa* L. sur l'activité de l'élastase: Application
à la maladie pulmonaire obstructive chronique et à
l'emphysème pulmonaire**

Soutenu le :

Devant le jury d'examen

Président:	Pr. Nouredine BELATAR	FSNV, Université de Sétif
Rapporteur:	Pr. Mustapha BENBOUBETRA	FSNV, Université de Sétif
Examineurs:	Pr. Farida DJABI	CHU, Sétif
	MC. Rachid BELHATTAB	FSNV, Université de Sétif

2010-2011

Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Je voudrais remercier Monsieur M. BENBOUBETRA professeur à l'université Ferhat Abbas - Sétif, pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.

Ma vive reconnaissance va au monsieur N. BELATTAR d'avoir accepté de présider le jury de soutenance du mémoire, ainsi qu'aux madame F. DJABI et monsieur R. BELHATAB d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie monsieur A. BOUZIDI, docteur à l'université de Setif, pour l'aide précieuse, pour les conseils très importants qu'il m'a apporté au sein du son laboratoire.

Je remercie le Professeur S.CHEMAT Directeur de Recherche, Directeur de Division Santé au Centre de Recherches en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) pour l'aide précieuse.

Je présente ici le témoignage de ma sincère gratitude aux enseignants pour leurs aides, Dr. H. BOURICHE, Dr. A. SENATOR et M^{me} W. AMROUCHE.

DEDICACE

Je dédie ce travail à ma mère Qu'elle trouve ici ma plus

Profonde gratitude et tout mon

Amour pour leur patience et soutien tout au long de mes études.

A la pensée de mon père qu'il restera à jamais gravé dans mon

Cœur et mon esprit. Paix à son âme.

A mon oncle Hocine de m'avoir soutenu

Durant tous mes études.

A mes sœurs et mon frère, et à mes nièces et à toute la famille.

Spécialement à mes fidèles amies Mosbah Asma et

Nessekh Salima.

A tous mes amies et collègues.

A tous ceux que j'aime.

Hanane

Résumé

La physiopathologie de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), également connue sous le nom de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) se caractérise principalement par une inflammation des voies aériennes centrales et périphériques et du parenchyme pulmonaire, et par un déséquilibre de la balance protéase-antiprotéase, qui est la clé de voute de la physiopathologie de cette maladie. La recherche à partir des graines de *Nigella sativa* L. d'inhibiteurs de l'élastase produite lors de l'activation des polynucléaires neutrophiles et des macrophages ou sous l'effet d'un taux réduit en $\alpha 1$ antitrypsine est d'un grand intérêt thérapeutique. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer les effets des huiles polaires et apolaires des graines de NS sur l'activité de l'élastase *in vitro*. L'huile totale des graines de NS a été extraite avec un rendement de $29,21 \pm 2,012$ %, le fractionnement de cet huile par chromatographie sur colonne (CC) a été permet de séparer cinq fractions apolaires (92,12 %) et trois fractions polaires (7,83 %). L'analyse de ces huiles par GC/MS a révélé leurs richesses en acides gras insaturés. L'inhibition de l'activité de l'élastase pure (activité spécifique de $3,96 \mu\text{môle}/\text{min}/\text{mg}$ d'enzyme) par l'huile totale et les différentes fractions a révélé que l'huile totale possède l'effet inhibiteur le plus puissant avec un IC_{50} de $129,29 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{ml}$, alors que les différentes fractions exercent un effet synergique. La moyenne des concentrations de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints du MPOC est de $39,19 \pm 19,54 \text{ nM}$ et l'activité enzymatique détectée a une moyenne de $0,0149 \pm 0,0037 \text{ UI}/\text{ml}$. L'inhibition de cette activité par l'huile totale de NS est puissante avec un IC_{50} de $104,69 \pm 3,58 \mu\text{g}/\text{ml}$. De ce fait, l'activité inhibitrice de l'élastase des lavages broncho-alvéolaires (élastase leucocytaire) par l'huile totale manifeste un effet inhibiteur relativement supérieur à celui exercé sur l'élastase pure (élastase pancréatique porcine). D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que les huiles polaires et apolaires des graines de *Nigella sativa* possèdent une activité inhibitrice considérable de l'élastase et est localisée principalement dans les acides gras insaturés de ces huiles.

Mots-clés: Elastase, Emphysème, Inflammation, Lavages bronchiques, *Nigella sativa*, MPOC.

Summary

The physiopathology of the chronic obstructive pulmonary disease (COPD), also known as chronic obstructive lung disease (COLD), chronic obstructive airway disease (COAD), chronic airflow limitation (CAL) and chronic obstructive respiratory disease (CORD), is the co-occurrence of chronic bronchitis and emphysema. It is characterized mainly by an inflammation of the central and peripheral lung airways and pulmonary parenchyma, and by an imbalance of the balance protease-antiprotéase, which is the master key of the physiopathology of this disease. Research from *Nigella sativa* L seeds (NS) of inhibitors, to the highly raised elastase activity by activated polynuclear neutrophils and macrophages or to the reduction of $\alpha 1$ antitrypsin is of great medical and therapeutical use in COPD. In this context, we have attempted to assess and evaluate, *in vitro*, the effects of polar and non-polar lipids extracted from the seeds of the plant *Nigella sativa* (NS) on the protease activity of the enzyme elastase in the context of COPD and emphysema. The total oil of seeds of NS was extracted with a yield of $29,21 \pm 2,012$ %, the separation of this oil by column chromatography (CC) was used to separate five non-polar fractions (92,12 %) and three polar fractions (7,83 %). Analysis by GC/MS of this oil extracted from NS seeds showed revealed a high amount of non-saturated fatty acids. Inhibition of elastase activity pure (specific activity $3.96 \mu\text{mole} / \text{min} / \text{mg enzyme}$) by the total oil and different fractions revealed that the total oil fraction showed the highest inhibitory effect with IC_{50} of $129.29 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$, while the different fractions exert a synergistic effect. The mean of protein content in the bronchoalveolar washes (BAW) from patients with COPD is 39.19 ± 19.54 nM and elastase activity was detected with the mean of 0.0149 ± 0.0037 UI/ml. The inhibition of this activity by the total oil of NS is strong with a IC_{50} of $104,69 \pm 3,58 \mu\text{g/ml}$. So the inhibitory effect on the elastase activity in bronchoalveolar washings (leucocyte elastase) by total oil was relatively higher than that observed on the pure elastase (porcine pancreatic elastase). From these results, one could say that polar and non-polar lipids extracted from NS seeds possess an important inhibitory effect on the enzyme elastase which is heavily implicated in lung disease. This effect is likely to be due to the fatty acids presents on these lipid fractions.

Keywords: Elastase, Emphysema, Inflammation, Bronchoalveolar washes (BAW), *Nigella sativa*, COPD.

ملخص

يتميز مرض الانسداد الرئوي المزمن أساسا بوجود التهاب في الشعب الهوائية المركزية والمحيطية والبرنشيم الرئوي، وباختلال في التوازن بروتياز- مضاد البروتياز الذي يعد المفتاح في الفيزيولوجيا المرضية لهذا المرض. يعتبر البحث انطلاقا من بذور الحبة السوداء (*Nigella sativa*) عن مثبطات للإيلاستاز المنتج أثناء تنشيط عديدات النوى المتعادلة و البالعات الكبيرة أو تحت تأثير النسبة المنخفضة ل : α -1 antitrypsine في هذا المرض ذي الأهمية العلاجية الكبرى.

في هذا السياق حاولنا تقدير تأثير الزيوت القطبية وغير القطبية المستخلصة من بذور الحبة السوداء (*Nigella sativa*) على نشاطية الإيلاستاز وفقا لمرض الانسداد الرئوي المزمن والانفزيما (emphysème). حيث تم استخلاص الزيت الكلي من بذور الحبة السوداء بمردود يقدر ب : $29,21 \pm 2,012\%$ ، كما تم فصل خمسة أجزاء كزيوت غير قطبية (92,12%) وثلاثة أجزاء كزيوت قطبية (7,83%) بطريقة كروماتوغرافيا العمود. ان تحليل هذه الزيوت بطريقة كروماتوغرافيا الفصل الغازية الى جانب قياس الطيف الكتلي كشف عن غناها بالأحماض الدهنية غير المشبعة.

بين تثبيط الإيلاستاز النقي بواسطة الزيت الكلي أنه يمتلك التأثير الأكثر فعالية ($IC_{50} = 129,29 \pm 1,4$ ميكروغرام/مل). في حين أن الزيوت القطبية وغير القطبية تمارس تأثير تعاوني. ان تركيز الإيلاستاز في سائل غسل القصبات الرئوية لمرضى الانسداد الرئوي المزمن يقدر ب : $39,19 \pm 19,54$ نانومول /مل والنشاطية الإنزيمية $0,0149 \pm 0,0037$ وحدة / مل. يعتبر تثبيط هذه النشاطية بواسطة الزيت الكلي فعال كون $IC_{50} = 104,69 \pm 3,58$ ميكروغرام / مل. وعلى هذا الاساس فإن النشاطية المثبطة للإيلاستاز في سائل غسل القصبات الرئوية (إيلاستاز الكريات البيضاء) بواسطة الزيت الكلي ذي الفاعلية الأكبر نسبيا من تلك التي يمارسها على الإيلاستاز النقي (إيلاستاز بنكرياس الخنازير).

حسب النتائج المتحصل عليها في هذا العمل، يمكن القول أن الزيوت القطبية و غير القطبية المستخلصة من بذور الحبة السوداء تمتلك نشاط تثبيطي كبير للإيلاستاز والذي يتمركز أساسا في الأحماض الدهنية غير المشبعة الموجودة في زيوت الحبة السوداء.

الكلمات المفتاح: مرض الانسداد الرئوي المزمن، الالتهاب، البروتياز، α -1 antitrypsine، الإيلاستاز، الحبة السوداء (*Nigella sativa*)، الزيوت القطبية وغير القطبية .

Sommaire

Résumé

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale	1
I. Revue bibliographique	
I.1 La maladie pulmonaire obstructive chronique	3
I.1 .1 Description générale des poumons	3
I.1.2 Définition de la MPOC	5
I.1.3 Classification des MPOC	5
I.1.4 Facteurs de risque	7
I.1.5 Physiopathologie des MPOC	8
I.1.6 Epidémiologie des MPOC	13
I.1.7 Les Tests de diagnostic	13
I.1.8 Traitement des MPOC	14
I.2 Élastase du neutrophile (NE)	15
I.2.1 Synthèses et stockage du NE	16
I.2.2 Caractéristiques biochimique	17
I.2.3 Inhibiteurs physiologiques endogènes de la NE	19
I.2.4 Mécanismes d'échappement de la NE aux inhibiteurs de protéases endogènes	19
I.3 La plante <i>Nigellasativa</i> L.	20
I.3.1 Généralités	20
I.3.2 Description botanique de la plante	21
I.3.3 Composition biochimique	23
I.3.4 Activités biologiques et propriétés pharmacologiques	30
II. Matériels et Méthodes	
II.1 Matériels	35
II.1.1 Les graines de <i>Nigellasativa</i>	35
II.1.2 Les lavages broncho-alvéolaires	35

II.1.3. Produits chimiques	35
II.2 Méthodes	36
II.2.1 Extraction de l'huile totale de <i>Nigellasativa</i>	36
II.2.2 Composition en acides gras des huiles de <i>Nigellasativa</i>	38
II.2.3 Etude cinétique de l'activité enzymatique de l'élastase	39
II.2.4 Inhibition de l'activité élastase par les huiles de <i>Nigella sativa</i>	39
II.2.5 Test d'activité de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaire	40
II.2.6 Inhibition de l'activité élastase dans les LBA par l'huile totale de <i>Nigellasativa</i>	41
II.3 Analyse statistique	42
III. Résultats et Discussion	
III.1 Extraction de l'huile totale de <i>Nigellasativa</i>	43
III.2 Composition en acides gras des huiles de <i>Nigellasativa</i> par GC/MS	45
III.3 Etude cinétique de l'activité enzymatique de l'élastase	47
III.4 Inhibition de l'activité élastase par les huiles de <i>Nigellasativa</i>	48
III.5 Test d'activité de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaire	54
III.5.1 Détermination de l'activité élastase dans les LBA	54
III.5.2 Détermination de la concentration d'enzyme dans les LBA	55
III.6 Inhibition de l'activité élastase dans les LBA par l'huile totale de <i>Nigellasativa</i>	57
Conclusion générale et perspectives	62
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

AAT:	α 1-antitrypsine
BPCO:	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
CC:	Chromatographie sur Colonne
COPD:	Chronic obstructive pulmonary disease
CVF:	Capacité Vitale Forcée
GC-MS:	Gas Chromatography – Mass-Spectroscopy
HPLC:	High performance liquid chromatography
HT:	Huile totale
IC ₅₀ :	Concentration inhibitrice de 50 %
INF:	Interféron
IL:	Interleukine
KDa:	Kilodalton
K _M :	Constante de Michaelis et Menten
LBA:	Lavage Broncho-alvéolaires
LPS:	Lipopolysaccharide
LT:	Lymphocyte T
MMP:	Métallo-protéases
MPOC:	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
NO:	Nitrite Oxyde
NOS:	Nitrique oxyde synthase
NS:	Nigella sativa
PR3:	Protéinase 3
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl sulphate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis
TNF:	Tumor necrosis factor
UI :	Unité internationale
VEMS:	Volume Expiré Maximal par Second
Vmax:	Vitesse maximale

Liste des figures

Figure 1:	Vue de face des poumons (a), Télé thorax au rayon X montrant la sévérité de la maladie MPOC (voir la dimension réduite du cœur par rapport aux poumons) (b) Vue élargie du tissu pulmonaire montrant la différence entre un poumon sain et un poumon MPOC.	4
Figure 2:	Schéma général des mécanismes engendrés par l'action du tabagisme sur les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages au cours des MPOC.	10
Figure 3:	Aspect inflammatoire de la MPOC.	10
Figure 4:	Implication du stress oxydatif dans la physiopathologie de la MPOC.	12
Figure 5:	Processus de maturation de la NE humaine.	17
Figure 6:	Biologie des sérine-protéases du neutrophile.	17
Figure 7:	L'élastase est constitué de 218 acides aminés avec deux pontes S-S.	18
Figure 8:	Structure tridimensionnelle de l'élastase humaine du Neutrophile.	19
Figure 9:	Aspect morphologique et classification botanique de la plante <i>Nigella sativa</i> .	22
Figure 10:	Structure des alcaloïdes de NS (nigellicine et nigellimine).	28
Figure 11:	Structure des polyphénols de <i>Nigella sativa</i> .	28
Figure 12:	Etapes de l'extraction de l'huile totale des graines de <i>Nigella sativa</i> .	37
Figure 13:	Chromatogramme des composés et des acides gras de l'huile de <i>Nigella sativa</i> déterminé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.	45
Figure 14:	La représentation de la cinétique enzymatique de l'élastase.	47
Figure 15:	Effet inhibiteur des huiles totales, polaires, apolaires de NS et α 1-antitrypsine (AAT) sur l'activité de l'élastase.	50
Figure 16:	Les IC ₅₀ des fractions apolaires de l'huile de NS sur l'activité de l'élastase.	52
Figure 17:	Les IC ₅₀ des fractions polaires de l'huile de NS sur l'activité de l'élastase.	53
Figure 18:	Répartition des lavages broncho-alvéolaires des sujets atteints du MPOC selon l'activité élastasique.	55
Figure 19:	Courbe d'étalonnage de l'activité de d'élastase porcine.	56
Figure 20:	Répartition des lavages broncho-alvéolaires des sujets atteints du MPOC selon la concentration en élastase.	56

- Figure 21:** Effet inhibiteur de l'huile totale de NS sur l'activité de l'élastase des 58
Lavages broncho-alvéolaires de cinq sujets atteints de MPOC.
- Figure 22 :** Effet inhibiteur de l' $\alpha 1$ antitrypsine sur l'activité de l'élastase dans les 59
Lavages broncho-alvéolaires de cinq sujets atteints de MPOC.
- Figure 23 :** IC50 de l'huile totale de NS sur l'activité de l'élastase dans les LBA. 60

Liste des tableaux

Tableau I:	Classification des MPOC selon le stade de sévérité.	5
Tableau II:	Composition des graines de <i>Nigella sativa</i> de différentes régions.	23
Tableau III:	Les acides aminés des protéines de <i>Nigella sativa</i> .	24
Tableau IV:	Taux des lipides de l'huile fixe de <i>Nigella sativa</i> extraite par différentes méthodes.	25
Tableau V:	Composition des huiles fixes de <i>Nigella sativa</i> .	26
Tableau VI:	Composition chimique des huiles essentielles de NS cultivée en Iran	27
Tableau VII:	Aspect, couleur et rendement des diverses fractions polaires et apolaires extraites à partir des graines de NS en pourcentage par rapport au poids total de huile totale.	44
Tableau VIII:	Composés identifiés dans l'huile totale des graines de NS par GC/MS.	46
Tableau IX:	Les IC ₅₀ des huiles polaires et apolaires des graines de NS sur l'activité de l'élastase.	51
Tableau X:	Les IC ₅₀ de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i> sur l'activité de l'élastase dans les LBA de cinq sujets atteints de MPOC.	58
Tableau XI:	Les IC ₅₀ de l'AAT sur l'activité de l'élastase dans les LBA de cinq sujets atteints de MPOC.	59

Introduction

Introduction

La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) est la cause principale de la morbidité et de la mortalité et c'est prévu qu'elle représentera dans un avenir proche la troisième cause de la mortalité dans le monde. C'est la quatrième principale cause de la mort aux Etats-Unis et en Europe (Barnes *et al.*, 2003). Le tabagisme est la cause principale de cette maladie. Les études ont prouvé que le taux des neutrophiles des voies aériennes augmenté chez les patients présentant une bronchite chronique (Riise *et al.*, 1997) et une corrélation forte entre le recrutement des neutrophiles et la sévérité de l'obstruction des voies respiratoires a été rapportée (Di Stefano *et al.*, 1998). Ces neutrophiles produisent des sérines protéases tel que l'élastase, impliquée dans la production de plusieurs dispositifs de MPOC y compris l'emphysème pulmonaire (Surkova *et al.*, 2005), des processus destructifs intensifs dans le parenchyme de poumon (Komlev *et al.*, 2005), les dommages de ré-perfusion (Mori *et al.*, 2005), la fonction de provoquer l'hypersécrétion de mucus et l'inactivation et l'altération des systèmes de défenses pulmonaires (Stockley., 1999). L'emphysème est une maladie lentement progressive caractérisée par la distension permanente des espaces aériens distaux situés en aval des bronchioles terminales et par une destruction des parois alvéolaires sans fibrose (Komlev *et al.*, 2005). La MPOC a été relativement négligée et il n'existe aucune thérapie courante qui empêchant la progression inévitable de la maladie. Il y a maintenant un intérêt croissant de la recherche au niveau cellulaire et moléculaire visant de nouvelles thérapies (Barnes., 2000; Barnes., 2001).

Pendant plusieurs années les chercheurs dans l'industrie pharmaceutique se sont intéressés au développement des antiprotéases comme traitement pour empêcher la survenue ou ralentir MPOC et l'emphysème. L'avantage de la thérapie à l'antiprotéase est de ralentir le taux du déclin de fonction de poumon en arrêtant les dommages apparents. Les rapports de l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que plus de 80 % de la population mondiale utilisent les extraits traditionnels de plantes médicinales comme substances thérapeutiques contre beaucoup de maladies. Alors il est nécessaire de développer les ressources naturelles des plantes médicinales. L'avantage de ces produits est l'absence des substances chimiques à l'origine des effets secondaires. La plante *Nigella sativa* est parmi les plantes médicinales les plus utilisées.

Des extraits de cette plante ont été employés dans la médecine traditionnelle contre certains symptômes et maladies respiratoires telles que la toux, l'asthme et les inflammations pulmonaires. Etant donné le peu de dans l'ethnopharmacologie des produits naturels contre les MPOC, nous avons tenté d'évaluer les effets des huiles polaires et apolaires des graines de *Nigella sativa* L sur l'activité de l'élastase: en application à la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et à l'emphysème pulmonaire.

Dans ce présent travail, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Préparation de l'huile totale des graines de *Nigella sativa*,
- Préparation et caractérisation des huiles polaires et apolaires à partir de l'huile totale des graines de *Nigella sativa*,
- Détermination de la composition en acides gras des huiles de *Nigella sativa*,
- Etude, *in vitro*, des effets des huiles polaires et apolaires à partir de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* sur l'activité de l'élastase,
- Détermination de l'activité élastasique dans les sécrétions et les lavages bronchiques alvéolaires de patients,
- Etude des effets de l'huile totale de *Nigella sativa* sur l'activité de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaires.

Chapitre I

Revue bibliographique

I. Revue bibliographique

I.1 La maladie pulmonaire obstructive chronique

I.1.1 Description générale des poumons

L'homme possède deux poumons, organes spongieux. Chacun a une face externe convexe située contre la paroi thoracique, et une face interne concave. L'ensemble est couvert d'une fine membrane à double feuillet appelée la plèvre. Leur base concave repose sur le diaphragme, et leur sommet (apex) remonte jusqu'à la base du cou. Les poumons sont séparés par une structure appelée médiastin ainsi que par le cœur, et ils sont limités par la cage thoracique qui les entoure.

Le poumon droit est sensiblement plus lourd (650 à 700 grammes) que le gauche (550 à 600 grammes) mais leur taille, et leur poids varient d'un individu à l'autre.

Le poumon droit est subdivisé en trois lobes (supérieur, moyen et inférieur) que l'on distingue grâce à la présence d'entailles profondes où pénètre le feuillet le plus intérieur de la plèvre. Ces entailles sont appelées scissures. Par contre le poumon gauche, possède 2 lobes (supérieur, et inférieur) avec une seule scissure (figure 1).

L'appareil respiratoire représente une vaste surface d'échange avec l'environnement extérieur. Sa fonction essentielle est d'assurer un échange gazeux entre le sang des veines et l'air atmosphérique. Cette fonction prend place au niveau des alvéoles pulmonaires.

Parmi les maladies de l'appareil respiratoire, on note la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) ou la Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO).

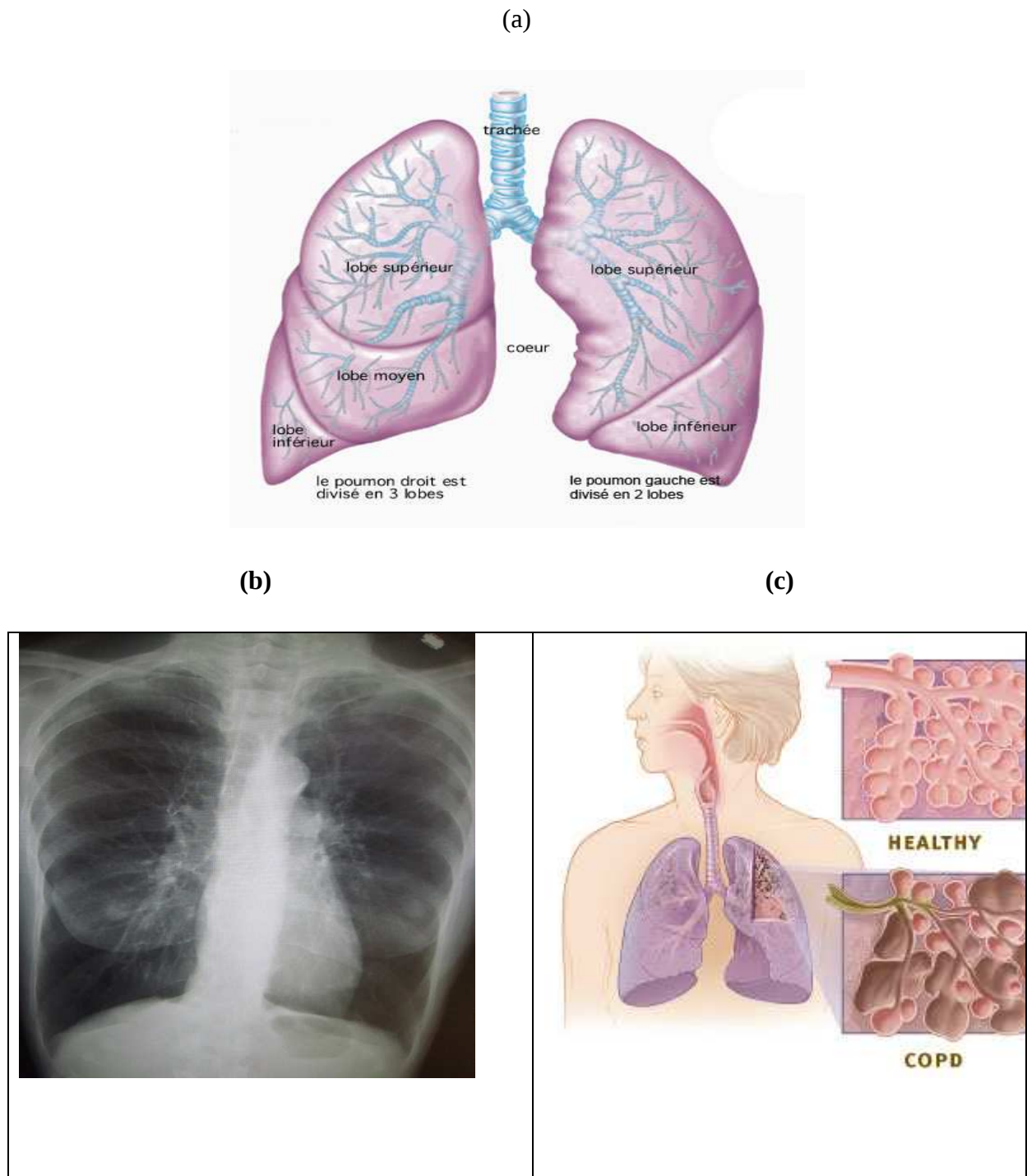


Figure 1 : Vue de face des poumons (a), Télé thorax au rayon X montrant la sévérité de la maladie MPOC (voir la dimension réduite du cœur par rapport aux poumons) (b), Vue élargie du tissu pulmonaire montrant la différence entre un poumon sain et un poumon MPOC (c).

I.1.2 Définition de la MPOC

La MPOC est caractérisée par une obstruction progressive et partiellement réversible, associée à une réponse inflammatoire anormale pulmonaire à des particules ou gaz nocif (CDC, 2002 ; ASPC, 2007 ; GOLD, 2009). Le tabagisme est impliqué dans plus de 80% des MPOC et constitue le facteur de risque majeur (Allain *et al.*, 2011).

La limitation des débits aériens est caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif défini par un rapport volume expiré maximal par seconde (VEMS) sur capacité vitale forcée (CVF) inférieur à 70% et sans réversibilité significative, après test de bronchodilatation et /ou test aux corticostéroïdes.

I.1.3 Classification des MPOC

Les MPOC sont classées selon leur degré de sévérité, en prenant comme élément d'appréciation principal la valeur de VEMS (Tableau I).

Tableau I : Classification des MPOC selon le stade de sévérité (Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease, GOLD, 2006).

Stade	Caractéristiques fonctionnelles
I. Léger	VEMS /CVF < 70% VEMS ≥ 80% de la valeur prédite
II. Modéré	VEMS /CVF < 70% 50% ≤ VEMS < 80% de la valeur prédite
III. Sévère	VEMS /CVF < 70% 30% ≤ VEMS < 50% de la valeur prédite
IV. Très sévère	VEMS /CVF < 70% VEMS < 30% de la valeur prédite Ou VEMS < 50% de la valeur prédite associée à une insuffisance respiratoire chronique

La limitation des débits ventilatoire résulte de deux mécanismes distincts, mais souvent associés ; (i) l'obstruction des petites voies aériennes (bronchite chronique obstructive) ; (ii) la destruction du parenchyme pulmonaire (emphysème).

I.1.3.1 La bronchite chronique

La bronchite chronique est caractérisée par une toux et une expectoration chronique pendant au moins trois mois par an et depuis au moins deux années consécutives. Elle est caractérisée par une inflammation de la muqueuse bronchique, une hyperplasie des glandes muqueuses, une hypersécrétion bronchique et une augmentation de la perméabilité épithéliale. La bronchite chronique n'est pas obligatoirement associée à un trouble ventilatoire obstructif, mais en constitue un facteur de risque. 30% des patients atteints de bronchite chronique développent ultérieurement un trouble ventilatoire obstructif (Pauwels *et al.*, 2001).

La bronchite chronique ou la maladie des petites voies aériennes est caractérisée par une réduction du calibre des bronchioles (bronche < 2 mm de diamètre) en rapport avec des lésions inflammatoires impliquant essentiellement l'infiltration cellulaire inflammatoire (lymphocytes T CD8⁺, macrophages) associée à un remodelage bronchique notamment une fibrose péribronchique.

I.1.3.2 L'emphysème

C'est la distension permanente des espaces aériens distaux situés en aval des bronchioles terminales et par la destruction des parois alvéolaires sans fibrose (Snider *et al.*, 1985 ; Komlev *et al.*, 2005). L'intoxication tabagique est la première cause d'emphysème chez l'homme (Hervé Mal *et al.*, 1999). Deux formes principales d'emphysème ont été décrites:

- 1) L'emphysème centrolobulaire est caractérisé par une destruction focale centrée sur les bronchioles respiratoires et la portion centrale du lobule pulmonaire.
- 2) L'emphysème panlobulaire détruit les parois alvéolaires de façon diffuse au-delà des bronchioles respiratoires.

Il est probable que la physiopathologie de ces deux entités morphologiquement distinctes soit différente. Malheureusement, la plupart des travaux de la littérature ne différencient pas ces deux formes, ce qui explique probablement certaines incohérences (Hervé Mal *et al.*, 1999). Le développement de l'emphysème doit être conçu comme un phénomène dynamique dans le temps et dans l'espace. A sa phase initiale il consiste en des pertes de substance des parois alvéolaires, invisibles à l'œil nu, qui augmentent progressivement en taille et en nombre. On parle ainsi d'emphysème microscopique. Ces lésions entraînent une diminution de la force de rétraction élastique du poumon qui, alliée à la destruction précoce des zones d'attachement

des septums inter alvéolaires sur les bronchioles, explique le développement du trouble ventilatoire obstructif caractéristique de cette maladie (Hervé Mal *et al.*, 1999). Ces lésions destructrices s'associent à un remodelage de la matrice extracellulaire, caractérisé par une augmentation du contenu en collagène du poumon emphysémateux (Finlay *et al.*, 1996).

I.1.4 Facteurs de risque

Plusieurs facteurs concourent à la survenue de la MPOC. Les nombreuses études épidémiologiques menées sur ce sujet ont surtout permis de découvrir de puissants liens d'association plutôt que des relations de causalité directe entre ces facteurs (exogènes et endogènes) et la maladie (GOLD, 2009). Parmi ces facteurs on note :

I.1.4.1 Facteurs exogènes

- ***Le tabagisme***

Le principal facteur exogène est le tabagisme qui joue un rôle primordial dans le développement de l'emphysème et de la bronchite chronique (Mizutani *et al.*, 2009). Le tabac est schématiquement un facteur de MPOC pour les raisons suivantes :

- la fumée de cigarettes a une action broncho-constrictrice aiguë ;
- le tabagisme perturbe la fonction d'épuration muco-ciliaire ;
- il entraîne un affaiblissement des défenses immuno-cellulaires du poumon profond, assurées par les macrophages alvéolaires ;

Enfin et surtout l'inhalation chronique de fumée de cigarettes favorise l'hyperproduction de mucus par le biais notamment d'une hyperplasie des glandes de la muqueuse bronchique. Cette hyperplasie représente le substratum anatomique de la bronchite chronique. Le tabagisme peut par ailleurs perturber l'équilibre protéase-anti-protéase, ce qui pourra favoriser le développement d'un emphysème (Hervé Mal *et al.*, 1999 ; Barnes, 2000). La fumée de cigarette stimule les macrophages alvéolaires, lesquels produisent un facteur chimiotactique qui attire les neutrophiles dans le poumon (Fournier *et al.*, 1989 ; Barnes, 2000). Les neutrophiles sécrètent une puissante élastase capable de détruire les structures élastiques du poumon. La fumée de cigarette a également un effet direct où les agents oxydants qu'elle contient peuvent inactiver l'alpha-1-antitrypsine, qui est l'anti-protéase majeure (Nowak et Ruta., 1990 ; Barnes, 2000). Ceci explique que le tabagisme peut

perturber profondément l'équilibre protéase-anti-protéase et favoriser ainsi la destruction des structures élastiques qui est le substratum morphologique de l'emphysème (Barnes, 2000).

La pollution participe dans le développement des MPOC mais avec un rôle minime. Il a été démontré que certains gaz inhalés tels que l'ozone, le SO₂, le NO₂ sont à l'origine des réactions inflammatoires bronchiques. Dans ce cadre, certaines expositions professionnelles, souvent intriquées au tabagisme favorisent la survenue de MPOC (Christos, 1995).

Les infections respiratoires à l'origine de lésions inflammatoires de l'épithélium bronchique, contribuent également à la constitution d'une hypersécrétion muqueuse bronchique. (Morris *et al.*, 2008).

I.1.4.2 Facteurs endogènes

a) Déficits génétiques

Déficit en α -1 antitrypsine (AAT) contribue à la genèse de l'emphysème, Il intervient dans environ 1% des cas. L'AAT est une glycoprotéine sérique d'origine hépatique, présente dans le poumon. Elle inhibe l'élastase neutrophile. Elle est codée par un seul gène situé sur le chromosome 14. Le phénotype homozygote normal PiMM s'accompagne, en règle, d'un taux sérique normal d'AAT. Les mutations constitutionnelles les plus fréquentes du gène de cette protéine provoquant une déficience de la protéine, sont les mutations de type S (remplacement d'un acide glutamique par une valine) et Z (remplacement d'un acide glutamique par une lysine) ; Plus de 95% des personnes présentant un déficit sévère en AAT ont un phénotype homozygote anormal PiZZ où la concentration en AAT chute à environ 13% du taux plasmatique mesuré chez les sujets présentant le génotype normal (M/M) (Hutter et Consilia., 2004).

b) Déficit en Ig favorise les infections respiratoires.

c) Les maladies des cils sont responsables d'une baisse de la clairance muco-ciliaire.

d) La mucoviscidose.

I.1.5 Physiopathologie des MPOC

La fumée de tabac comporte de multiples composés chimiques incluant des radicaux libres et oxydants, ayant une activité pro-inflammatoire et lésionnelle au niveau broncho-pulmonaire. Dans les MPOC il existe une réponse anormale à la fumée du tabac et

éventuellement à d'autres facteurs, induisant ainsi le développement d'une inflammation broncho-pulmonaire chronique et la destruction du parenchyme pulmonaire.

L'inflammation broncho-pulmonaire est caractérisée dans les MPOC par une infiltration cellulaire associant les neutrophiles, macrophages et les lymphocytes T CD8⁺. Par comparaison avec des sujets fumeurs non MPOC, on note dans les MPOC une augmentation de lymphocytes T CD8⁺ et macrophages au niveau de l'épithélium bronchique (Fournier *et al.*, 1989), une augmentation en volume des glandes sous muqueuses et une augmentation en nombre des neutrophiles, macrophages, lymphocytes T CD8⁺ dans les lavages broncho-alvéolaires. Le site principal de l'infiltration inflammatoire est localisé au niveau des petites voies aériennes (Hogg, 2004). L'activation des lymphocytes T CD8⁺ à activité cytotoxique favorise la sécrétion de TNF- α impliqué dans la destruction du parenchyme pulmonaire. Il s'associe à cette infiltration inflammatoire, une fibrose péri-bronchiolaire et une hypertrophie des muscles lisses (Maestrelli *et al.*, 2001 ; Saetta *et al.*, 2001). L'hyperplasie des glandes muqueuses est présente aussi bien chez les fumeurs MPOC et non MPOC.

Les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires sont en contact direct avec les constituants de la fumée de tabac et leur activation peut entraîner la production de médiateurs inflammatoires, tels que l'IL8 et LTB4 impliqués dans le chimiotactisme des neutrophiles. Le recrutement et l'activation des neutrophiles induit la production de protéases (élastase neutrophile, protéinase-3 et cathepsine G) impliquées dans la destruction du parenchyme pulmonaire en induisant un déséquilibre de la balance protéase-antiprotéase (Barnes, 2000) (Figure 2 et 3).

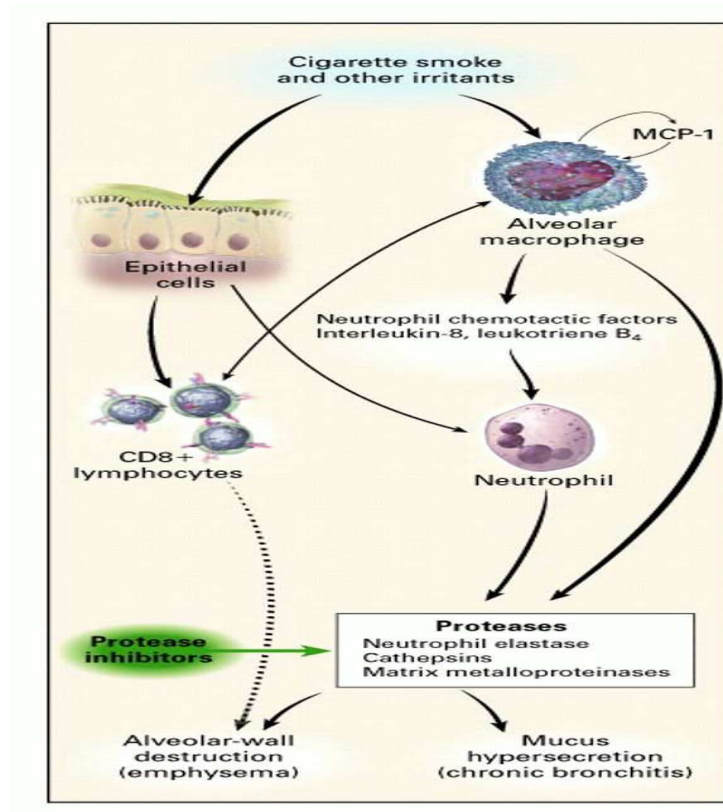


Figure 2 : Schéma général des mécanismes engendrés par l'action du tabagisme sur les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages au cours des MPOC (D'après Barnes, 2000).

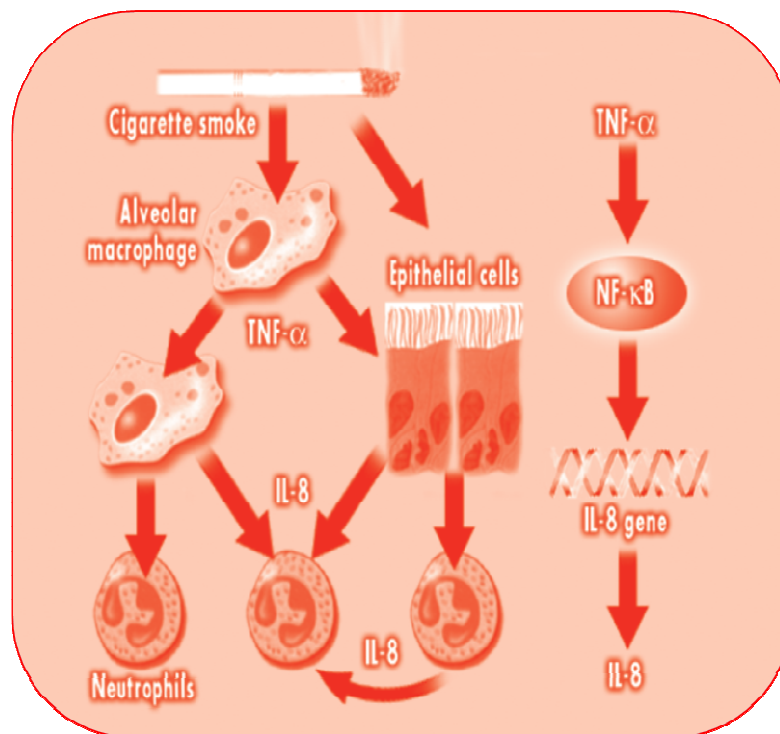


Figure 3 : L'aspect inflammatoire de la MPOC (D'après Barnes et Hansel., 2004).

Parmi les arguments incriminant l'implication de la balance protéase-antiprotéase dans la physiopathologie de l'emphysème pulmonaire on note :

- 1) le risque d'emphysème est augmenté chez les individus ayant un déficit en α -1 antitrypsine qui est le principal inhibiteur de l'élastase neutrophile (Stoller *et al.*, 2003) ;
- 2) Des facteurs protéasiques tel que l'élastase neutrophile (Lucey *et al.*, 1985) et protéinase-3 (Kao, 1988) deux sérines protéases produites par les neutrophiles, et les cathepsines B et G (Lesser *et al.*, 1992) peuvent induire un emphysème dans les modèles animaux;
- 3) Les métalloprotéases (MMP) produites par les neutrophiles et les macrophages telles que MMP-1 (Imai *et al.*, 2001) , MMP-2 (Segura-Valdez *et al.*, 2000) et MMP-14 (Ohnishi *et al.*, 1998) sont surexprimées dans les tissus pulmonaires emphysémateux;
- 4) des inhibiteurs spécifiques de ces protéases permettent de protéger d'un emphysème des souris soumises à un tabagisme expérimental (Wright *et al.*, 2002 ; Selman *et al.*, 2003);
- 5) des manipulations génétiques de certains facteurs protéasiques, tels que la délétion du gène MMP-12 (Souris MMP-12 KO) permettent de protéger les souris exposées à un tabagisme expérimental de l'emphysème (Hautamaki *et al.*, 1997).

Au niveau pulmonaire un déséquilibre de la balance entre les facteurs protéasiques tels que la neutrophile élastase, la protéinase-3, les cathepsines, les métalloprotéases (MMP-1, 2, 9 et 12) et les facteurs anti-protéasiques, tels que l' α -1 antitrypsine, les inhibiteurs des MMP pourraient être impliqués dans la genèse de l'emphysème (Abboud et Vimalanathan., 2008).

Le stress oxydatif est un autre élément potentiellement impliqué dans la physiopathologie des MPOC. Le stress oxydatif est augmenté dans les MPOC, notamment en cas d'exacerbation (Dekhuijzen *et al.*, 1996), Il existe une corrélation directe liant le stress oxydatif à la fumée de cigarette et aux cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophage) (Barnes, 2000). Le stress oxydatif induit ; (i) des lésions directes sur l'épithélium ; (ii) un recrutement des cellules inflammatoires par activation du facteur NF-kB régulant la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α , IL8 ; (iii) une diminution de l'activité des facteurs anti-protéasiques, tel que l' α -1 antitrypsine ; (iv) une augmentation de la production du mucus ; (v) une broncho-constriction et un œdème en rapport avec la production d'isoprostane (Barnes, 2000) (Figure 4).

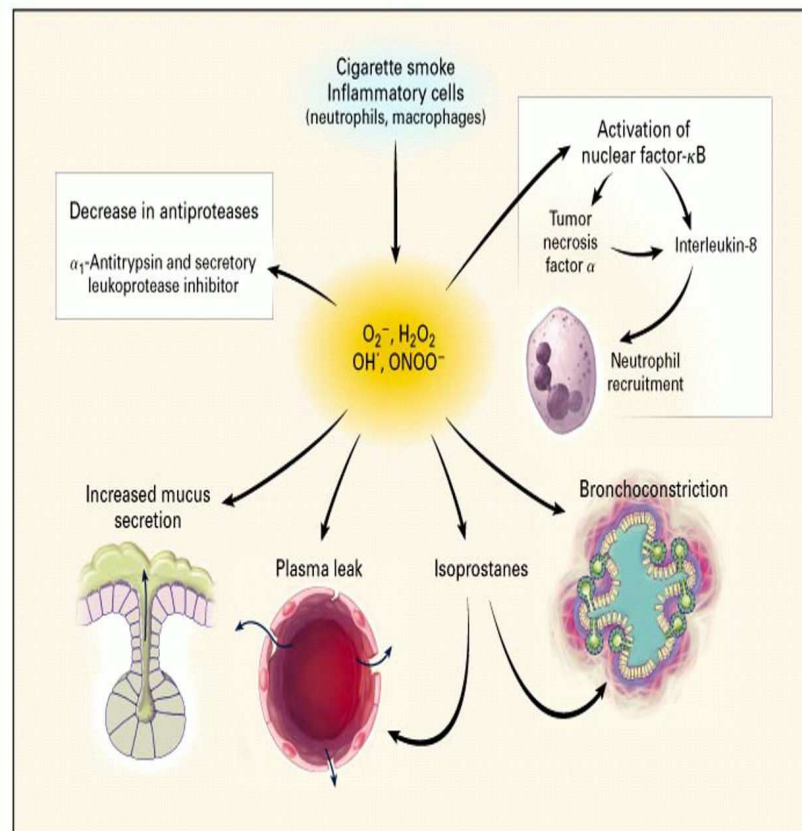


Figure 4: Implication du stress oxydatif dans la physiopathologie de la MPOC
(D'après Barnes, 2000).

Enfin, des facteurs infectieux bactériens et/ou viraux sont probablement incriminés au moins comme cofacteurs dans la genèse et l'aggravation des MPOC (Retamales *et al.*, 2001 ; Wedzicha, 2004). Les colonisations bactériennes et virales sont fréquentes dans les MPOC (Sethi *et al.*, 2006). Dans les exacerbations, les facteurs infectieux présentent 80% des causes et sont associés à une accélération du déclin de VEMS et donc à une majoration de la sévérité de la maladie (Donaldson *et al.*, 2002).

Il a été récemment émis l'hypothèse que des mécanismes d'auto-immunités pourraient être également en cause dans la genèse des MPOC (Anna et Patrick., 2009). Le nombre de follicules lymphoïdes comportant des lymphocytes B et T est augmenté au niveau des petites voies aériennes des MPOC sévères (Hogg, 2004). Le nombre de follicules lymphoïdes comportant des lymphocytes B est également augmenté dans un modèle animal d'emphysème induit par la fumée de tabac (Van Der Strate *et al.*, 2006). Les produits de dégradation de la matrice extra cellulaire, mais également des cellules épithéliales et endothéliales pourraient

constituer des cibles d'auto-anticorps (Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2006). Ce concept d'auto-immune reste cependant à démontrer de façon claire.

I.1.6 Epidémiologie des MPOC

I.1.6.1 Mortalité

La maladie pulmonaire obstructive chronique est la quatrième principale cause de mortalité dans le monde (OMS, 2002) et d'ici 2020, la MPOC en sera la troisième.

I.1.6.2 Prévalence

La prévalence de la MPOC est sous-estimée en raison de l'importance du sous-diagnostic (Mannino *et al.*, 2000). La prédominance mondiale de MPOC est plus de 9% en Europe (Halbert *et al.*, 2006), 11% en Amérique latine (Menezes *et al.*, 2005), 8,6% au Japon (Fukuchi *et al.*, 2004). Aux États-Unis, 14 millions de personnes souffrent de MPOC (12,5 millions de bronchites chroniques et 1,5 millions d'emphysémateux). On estime qu'il y a actuellement en France 2 millions et demi à 3 millions de bronchitiques chroniques et d'emphysémateux. Ce chiffre important inclut en fait une grande majorité de cas de bronchite chronique simple. On estime que le 1/3 environ de ces sujets, ont une vraie MPOC.

Age : La broncho-pneumopathie chronique obstructive atteint les adultes de plus de 40 ans et sa fréquence augmente avec l'âge.

Sexe : La MPOC prédominait classiquement dans le sexe masculin, mais la différence de fréquence entre les deux sexes a tendance à disparaître (50% de MPOC dans le sexe féminin aux États-Unis ; 1/3 de MPOC chez les femmes en France, La MPOC touche 4,8 % des femmes et 3,9 % des hommes au Canada), ce fait est habituellement attribué aux modifications des habitudes tabagiques. Les femmes seraient, selon certains auteurs, plus sensibles aux effets du tabagisme que les hommes, du fait probable de leurs plus petites voies aériennes (Martinez *et al.*, 2007).

I.1.7 Les Tests de diagnostic

I.1.7.1 Spirométrie

La spirométrie est le test de référence, facile à effectuer pour le diagnostic de la MPOC, et elle est facile à effectuer. Elle mesure le volume maximal d'air expiré à partir d'une inhalation maximale. C'est la capacité vitale forcée (CVF). Le volume d'air expiré est mesuré pendant la première seconde de la capacité vitale forcée. On appelle ce résultat le

volume expiratoire maximal par seconde (VEMS). Une fois le spiromètre en marche, Le patient remplit ses poumons d'air, le malade souffle pendant six secondes d'une seule expiration ininterrompue. Des études exhaustives ont démontré que trois mesures suffisent pour obtenir de bons résultats de spirométrie (GOLD, 2003). Habituellement, de 70 à 75 % de la CVF est expirée au cours de la première seconde; par conséquent, le ratio VEMS/CVF doit être supérieur à 70 % (GOLD, 2003).

La spirométrie est indiquée chez tout patient de plus de 40 ans, fumeur (actuel ou ancien) qui tousse et expectore régulièrement, s'essouffle lors de l'exécution de tâches simples et dont l'expiration est sifflante à l'effort ou pendant la nuit.

I.1.7.2 Analyses sanguines

Il faut envisager d'analyser les gaz du sang artériel chez les patients dont le VEMS est de moins de 40% de la valeur prédite si leur saturation de l'oxygène artériel est faible (moins de 92% selon l'oxymétrie) (Roberts *et al.*, 1993), ou chez lesquels on soupçonne une insuffisance respiratoire. On peut procéder à des analyses du sang veineux pour évaluer la concentration d'AAT (Cibson et Mac Nee., 2006).

I.1.7.3 Examen cytologique des expectorations

Même s'il est préférable de valider l'obstruction des voies aériennes par spirométrie, il est possible de valider l'inflammation des voies aériennes par des dénombrements quantitatifs de cellules dans des expectorations provoquées ou spontanées. (Hargreave et Parameswaran., 2006).

I.1.8 Traitement des MPOC

I.1.8.1 Cessation du tabagisme

Du fait que le tabagisme est la cause principale de MPOC, sa cessation est la seule interposition thérapeutique pour réduire la progression de cette pathologie à tous les stades (GOLG, 2005).

I.1.8.2 Les Bronchodilatateurs

Un traitement bronchodilatateur (anticholinergique ou β_2 -mimétique) est recommandé dans le traitement de la MPOC à partir du stade II de la classification de GOLD (modérément sévère) (Lindholm *et al.*, 2005) qui joue le rôle d'un traitement symptomatique de la MPOC. Les bronchodilatateurs à longue durée d'action (chez les patients qui ont des symptômes plus

persistants et une obstruction des voies aériennes qui varie de modérée à sévère) sont plus efficaces et pratique que les bronchodilatateurs à courte durée d'action (chez les patients dont les symptômes se manifestent à l'effort et qui ont relativement peu d'incapacité), mais ils sont plus coûteux (GOLD, 2003). D'autres données, démontrent que le tiotropium améliore la dyspnée, la fonction pulmonaire, la qualité de vie, la tolérance à l'effort et réduit la fréquence des exacerbations. (Vincken *et al.*, 2002).

Au cours d'études d'efficacité des bronchodilatateurs à courte durée, l'utilisation conjuguée d'anticholinergique et de β_2 -agonistes à courte durée d'action produit une meilleure bronchodilatation (Ikeda *et al.*, 1995).

1.1.8.3 Traitement substitutif du déficit en α_1 -antitrypsine

Il a été démontré, chez des sujets de phénotype PiZZ, que l'on pouvait, par des perfusions d'AAT d'origine humaine, obtenir sans effets secondaires des taux subnormaux d'AAT dans le sang et le liquide de recouvrement épithélial alvéolaire et restaurer une activité anti-élastasique normale dans ces milieux. Actuellement, ce traitement substitutif est utilisé par plusieurs milliers de patients dans le monde. Avec le recul, on peut affirmer que la tolérance du produit est excellente, que le risque de transmission d'un agent viral a été minimisé par le processus de fabrication de l'AAT. Ce traitement substitutif qui doit être prescrit à vie, est astreignant pour le patient et son coût est élevé (Hervé Mal *et al.*, 1999).

1.1.8.4 Traitement chirurgical de l'emphysème

L'approche chirurgicale actuelle de l'emphysème repose sur deux techniques:

- (i) la chirurgie de résection pulmonaire qui englobe la résection de grosses bulles et la réduction de volume pulmonaire pour emphysème diffus sans bulle volumineuse,
- (ii) la transplantation pulmonaire (Hervé Mal *et al.*, 1999).

I.2 Élastase du neutrophile (NE)

L'élastase du neutrophile (NE) (EC 3.4.21.36) est une enzyme appartenant à la famille des sérines protéases. Chez l'homme, le gène codant la NE est localisée sur le bras court du chromosome 19 (19p13.3), il possède une taille de 4 Kb il est organisé en cinq exons et quatre introns (Zimmer *et al.*, 1992).

I.2.1 Synthèses et stockage du NE

La NE est synthétisée sous forme d'un précurseur (zymogène) de 267 acides aminés et subit deux phases de maturation au cours de la différenciation du neutrophile pour être stockée sous forme active dans les granules azurophiles. Le niveau le plus élevé d'expression des ARNms codant la NE se situe au stade promyélocytaire de la différenciation (Garwicz *et al.*, 2005). Peu après sa synthèse, la forme zymogène subit une phase de maturation puis d'adressage dans les granules azurophiles. La maturation de la pro-forme débute par un clivage du côté N terminal, libérant un peptide signal de 27 résidus. Il reste à cette extrémité une pro-séquence formée de 2 résidus qui est retirée par l'action de la dipeptidyl peptidase I (DPPI) appelée aussi cathepsine C (Adkison *et al.*, 2002). Le clivage de ces résidus n'est pas essentiel pour l'adressage de la NE au granule azurophile mais il est indispensable pour son activité enzymatique. La maturation de l'extrémité N-terminale est essentielle au stockage optimal de la NE dans les granules azurophiles. En absence de DPPI, les pro-formes sont sécrétées de façon constitutive (Garwicz *et al.*, 2005) ou dégradées plus facilement (Pham et Ley., 1999). La pro-forme subit ensuite le clivage d'une séquence à l'extrémité C-terminale de 19 résidus (Salvesen et Enghid., 1990) dont le dysfonctionnement peut affecter le transport des protéases du Golgi aux granules azurophile (Gullberg *et al.*, 1995 ; Horwitz *et al.*, 2004) (Figure 5).

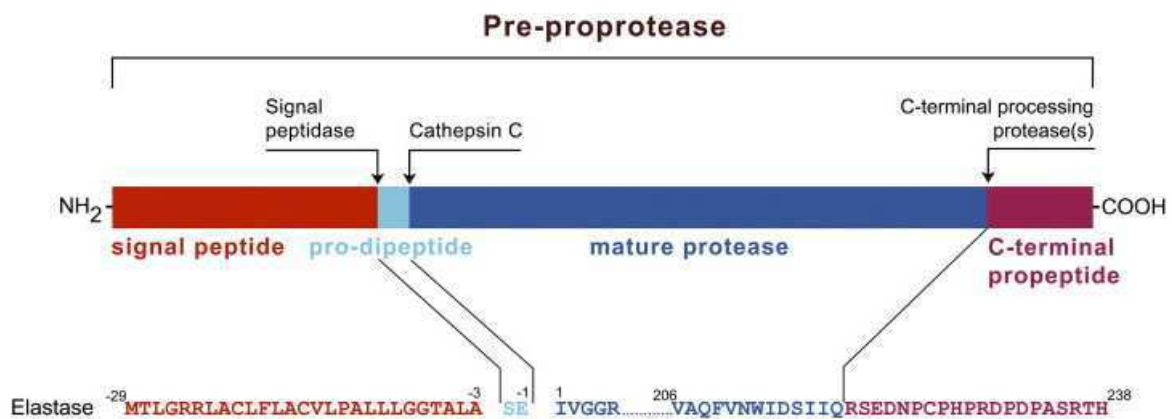


Figure 5 : Processus de maturation de la NE humaine (D'après Korkmaz *et al.*, 2008).

Cette phase de maturation de la pro-forme d'élastase révèle un site d'interaction avec une protéine particulière, l'AP3 (Adaptator Protein 3), qui permet le transfert de la protéase de l'appareil de Golgi aux granules azurophiles. Sans cette phase de maturation de l'extrémité C-terminale, l'interaction avec la protéine AP3 ne se fait pas et l'élastase est adressée à la membrane plasmique où elle occupe une position trans-membranaire (Benson *et al.*, 2003) (Figure 6).

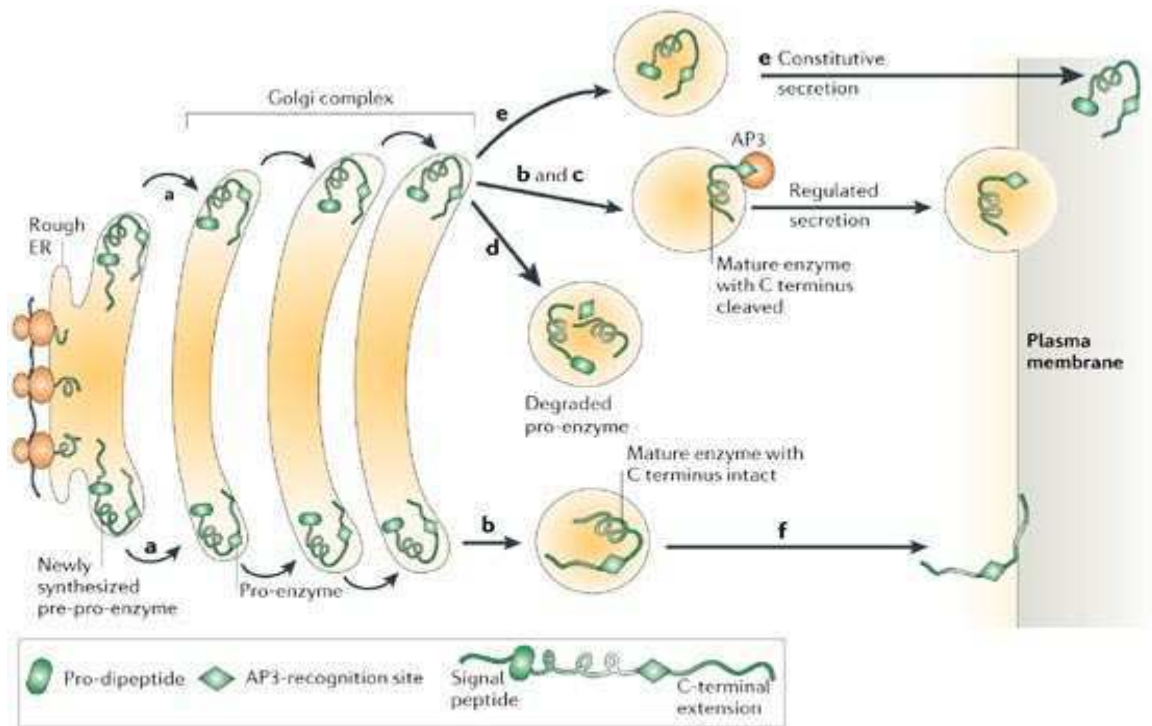


Figure 6: Biologie des sérine-protéases du neutrophile (D'après Pham, 2006).

I.2.2 Caractéristiques biochimique

La NE est stockée sous forme mature de 30 kDa (218 acides aminés) dans les granules azurophiles, libérée dans l'environnement extracellulaire lorsque le neutrophile est exposé à des stimuli inflammatoires (Lungarella *et al.*, 2008). La structure de la forme mature est stabilisée par des ponts disulfures et comporte des motifs N-glycosidiques dont la nature variable permet la différenciation des trois isoformes de la NE (Watorek *et al.*, 1993) (Figure 7).

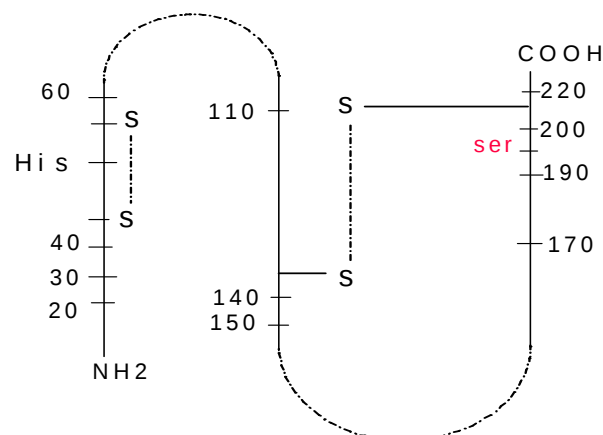


Figure 7: L'élastase est constitué de 218 acides aminés avec deux pontes S-S (D'après Lafuma, 1991).

L'abondance de résidus basiques par rapport aux résidus acides confère à la protéase un caractère fortement basique ($pH_i > 9$). Ainsi la NE est inactive dans les granules en raison du pH intragranulaire acide et du fait de son association à des protéoglycanes chargés négativement comme la serglycine (Reeves *et al.*, 2002 ; Niemann *et al.*, 2004). Le pH plus élevé dans le milieu extracellulaire ou dans le phagolysosome ainsi que la dissociation des complexes par des mécanismes dépendants du flux K^+ permettraient de révéler son activité protéolytique (Reeves *et al.*, 2002).

L'enzyme mature est une glycoprotéine extrêmement cationique avec un point isoélectrique très basique (10-11) (Korkmaz *et al.*, 2008) (Figure 8). La NE est une enzyme puissante capable de dégrader différents substrats protéiques par clivage principalement de liaisons -Val-X-, -Ala-X-, -Leu-X-, et Met-X-. L'activité enzymatique de cette protéase réside en sa triade catalytique His⁵⁷-Asp¹⁰²-Ser¹⁹⁵ où la Serine représente le résidu nucléophile (Belaouaj *et al.*, 2002).



Figure 8: Structure tridimensionnelle de l'élastase humaine du Neutrophile (D'après Korkmaz *et al.*, 2008). « Les résidus de la triade catalytique apparaissent en jaune »

I.2.3 Inhibiteurs physiologiques endogènes de la NE

L' α 1-protéinase inhibitor (α 1-PI), le SLPI (Secretory Leucocyte Peptidase Inhibitor) et l'élafine sont des inhibiteurs physiologiques de la NE. Ils s'opposent à l'activité extracellulaire et excessive de l'enzyme (Fitch *et al.*, 2006).

Les inhibiteurs des sérine-protéase constituent un groupe de molécules pléiotropiques capables de limiter l'effet délétère des protéases de l'hôte ainsi que celui des pathogènes. L' α 1-PI est un inhibiteur systémique typique de plusieurs sérine-protéase incluant la PR3, la CG et cible principalement la NE. Cet inhibiteur inactive la NE en s'y attachant de façon covalente et permanente (Dobo *et al.*, 2004). Il inhibe approximativement 92% de la NE dans le sérum, le reste de l'inhibition est assuré par l' α 2-macroglobuline (α 2-M) qui est également un inhibiteur systémique. L' α 2-M bloque en partie l'activité de la NE à travers une obstruction structurale d'une fraction protéique de la sérine protéase (Moore *et al.*, 1999). Le SLPI inhibe principalement la NE via son extrémité C-terminale (Kido *et al.*, 1999).

L'élafine inhibe les protéases à travers son domaine C-terminal, la NE est son substrat principal (Simpson *et al.*, 1999).

I.2.4 Mécanismes d'échappement de la NE aux inhibiteurs de protéases endogènes

La fonction physiologique des inhibiteurs endogènes des sérine-protéases du neutrophile est d'empêcher la NE d'induire des lésions tissulaires et d'endommager les poumons. Malgré ce mécanisme de contrôle au niveau du site inflammatoire, la NE est capable d'échapper à la régulation des antiprotéases selon différentes manières. D'abord, du fait de leurs haut poids moléculaire, les inhibiteurs de protéases ne peuvent pas accéder au microenvironnement inflammatoire entre les neutrophiles et la NE. D'autre part, l' α 1-PI peut être inactivée à travers l'oxydation de son centre catalytique (méthionine en position 358) par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dérivées des neutrophiles activés (Kramps *et al.*, 1987). Il a été démontré que ce mécanisme inactive également l' α 2-M et le SLPI (Weiss *et al.*, 1989). Enfin, le troisième mécanisme d'échappement de l'élastase consiste en la non efficacité totale des inhibiteurs endogènes contre la NE liée au tissu (Kawabata *et al.*, 1996) et à la surface des neutrophiles (Owen *et al.*, 1995). Ce dernier mécanisme est cependant contre versé. En effet. En 2005, Korkmaz et collaborateurs ont montrés que l' α 1-PI est capable d'inhiber la NE liée à la surface du neutrophile. En outre, il a été montré que les inhibiteurs endogènes de protéases de faibles poids moléculaires sont parfaitement efficaces contre la NE libre et liée au tissu.

I.3 La plante *Nigella sativa* L.

I.3.1 Généralités

- *Nomenclature*

La nigelle nous offre des petites graines aromatiques menées d'un noir intense communément connues sous le nom de cumin noire, black seed en anglais, *Habbat el baraka* ou *El habbah sauda* en Arabe, En Algérie connue sous le nom vernaculaire *Sinoudj* (Ghedira et Le Jeune., 2010).

- *Aire de répartition*

Nigella sativa L. est une plante herbacée appartenant à la famille des Renonculacées (Guignard, 2001). C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie (Aljabre *et al.*, 2005). Elle est cultivée dans les régions tropicales et semi-arides (D'Antuono *et al.*, 2002 ; Raj Kapoor *et al.*, 2002). Les pays producteurs de la nigelle sont principalement la Syrie, l'Égypte, l'Arabie Saoudite, la Turquie, l'Iran, le Pakistan et l'Inde (Kokdil *et al.*, 2005).

- *Utilisation en médecine traditionnelle*

Nigella sativa L. (Renonculacée), communément appelée nigelle cultivée, est une plante annuelle traditionnellement utilisée dans les pays arabes, dans le sous-continent indien et en Europe depuis des millénaires à des fins culinaires et médicinales. C'est un remède naturel pour de nombreuses pathologies, notamment pour le traitement de l'asthme, de l'inflammation, de la toux, de l'eczéma et des états grippaux (Ghedira, 2006). La graine ou l'huile qui en est issue sont employées comme diurétique, carminatif, cholagogue et vermifuge (Ghedira, 2006). Dans la médecine traditionnelle islamique, le prophète Mohamed satisfaction et salut de dieu sur lui avait dit : "*Soignez-vous en utilisant la graine noire, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort*". Ibn Sina (Avicenne) dans son livre intitulé "livre de la guérison" la recommanda contre la fatigue, les maux de tête, la paralysie faciale et les calculs rénaux. Plus tard, Ibn Elbitar la recommanda pour les problèmes de reins et la gale, Ahmad Ibn Ibrahim la recommanda contre la chute de cheveux et le tétanos et Ibn Moussa contre la fièvre (Mahmoudi, 1990).

En Algérie, la nigelle cultivée (confondue avec *Nigella damascena*) est employée en cas de fièvre, d'algies dentaires, de maux de tête, comme diurétique et emménagogue (Ghedira, 2006). En infusion, elle est indiquée dans les nausées, les gastralgies, les

vomissements et les coliques. Écrasées dans l'huile, les graines sont employées comme liniment contre les rhumatismes. Écrasées et prises dans l'eau, elles seraient efficaces contre la constipation et les céphalées (Ghedira, 2006).

I.3.2 Description botanique de la plante

Nigella sativa L. (Renonculacée) est une plante annuelle herbacée, atteignant 30 à 60 cm de haut. Ses fleurs sont petites, à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (Ghedira, 2006 ; Ghedira et Le Jeune., 2010). Les feuilles, pennatiséquées, divisées en lobes étroits, sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères. Les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues (Bonnier, 1990).

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome et forme des capsules qui contiennent des graines blanches. À maturité, les capsules s'ouvrent par une fente interne et exposent les graines à l'air, ce qui les rend noires (Schleicher *et al.*, 1998). Les graines de *Nigella sativa* L sont ovoïdes de 2 à 3.5mm qui présentent 03 à 04 ongles et la face supérieure est finement granuleuse et réticulée (figure 9) (Andreas *et al.*, 2005 ; Ghedira, 2006).

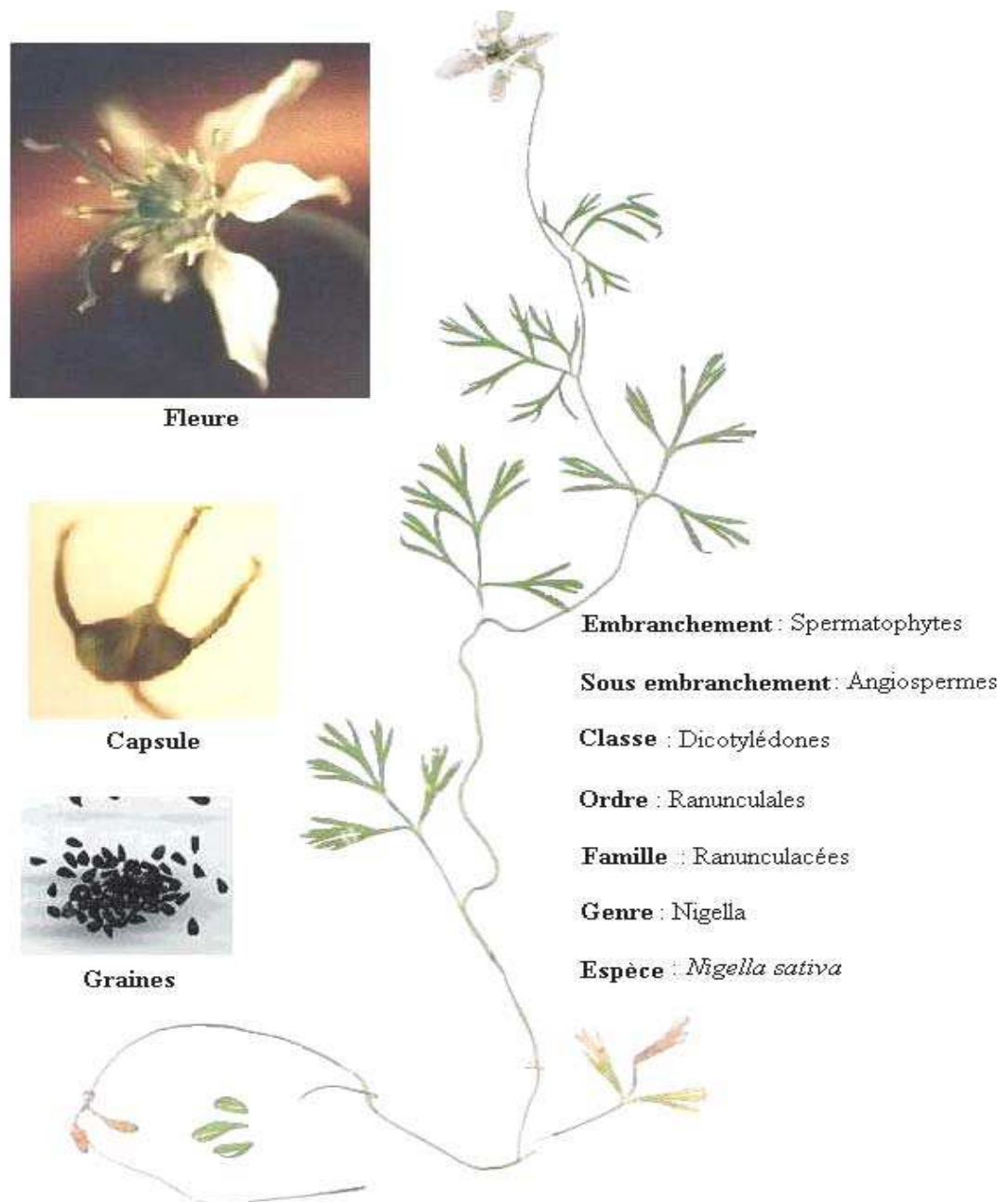


Figure 9 : Aspect morphologique et classification botanique de la plante *Nigella arvensis* L.
(D'après Guignard, 2001).

I.3.3 Composition biochimique

Les études phytochimiques effectuées pour déterminer la composition chimique et les principes actifs des graines de *NS*, ont révélées qu'elles sont riches en plusieurs constituants (métabolites secondaires et primaires), dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'extraction et de détection.

En fonction de la région où la plante est cultivée, les taux des composés nutritifs, lipides, protéines et glucides varient significativement. A titre d'exemple les graines de *NS* cultivées en Turquie, le taux de protéines varie de 14,1 à 26,4%, alors que celui des lipides de 28,6 à 42,5%. (Tableau II) (Aksoy *et al.*, 2001 ; Atta, 2003 ; Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007). Les graines de *NS* contiennent des monosaccharides tels que le glucose, ramnose, xylose, arabinose et des polysaccharides non amidonnés sous forme de fibres alimentaires (Zahoor *et al.*, 2004).

En plus de ces composés majoritaires, *Nigella sativa* contient des huiles essentielles, des acides gras, des phospholipides et plusieurs métabolites secondaires comme les alcaloïdes et les polyphénols. Elle contient plusieurs vitamines (A, B, B2, C et Niacine) (Salem, 2005) et des sels minéraux (Ca, K, Fe, Zn, Mn et Se).

Tableau II : Composition des graines de *Nigella sativa* de différentes régions (Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007 ; Atta, 2003 ; Aksoy *et al.*, 2001).

Constituants	<i>Nigella sativa</i> Tunisienne*	<i>Nigella sativa</i> Iranienne*	<i>Nigella sativa</i> Egyptienne**	<i>Nigella sativa</i> turquie***
Protéines	26,70%	22,60%	20,80%	14.10 à 26.40%
Matière grasse	28,48%	40,35%	34,80%	28,60 à 42,50%
Humidité	08,65%	04,08%	07%	06,40 à 09,40%
Cendres	04,86%	04,41%	03,70%	02,40 à 07,80%
Carbohydrates	31,31%	28,65%	33,70%	12,40 à 30,80%
Fibres	-	-	-	04,60 à 11,90%

- : inconnu

* Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007. ** Atta, 2003. *** Aksoy *et al.*, 2001.

I.3.3.1 Les protéines

La graine de *NS* est très riche en protéines (20 à 26%). L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés, y compris 8 acides aminés essentiels. Quantitativement, les acides aminés constitutifs majoritaires sont non essentiels (69,81%). L'acide glutamique est fortement présent (24,74%) (Tableau III) (Al-Jassir, 1992 ; Salem, 2005 ; El-Obeid *et al.*, 2006).

Le fractionnement des protéines de *Nigella sativa* par SDS-PAGE montre que des bandes de poids moléculaire allant de 10 à 94 KDa (Haq *et al.*, 1999). La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse les réactions de transestérification (Akova *et al.*, 2000 et Tuter *et al.*, 2003).

Tableau III: Les acides aminés des protéines de *Nigella sativa* (D'après Al-Jassir, 1992).

Acides aminés	Teneur en acides aminés
Acides aminés essentiels	30,19%
Leucine	05,82
Valine	04,61
Lysine	04,04
Thréonine	03,65
Phénylalanine	03,61
Isoleucine	03,46
Histidine	03,35
Méthionine	01,65
Acides aminés non essentiels	69,81%
Acide glutamique	24,74
Arginine	09,19
Acide aspartique	08,94
Glycine	05,61
Proline	04,90
Serine	04,31
Alanine	03,73
Tyrosine	03,59
Cystéine	01,96

I.3.3.2 Les huiles fixes

Les huiles fixes de *Nigella sativa* extraits par pression à froid sont majoritairement composées de triglycérides (57,50%) et contiennent une faible fraction de lipides polaires (3,70%), des monoacyl-glycérol et diacyl-glycérol avec des proportions respectives de 4,80% et 5,10% (Tableau IV). On y trouve aussi des stérols libres et estérifiés. L'analyse des stérols libres montre que le β -sitostérol représente le composant majeur suivi par le D5-avenastérol et

le D7-avenastérol, alors que le stigmastérol, le campestérol et le lanostérol ont été trouvés à des taux très faibles (Ramdan *et al.*, 2002).

Tableau IV: Taux des lipides de l'huile fixe de *NS* extraite par différentes Méthodes

(D'après Atta, 2003).

	Extraction par pression à froid (%)	Extraction à chaud par solvant apolaire (%)
Lipides polaires	03,70	04,80
Monoacyl-glycerol	04,80	05,70
Diacyl-glycerol	05,10	04,10
Stérols libres	03	05
Inconnu	05,40	04,50
Acides gras libres	14,20	08,30
Triacyl-glycerol	57,50	63,20
Stérols esters	02,50	04,40

L'analyse quantitative et qualitative des huiles fixes de *NS* cultivée dans différentes régions, montre que leur composition en acides gras est fortement influencée par les facteurs de l'environnement (sols, température, climat ...etc). Des travaux effectués sur les huiles fixes de *NS* d'origines iranienne, tunisienne et égyptienne (Tableau V) montrent une variabilité des taux en différents acides gras. Cependant, les acides gras insaturés restent majoritairement présents quel que soit l'origine de la plante. Dans ces huiles, les principaux acides gras saturés sont essentiellement l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide myristique, tandis que les acides gras insaturés majoritaires sont l'acide linoléique et l'acide oléique (Üstun *et al.*, 1990 ; Atta, 2003).

Tableau V: Composition des huiles fixes de *Nigella sativa* tunisienne (Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007), iranienne (Nickavar *et al.*, 2003 ; Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007) égyptienne (Atta, 2003).

Acides gras	NS tunisienne	NS iranienne	NS égyptienne
AG saturés	22.70%	17 - 25.5%	24%
Acide myristique	0,35	0,40 – 0,50	09,80
Acide palmitique	17,20	12,50 – 18,40	09,90
Acide stéarique	02,84	03,40 – 03,70	03,30
Autres	02,12	02,80	01
AG insaturés	77,30%	74.8 – 82.5%	73,50%
Acide oléique	25	23,40 – 23,70	20,1
Acide linoléique	50,31	19,15 – 55,60	49
Autres	01,81	03,20	04,40

1.3.3.3 L'huile essentielle

Représente entre 1,4 à 1,9 % du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50 % du poids des graines (Benkaci-Ali *et al.*, 2006). L'analyse de cette huile par GC-MS réalisée par l'équipe de Bucar (2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont ; la thymoquinone (27,8%-57 %), *p*-cymène (7,07-15,83 %), carvacrol (5,8-11,6 %), longifolène (1,2-8 %), 4-terpinol (1,98-6,59 %), et le tanethol (0,25- 4,28 %) (Burits et Bucar., 2000). Alors que l'étude d'huile essentielle des graines de NS effectuée par l'équipe de Nickavar démontre que les composés majoritaires sont le *trans*-anethole (38.3 %), *p*-cymene (14.8 %), limonene (4.3 %) et le carvone (4.0 %) (Nickavar *et al.*, 2003) (Tableau VI). Récemment, L'huile essentielle de NS cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes; l'hydrodistillation et distillation par micro-onde a été analysée par CPG et GC-MS, 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le *p*-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone (Benkaci-Ali *et al.*, 2007).

Tableau VI: Composition chimique des huiles essentielles de NS cultivée en Iran(D'après Nickavar *et al.*, 2003).

Composant	Pourcentage
<i>Non terpenoides hydrocarbones</i>	04
n-Nonane	01,70
3-Méthyl nonane	0,30
1,3,5-Triméthyl benzene	0,50
n-Decane	0,40
1-Méthyl-3-propyl benzene	0,50
1-Méthyl-2,3-diméthyl benzene	0,20
n-Tetradecane	0,20
n-Hexadecane	0,20
<i>Monoterpnoides hydrocarbones</i>	26,9
A-Thujene	02,40
α -Pinene	01,20
Sabinene	01,40
B-Pinene	01,30
Mycrene	0,40
α -Phylanrene0.3	0,60
P-Cymene 0.5	14,80
Limonene0.4	04,30
γ -Terpinene	0,50
<i>Monoterpénoides ketones</i>	06
Fenchone	01,10
Dihydrocarbone	0,30
Carvone	04
Thymoquinone	0,60
<i>Monoterpenoides alcools</i>	02,70
Terpinen-4-ol	0,70
P-Cymene-8-ol	0,40
Carvacrol	01,60
<i>Sesquiterpénoides hydrocarbones</i>	01
A-Longipinene	0,30
Longifolene	0,70
<i>Phenyl propanoides composants</i>	46,10
Astragole	01,90
Anisaldehyde	01,70
Tran-anéethole	38,30
Myristicine	01,40
Dill apiole	01,80
Apiole	01
Total	86,70

I.3.3.4 Les Alcaloïdes

Plusieurs alcaloïdes ont été isolés à partir des graines de *NS*. Les plus importants sont la nigelline, nigellicine, nigellidines, nigellimine, isoquinoline, indazole et N-oxy nigellimine (Gilani *et al.*, 2004 ; Ghedira, 2006) (figure 12) et les alcaloïdes diterpènes Dollabllane-types nigellamines A1, A2, B1, B2 (Morikawa *et al.*, 2004a), A3, A4, A5, et C (Morikawa *et al.*, 2004b).

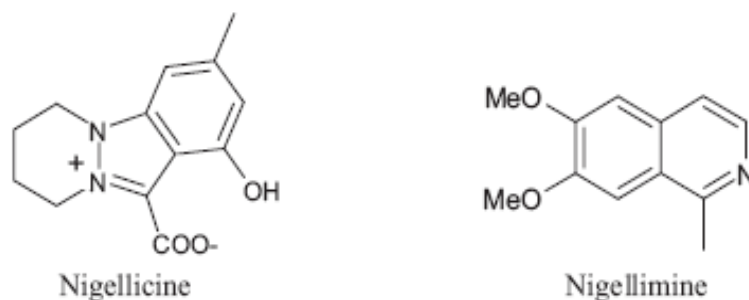


Figure 10 : Structure des alcaloïdes de *NS* (nigellicine et nigellimine) (D'après Ghedira., 2006).

I.3.3.5 Les polyphénols

Les polyphénols de *NS* sont les plus actifs pharmacologiquement. A partir de l'huile, 04 constituants ont été isolés et identifiés structuralement par HPLC et RMN ; la thymoquinone, le dithymoquinone, le thymohydroquinone et le thymol (figure 13) (Gilani *et al.*, 2004 ; Ghedira, 2006).

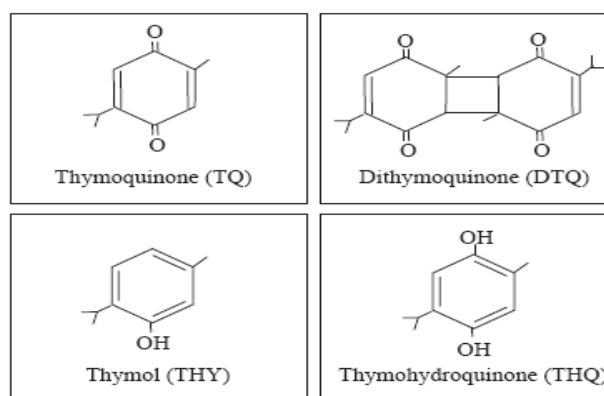


Figure 11 : Structure des polyphénols de *Nigella sativa* (D'après Salem, 2005).

Des composés phénoliques de type flavonol-triglycosides ont été aussi identifiés dans les huiles des graines de NS (Merfort *et al.*, 1997) et qui sont :

- Quercétine-3-O- β -glucopyranosyl (1-2)-O- β -galactopyranosyl (1-2)-O- β -glucopyranoside.
- Kaempferol-3-O- β -glucopyranosyl (1-2)-O- β -galactopyranosyl (1-2)-O- β -glucopyranoside.
- Quercétine-3-O-(6-feruloyl- β -glucopyranosyl) (1-2) - O - β -galactopyranosyl (1-2) -O- β -glucopyranoside.

1.3.3.6 Les triterpènes saponines

Les graines de NS contiennent également une saponoside triterpénique appelée l' α -hederine (Kumara et Huat., 2001). Une étude ultérieure de Taskin et collaborateurs (2005) a permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique trois autres saponosides apparentées à l' α -hederine, avec l'élucidation de leurs structures par des méthodes chimiques et spectrales et qui sont :

- 3-O- β -D-xyl(1-3)- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-28-O- α -L-rha(1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu- hédéragénine.
- 3-O- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-28-O- α -L-rha-(1-4)- β -D-glu (1-6)- β -D-glu-hédéragénine.
- 3-O- β -D-xyl (1-3)- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-hédéragénine.

Récemment, une recherche phytochimique étendue sur l'extrait méthanolique de la nigelle égyptienne, a menée à l'isolement de deux triterpène saponines, appelés sativosides A et B, douées d'une activité anti-inflammatoire (Elbandy *et al.*, 2009)

Un autre triterpène glycosylé a été identifiée dans l'extrait éthanolique des graines en tant que 3-O-[β -D-xyl-(1-3)- α -L-rha-(1-4)- β -D-glu]-11-methoxy-16-hydroxy-17-acetoxy hederagenine. (Bhupendra *et al.*, 2009)

1.3.3.7 Les vitamines

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines B1, B2, B6 et de l'acide folique (Nergiz et Ötles., 2003). Ramadan et Mörsel (2002) ont analysé les vitamines liposolubles des graines de NS et ont pu identifier toutes les classes des tocophérols dans l'huile. Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%). Ces mêmes chercheurs ont pu également identifier d'autres vitamines liposolubles; la β -carotène (0,05%) et la vitamine K1 (0,1%). Dans une étude ultérieure, l'analyse par HPLC démontre que les

teneurs en α et γ -tocophérols sont relativement élevées: de 5, 65 à 11,39 et de 2, 26 à 6,95 mg/kg respectivement (Al-Saleh *et al.*, 2006).

I.3.3.8 Les sels minéraux

Des travaux sur la composition minérale de la graine de *NS* ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1.18 % de poids total de la graine) et que le calcium, le fer, le sodium représentent 0. 188, 0. 0575 et 0. 0853 % respectivement (Nergiz et Otles., 2003), la teneur des graines en sélénium a été également déterminée, et représente 0,13-0,20 mg/kg des graines (Al-Saleh *et al.*, 2006).

I.3.4 Activités biologiques et propriétés pharmacologiques

Durant les vingt dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de *NS*, notamment sur les effets dus aux extraits de la graine de cette espèce ainsi qu'aux principaux constituants (notamment la thymoquinone) sur divers systèmes biologiques ou non (*in vivo* et *in vitro*) (Ghedira et Le Jeune., 2010).

I.3.4.1 Activité antioxydante

1) Activité antioxydante *in vitro*

L'huile fixe de *NS* ainsi que la thymoquinone (composé majoritaire dans l'huile essentielle) inhibe la lipoperoxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes (Houghton *et al.*, 1995). La thymoquinone, le carvacrol, le trans-anéthole et le 4-terpinéol (composés majoritaires de l'huile essentielle) exercent un important effet piègeur de radicaux libres (Burits et Bucar., 2000). Ces mêmes constituants sont responsables de propriétés antioxydantes variables sans présenter d'effet prooxydant (Swamy et Huat., 2003 ; Ilhan *et al.*, 2005) . L'huile fixe et ses fractions (lipides neutres, glycolipides et phospholipide) montrent une activité antioxydante vis-à-vis des deux radicaux libres stables (DPPH et le radical glavinoxyl). Cette activité antioxydante est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile (Ramadan et Morsel., 2003).

2) Activité antioxydante *in vivo*

L'administration de l'huile de *NS* et de la thymoquinone chez des rats protège contre l'hyperhomocystéinémie induite par la méthionine en bloquant l'accumulation de l'homocystéine, l'une des causes de l'état du stress oxydant, conduisant à la protection contre

la peroxydation lipidique et les changements du statut oxydatif (Burits et Bucar., 2000 ; El-Saleh *et al.*, 2004 ; Ilhan *et al.*, 2005). Par ailleurs, le traitement de rats soumis à un régime alimentaire contaminé par l'aflatoxine, avec l'huile de *NS*, entraîne une protection importante contre l'hépatonéphrotoxicité et les altérations oxydatives (réduction des taux de la GPx, de la SOD, augmentation de la peroxydation lipidique et des altérations de l'ADN) induites durant l'aflatoxicose. Cet effet protecteur de l'huile de *NS* est probablement attribué à leur effet piègeur de radicaux libres (Abdel-Wahhab et Aly., 2005).

1.3.4.2 Activité anti-inflammatoire

Plusieurs travaux rapportent que la thymoquinone (TQ) est le principe actif essentiel responsable de l'effet anti-inflammatoire des extraits de *NS*; la TQ s'est avérée être un puissant inhibiteur de la thromboxane B2 et des leucotriènes B4 par l'inhibition respective des cyclooxygénase et lipooxygénase (E1-Dakhakhny *et al.*, 2002 ; Hajhashemi *et al.*, 2004). C'est un inhibiteur efficace de la production des leucotriènes par l'inhibition de la Leucotriène-C4-synthase (LT4 synthase) (Mansour et Tornhamre., 2004). En 2002, El-Mahmoudy et collaborateurs démontrent que la TQ inhibe la production de NO par la réduction de l'expression de l'ARNm du NOS. En 2007, El Gazzar et ses collaborateurs, ont rapportés que la TQ empêche la production de cytokines pro-inflammatoires induit par LPS en bloquant l'expression de facteur de transcription de GATA et l'attache d'instigateur. Le composé empêche la production d'Il-5 induit par LPS et l'expression de l'ARNm de l'Il-13 et la traduction. Cependant, l'activité de l'huile fixe sur les cyclooxygénases et lipooxygénases est plus importante que la TQ elle-même; l'activité anti-inflammatoire n'est pas donc entièrement due à la présence de la TQ. Des acides gras insaturés de type C20: 2 semblent être impliqués (Houghton *et al.*, 1995 ; Gilani *et al.*, 2004).

1.3.4.3 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de *NS* a été montrée contre plusieurs souches bactériennes telles que; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Hanafy et Hatem., 1991 ; Morsi, 2000 ; Khan *et al.*, 2003).

Les différents extraits des graines de *NS* (aqueux, de méthanol et de chloroforme) présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes (Mashhadian et Rakhshandeh., 2005). L'huile de la Nigelle possède également un pouvoir

inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (Nair *et al.*, 2005). Récemment, Bourgou et collaborateurs démontre que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle obtenue à partir des graines de *NS* tunisiennes a été étudié contre *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Escherichia coli* (Gram négatif). L'évaluation des activités des composés volatils présentent dans l'huile a suggéré que la TQ et le longifolène aient été en grande partie responsable de l'activité d'huile contre *Staphylococcus aureus*, alors que la TQ possède une bonne activité contre *Escherichia coli* (Bourgou *et al.*, 2009).

1.3.4.4 Activité anticancéreuse

Plusieurs auteurs ont étudié l'éventuelle activité anti tumorale d'extraits ou de composés purs issus des graines de *NS*. En 1991, Salomi *et collaborateurs* ont montrés qu'un extrait méthanolique brut, préparé à partir des graines de cette plante, présente une importante action cytotoxique sur le carcinome ascitique d'Ehrlich et sur le lymphome ascitique de Dalton tout en exerçant une cytotoxicité minimale vis-à-vis des lymphocytes normaux. Les graines de *NS* ou ses constituants présentent une action préventive des cancers et/ou réductrice de la cytotoxicité des médicaments antinéoplasiques usuels. En effet, la thymoquinone exerce, *in vitro* et *in vivo*, un effet inhibiteur de la carcinogenèse de l'estomac et du fibrosarcome induit par le 20-méthylcholanthrène chez la souris (Badary *et al.*, 1999 ; Badary et Gamal., 2001). Par ailleurs, l' α -hédérine et la TQ exercent d'importantes propriétés anti tumorales vis-à-vis le carcinome de poumon, carcinome épidermoïde de larynx, adénocarcinome de colon et le Carcinome de pancréas, d'une manière dose et temps dépendante (Rooney et Ryan., 2005).

1.3.4.5 Activité antidiabétique

Plusieurs études ont adressé les propriétés antidiabétiques de la nigelle (Haddad *et al.*, 2006). Les effets des graines de *NS* sur certaines complications du diabète expérimental induit chez le lapin ont fait l'objet de nombreux travaux (EI-Zawahrawy *et al.*, 1998 ; Meral *et al.*, 2001). A1-Hader et collaborateurs (1993) rapportent que l'huile essentielle de la graine administrée par voie intrapéritonéale (à raison de 50 mg/kg) abaisse de façon significative (de 15 à 23 %) la glycémie à jeun chez les animaux normo- et hyperglycémiques. L'insulinémie n'ayant pas été affectée par les traitements, l'effet hypoglycémiant observé se manifeste selon un mécanisme, non encore identifié, n'impliquant pas l'insuline (Hawsawi *et al.*, 2001 ; EI-Dakhakhny *et al.*, 2002).

Récemment; Meddah et collaborateurs (2009) rapportent que l'extrait aqueux de *Nigella sativa* inhibe d'une manière dose dépendante les transporteurs sodium-dépendant de glucose *in vivo et in vitro* à travers le jéjunum isolé des rats.

1.3.4.6 Activité sur le système respiratoire

Nigella sativa est l'une des plantes les plus recommandées pour le traitement des maladies respiratoires. En 1993, El Tahir et collaborateurs ont prouvés que l'administration intraveineuse des huiles essentielles de *NS* est responsable d'une augmentation, dose dépendante, de la pression intra trachéal chez le cobaye. Gilani et ses collaborateurs (2001) ont montrés que l'extrait brut méthanolique des graines de *NS* exerce un effet spasmodique et broncho-dilatateur avec implication probable de bloqueurs des canaux calciques. Cette activité est concentrée dans la fraction organique qui est dix fois supérieure à celle de l'extrait brut. Le traitement des cobayes préalablement exposés à des aérosols de l'acide citrique par différents extraits de *NS* (extrait aqueux, extrait macéré et extrait décocté) montre un effet antitussif très important comparable à celui de la codéine (Boskabady *et al.*, 2004). Les investigations d'autres chercheurs ont permis de prouver que le nigellone (polythymoquinone) est un agent protecteur efficace contre l'asthme et la bronchite, en inhibant efficacement la libération de l'histamine (Gilani *et al.*, 2004). L'action des graines de *NS* sur le système respiratoire est probablement la résultante de plusieurs effets; cholinergiques (Boskabady et Shahabi., 1997), inhibition des récepteurs H1 de l'histamine (Boskabady et Shiravi., 2000) et antagonisme du calcium (Gilani *et al.*, 2001 ; Boskabady et Shirmohammadi., 2002 ; Boskabady *et al.*, 2004).

I.3.4.7 Autres activités pharmacologiques de la nigelle

Activités	Effets et cibles	Constituants testés	Références
Anti-virale	Le virus de l'herpès cytomégalovirus murin (MCMV)	Huiles fixes	Salem, 2005
Immunologique	Immuno potentialisatrice des lymphocytes T humain Stimulateur des lymphocytes T en culture ; <i>Potentialisation</i> de la réponse immune ; Augmentation des CD4, CD8 et NK	Extrait brut ; protéines ; extrait d'éthyle acétate et huiles fixes	Haq <i>et al.</i> , 1999 ; Swamy <i>et al.</i> , 2000 ; Ali <i>et al.</i> , 2003 ; Salem, 2005
gastro-intestinal	Diminution de la sécrétion de l'acide gastrique et l'indice d'ulcère ; Gastro-protectif contre les lésions gastriques ; Effet spasmolytique ; Augmentation de la mucine gastrique	Extrait alcoolique ; Extrait aqueux ; Huile fixe ; Extrait méthanolique	Raj Kapoor <i>et al.</i> , 2002 ; Ali, 2003 ; El-Abhar <i>et al.</i> , 2003 ; Gilani, 2004 ; Ghedira, 2006
Anti-parasitaire	la réduction du nombre de <i>Schistosoma mansoni</i> dans le foie et diminue le nombre d'œufs déposés dans le foie et les intestins.	L'huile fixe	Mahmoud <i>et al.</i> , 2002

Chapitre II
Matériel Et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Les graines de *Nigella sativa*

Les graines de *Nigella sativa* sont locales, cultivées et récoltées dans la région de Maguera (Wilaya de M'SILA) au cours de l'année de 2009. Les graines sont nettoyées des débris végétaux et conservées à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

II.1.2. Les lavages broncho-alvéolaires

Les échantillons des lavages Broncho-alvéolaires des patients emphysémateux sont obtenus à partir de différents centres hospitalo-universitaires d'Algérie, répartis soigneusement en aliquotes puis conservés à -70 °C jusqu'à utilisation.

II.1.3. Produits chimiques

Les solvants (méthanol, Chloroforme, hexane, acétone et acide acétique) utilisés pour la préparation des huiles polaires et apolaires sont de grade analytique, de la firme Sigma et Fluka. Les sels utilisés pour la préparation des tampons ainsi que l'élastase porcine pancréatique, le substrat Suc-Ala₃-pNA et l' α -1 antitrypsine sont en suite de Sigma.

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction de l'huile totale de *Nigella sativa*

L'extraction de l'huile totale a été réalisée selon le protocole de Ramadan et Mörsel (2003) avec des modifications; l'utilisation du méthanol pur au lieu de l'hexane ou le chloroforme/méthanol lors de l'extraction à chaud.

II.2.1.1. Obtention de l'extrait méthanolique par soxhlet

Les graines de *Nigella sativa* préalablement nettoyées sont broyées pour donner une poudre. La poudre obtenue, est soumise à une extraction par *soxhlet* (extraction à chaud), en utilisant le méthanol comme solvant. Pour procéder à l'extraction, des cartouches de 40 g de poudre de la graine de NS ont été utilisées, 200 ml du méthanol est ajouté (1/5 : p/v), puis la poudre est soumise à une extraction à chaud pendant 8 heures.

Le méthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite à 40°C en utilisant un rotavapeur (BÜCHI). Cette opération permet ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait méthanolique.

II.2.1.2. Extraction de l'huile totale à froid

L'extrait méthanolique a été mélangé dans une ampoule à décompter avec l'hexane (50 ml). Après agitation, deux phases ont été obtenues; (i) une phase aqueuse plus dense qui apparaît au-dessous, (ii) une phase organique, contenant les lipides.

La phase organique supérieure a été récupérée. Cette étape a été répétée plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devient transparent. L'hexane a été par la suite évaporé à 30°C, l'extrait résultant est considéré comme étant l'huile totale des graines de *Nigella sativa* caractérisée par une couleur verdâtre.

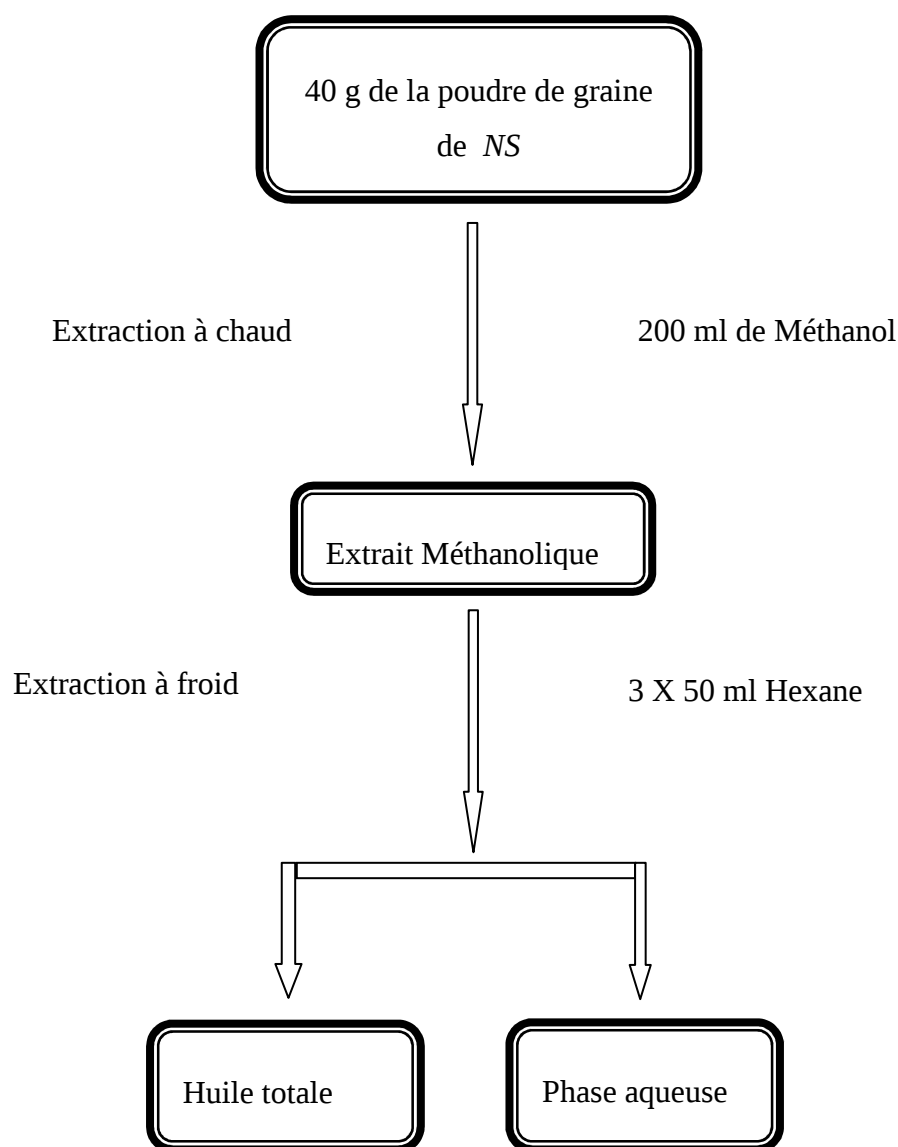


Figure 12 : Etapes de l'extraction de l'huile totale à partir des graines de *Nigella sativa*.

II.2.1.2.1. Fractionnement des huiles fixes

Le fractionnement de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* a été réalisé par chromatographie sur colonne (CC). La colonne utilisée est de 30 cm de hauteur et de 30 mm de diamètre. La phase stationnaire est le gel de silice (60G, 70-230 Mesh, Merck). L'élution des différentes fractions a été faite dans un ordre croissant de polarité grâce à la phase mobile constituée de : 100% chloroforme suivie par 50% chloroforme – 50 % Acétone. Alors que les

fractions polaires sont éluées par le méthanol, la dernière fraction est éluée par l'ajout de 2ml de l'acide acétique.

L'huile totale et toutes les autres fractions sont vaporisées dans une chambre de température à 40° C puis conservés à - 20°C jusqu'à leurs utilisations.

II.2.1.3. Calcule du rendement

Le rendement de l'extraction de l'huile totale est exprimé en pourcentage par rapport au poids des graines et calculé selon la formule suivante:

a) Le Rendement pour l'huile totale :

$$\text{Rendement} = (\text{poids de l'huile} / \text{poids des graines}) \times 100$$

b) Le Rendement des fractions :

$$\text{Rendement} = (\text{poids de la fraction} / \text{poids de l'huile totale}) \times 100$$

II.2.2. Composition en acides gras des huiles de *Nigella sativa*

Des analyses de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS) ont été réalisées au centre de recherche et d'analyse physico-chimique (CRAPC) Bab Ezzouar (Alger).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de différents composés et d'acides gras à partir de la surface totale des pics du chromatogramme par le logiciel de l'appareil.

II.2.2.1. Préparation de la solution à injecter (esters méthyliques)

La méthode appliquée est celle de Morrisson et Smith., (1964). Sur les extraits lipidiques secs, on ajoute 1 ml de BF₃ (Trifluorure de bore dans le méthanol à 14 %). Le mélange est transméthylé à 100 °C pour éliminer les lipides non polaires. Les esters méthyliques sont alors extraits 2 fois par l'hexane en présence d'eau, puis évaporés à sec. Les esters méthyliques d'Acides Gras sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les composés des extraits sont analysés en utilisant un chromatographe en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à impact d'électrons (HP/MSD Agilent 5890) opérant dans le mode scan (m/z =25-2000). Les échantillons sont

injectés (température d'injection 250°C) dans une colonne capillaire HP-5MS (longueur: 30 m, diamètre interne: 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25µm) élué par de l'hélium à 0,3 ml/min avec un rapport Split de 1/10. La température de la colonne est programmée à 50°C pendant 2 min, ensuite la température est portée à 240°C avec un gradient de 4°C/min. La séquence s'achève après 40 min à 240°C. L'analyse est effectuée sous une énergie d'ionisation de 70 eV (température du filament : 150°C, courant : 600 mA, Potentiel PM : 600 V). L'identification est faite par comparaison des spectres de masse avec la banque de données fournies par le logiciel Chemstation (NIST 2002 et Wiley version 7.0).

II.2.3. Etude cinétique de l'activité enzymatique de l'élastase

La cinétique enzymatique de l'élastase a été étudiée spectrophotométriquement, en suivant la quantité de p-nitroanilide (pNA) produite par l'hydrolyse de concentrations croissantes (0,25 - 1,5 mM) du Suc-Ala₃-pNA dissoutes dans un tampon (Tris-HCl, 0.1 M, pH 8, contenant 0.1 M de NaCl), la réaction est initiée par l'ajout de 100 µl d'élastase (solution mère de 250 nM) dans un volume réactionnel final de 500 µl et la variation de l'absorbance a été suivie à 405 nm dans un spectrophotomètre UV-Visible 8500 pendant au moins cinq minutes. Les vitesses initiales d'hydrolyse en UI (µmôle/min) ont été calculées à partir du coefficient d'extinction moléculaire ($\epsilon_{405\text{nm}} = 8800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Une transformation double inverse de Lineweaver-Burk a été effectuée afin de déterminer les paramètres cinétiques graphiquement (K_M et V_{max}).

II.2.4. Inhibition de l'activité élastase par les huiles de *Nigella sativa*

L'effet inhibiteur des huiles de *Nigella sativa* sur l'activité d'élastase a été étudié spectrophotométriquement en suivant la quantité de p-nitro-anilide (pNA) produite par l'hydrolyse de Suc-Ala₃-pNA dissoutes dans un tampon (Tris-HCl, 0.1M, pH 8, contenant 0.1 M de NaCl), en présence de concentrations croissantes de chaque fraction des huiles de NS (préparées dans le tampon de Tris-HCl, 0.1M, pH 8, contenant 0.1 M de NaCl, 0.05% Triton-X100, 1% DMSO). Les concentrations croissantes des huiles polaires et apolaires et de l'huile totale ont été incubées avec 50 µl de l'élastase (solution mère de 200 nM) dans un volume réactionnelle de 200 µl, pendant 20 min à 25°C. La réaction est initiée par l'ajout de 0,9 mM de substrat, L'absorbance a été enregistrée à 405 nm après une deuxième incubation

dans les conditions précédentes (Moroy *et al.*, 2011), l' α -1 antitrypsine est utilisée comme contrôle positif.

L'activité inhibitrice des huiles de NS a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi: $I \% = [1 - (B / A)] \times 100$

A: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

B: absorbance en présence de l'inhibiteur.

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique (IC_{50}) de chaque fraction a été calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur ($Y = a X + b$). Elle a été exprimée en $\mu g / ml$ et comparée avec celle de l' α -1antitrypsine; $IC_{50} = (50 - b) / a$.

II.2.5. Test d'activité de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaire (LBA)

Après la collection des échantillons des LBA des 24 patients atteints du MPOC à partir de différents centres hospitalo-universitaires du pays. Le test d'activité protéasique de l'élastase dans les LBA ($n = 24$) a été effectué selon le protocole de Duvoix et collaborateurs (2011). En utilisant la Succ-Ala₃-pNA comme substrat. Les LBA, dilués dix fois dans le tampon Tris-HCl 0.1M, pH 7,5, contenant 0.5 M de NaCl, 0.05 % Triton- X100, incubés en présence de 1 mM du substrat dans un volume final de 200 μl de 96 puits de la microplaque. L'absorbance a été enregistrée à 405 nm pendant les temps $t_1 = 1h$ et $t_2 = 1,30h$.

Une gamme de concentrations croissantes d'élastase pure (10-50 nM) a été incubée avec le substrat afin d'obtenir la droite d'étalonnage d'élastase.

II.2.5. 1. Détermination de l'activité élastase dans les LBA

Le nombre d'unité d'élastase par millilitre de LBA a été calculée par la suite en utilisant la relation suivante:

$$UI / ml \text{ d'enzyme} = (d \text{ Abs} \times V_F \times FD) / \epsilon_{405} (pNA) \times V_{LBA} \times dt$$

d Abs : différence de l'absorbance entre t_2 et t_1 .

V_F : le volume final de la réaction.

FD : Facteur de dilution des LBA.

$\epsilon_{405(pNA)}$: Coefficient d'extinction molaire de pNA à 405 nm.

V_{LBA} : volume du LBA dans chaque essai.

dt : $t_2 - t_1$

II.2.5.2. Détermination de la concentration d'enzyme dans les LBA

La concentration d'élastase dans les LBA a été déterminée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'élastase.

($Y = aX + b$). Elle a été exprimée en nM, calculé ainsi : $X = (Y - b) / a$.

Les LBA des sujets atteints du MPOC ont été répartis en pourcentage selon la concentration d'élastase en nM et l'activité de l'élastase en UI par millilitre du LBA.

II.2.6. Inhibition de l'activité élastase dans les LBA par l'huile totale de *Nigella sativa*

L'effet inhibiteur des huiles de NS sur l'activité d'élastase a été étudié spectrophotométriquement en suivant la quantité de p-nitro-anilide (pNA) produite par l'hydrolyse de Suc-Ala₃-PNA dissoute dans le tampon Tris-HCl, 0.1M, pH 7,5, contenant 0.5 M de NaCl, 0.05% de Triton X-100), en présence de concentrations croissantes, de chaque fraction de l'huile de NS (préparées dans le tampon de Tris-HCl, 0.1M, pH 7,5, contenant 0.5 M de NaCl, 0.05% Triton-X100, 1% DMSO. les concentrations croissantes des huiles polaires et apolaires et de l'huile totale ont été incubées en présence de 25 µl des LBA dans le tampon Tris HCl (15 à 2000 µg/ml) pendant 2 h à 37°C. Après l'incubation, 1 mM de substrat a été ajouté et l'absorbance est enregistrée à 405 nm après une deuxième incubation dans les mêmes conditions que la première incubation.

L'activité inhibitrice des huiles de NS a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) ($I \% = [1 - (B / A)] \times 100$).

II.3. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne $\pm$ SD (déviation standard), et en moyenne $\pm$ SEM (erreur standard de la moyenne) ($n=3$). Les résultats ont été analysés par le test d'ANOVA univarié (one-way ANOVA) suivie du test de Tukey pour la comparaison des résultats en présence des extraits avec les contrôles négatifs (en absence des extraits), et la comparaison des différents extraits entre eux. La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est < 0.05 .

Chapitre III

Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion

III.1. Extraction de l'huile totale de *Nigella sativa*

L'extraction de l'huile totale à partir des graines de *Nigella sativa* a été effectuée selon la méthode de Ramadan et Mörsel (2003) avec quelques modifications. Cette extraction a été effectuée en trois grandes étapes, la première est une extraction à chaud par le méthanol pur pour obtenir l'extrait méthanolique. La deuxième étape est une extraction à froid par l'utilisation de l'hexane pour obtenir l'huile totale. La troisième étape est un fractionnement par chromatographie sur colonne (CC) a été réalisée par une série des solvants dont la polarité est croissante (chloroforme, un mélange chloroforme/ acétone (1 /1 : V/V), méthanol puis méthanol avec quelques gouttes d'acide acétique) permettant ainsi de séparer les composés de l'huile totale selon le degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de polarité. Neuf fractions ont été obtenues, huile totale, cinq fractions apolaires (trois éluées par le chloroforme et deux éluées par le chloroforme/acétone (50 % : V/V) et trois fractions polaires (deux éluées par le méthanol et la troisième fraction éluées par l'ajout de quelque gouttes d'acide acétique au méthanol). La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque fraction par rapport à l'huile totale sont représentés dans le tableau VII.

Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions obtenues à partir de l'huile totale des graines de NS, qui représente $29,21 \pm 2,012$ % du poids total des graines, la fraction apolaire F1 représente le rendement le plus élevé (49.17%), suivi par la fraction apolaire F2 (39.76 %), les fractions polaires F7 (4.69 %), F8 (1.82 %), la fraction apolaire F4 (1.43 %), la fraction polaire F6 (1.32 %), les fractions apolaires F3 (1.14 %) et F5 (0.62 %). De ce fait, les fractions apolaires combinées représentent le rendement le plus élevé (92.12 %), alors que les fractions polaires représentent 7.83 % du poids total de l'huile totale de NS.

Le rendement de l'huile totale des graines de NS dans cette étude est inférieur à 39.2 % et 37,9 % rapporté par Ramadan et Mörsel (2003). Ces auteurs étaient utilisés la même technique d'extraction mais les solvants d'extraction à chaud étaient le chloroforme/ méthanol (2/1 : V/V) et l'hexane, respectivement. Sachant que, dans le présent travail le solvant utilisé est le méthanol pur qui est plus polaire que les solvants utilisés par Ramadan et Mörsel ce qui peut être explique le rendement de cette étude.

Tableau VII : Aspect, couleur et rendement des diverses fractions polaires et apolaires extraites à partir des graines de NS en pourcentage par rapport au poids total de l'huile totale.

<i>fractions</i>		<i>Couleur</i>	<i>Aspect</i>	<i>Rendement</i>
<i>Fractions apolaires</i>	F 1	Vert foncé	Huileux	49.17%
	F2	Vert claire	Huileux	39.76%
	F3	Jaune	Huileux	1.14%
	F4	Vert	Pâteux	1.43%
	F5	Marron foncé	Pâteux	0.62%
<i>Fractions polaires</i>	F6	Marron	Pâteux	1.32%
	F7	Marron jaunâtre	Pâteux	4.69%
	F8	Brune foncé	Pâteux	1.82%

En comparant nos résultats à ceux rapportés par Ramadan et Mörsel. On souligne que notre rendement en fractions apolaires (92,12 %) est légèrement inférieur aux rendements de 97.2 % et 96.1 % rapportés. Cette variation est probablement due au solvant utilisé. Par contre le rendement en fractions polaires (7,83 %) dans cette étude est supérieur aux rendements rapportés (3.64 % et 2.5 %). Ceci est due à l'utilisation du méthanol, lors de l'extraction à chaud qui est plus polaire que le chloroforme/méthanol et l'hexane utilisés par Ramadan et Mörsel (2003).

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques des graines, à

l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et également aux méthodes d'extraction appliquées.

III.2. Composition en acides gras des huiles de *Nigella sativa* par GC/MS

La composition en acides gras des huiles de *Nigella sativa* est obtenue après méthylation, analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS). Les profils chromatographiques des acides gras de l'huile totale est présenté à la figure 13 et les Composés identifiés dans l'huile totale des graines de NS par GC/MS sont présentés au niveau du tableau VIII.

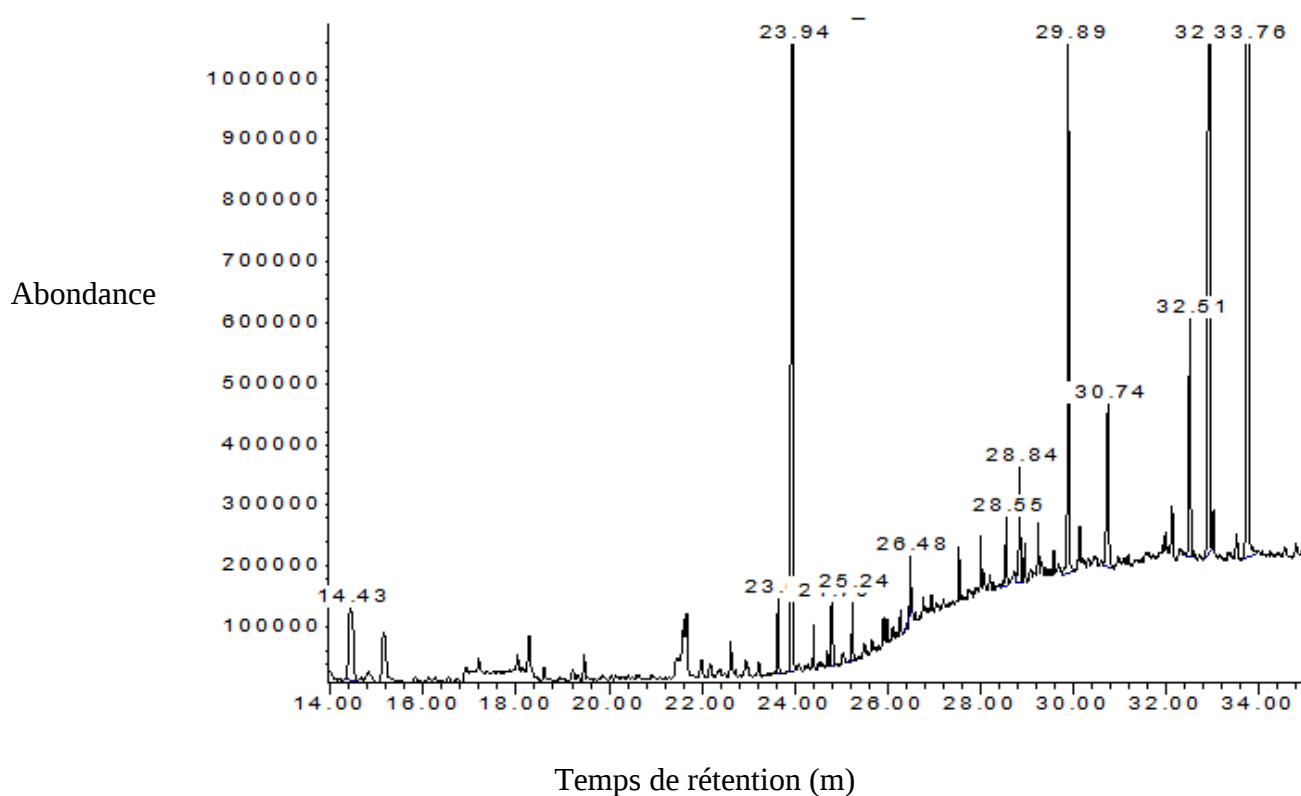


Figure 13: Chromatogramme des composés et des acides gras de l'huile de *Nigella sativa* déterminé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

Tableau VIII: Composés identifiés dans l'huile totale des graines de NS par GC/MS.

Temps de rétention	Composants	Teneur (%)
terpenoides hydrocarbonés		
14,44	o-cymène	3,50
15, 15	Gamma-terpinène	1,04
15,82	p-cymène	0,19
16,54	m-cymène	0,19
19,32	Alpha.-Longipinène	0,16
21,67	(+)-Longifolène	1,59
22,95	Squalène	0,53
Non terpenoides hydrocarbonés		
16,25	Cumène	0,12
16,92	1-éthyl-3,5-diméthyl-Benzène	0,51
18,59	Préhnitol	0,38
22,62	(E) 5-Octadécène	0,75
23,64	Heptadécane	1,04
23,94	Non identifiée	26,21
30,74	Sandaracopimaradiène	3,28
Acides Gras		
29,89	Acide palmitique	8,81
32,51	Acide stéarique	4,09
32,90	Acide oléique	22,58
33,72	Acide linoléique	25,03

Les résultats obtenus montrent que l'huile totale des graines de *Nigella sativa* est très riche en acides gras insaturés (47,61 % de l'huile totale). En comparant nos résultats à ceux rapportés par Ramadan et Mörsel (2003). On souligne que notre teneur en acide oléique (22,58%) est légèrement inférieure à 24.1 et 23.9 %, et en acide linoléique (25,03 %) est inférieure à 57.3 l % et 57.0 l % rapportés. Alors que la teneur en acide stéarique (4,09 %) est supérieure à 3.16 % et 3.22 %, et en acide palmitique (8,81%) est inférieure à 13.0 l % et 13.1 % rapportés, de ce fait les acides gras saturés représentent 12,9 % de l'huile totale. Cette

variation est probablement due au solvant utilisé et semble être lié aux propriétés génétiques des graines et à l'origine géographique.

Les autres composés identifiés font partis de l'huile essentielle (Longifolène, O-cymène, Gamma-terpinène et p-cymène).

III.3. Etude cinétique de l'activité enzymatique de l'élastase

L'étude cinétique de l'activité enzymatique de l'élastase a été étudiée spectrophotométriquement, en suivant la quantité de p-nitro-anilide (pNA) produite lors de l'hydrolyse de Succ-Ala₃-pNA. La lecture des absorbances a été effectuée à 405 nm pendant au moins 5 min, les vitesses initiales ont été calculées et exprimées en UI.

III.3.1. Détermination graphique des paramètres cinétiques

Il existe plusieurs modèles mathématiques permettant la détermination de ces paramètres, mais la plus utilisée est celle de LINEWEAVER - BURK. C'est la méthode des doubles inverses (Figure 14). Le calcul des paramètres cinétiques K_M (Constante de Michaëlis et Menten), et V_{max} (Vitesse maximale) a été effectué à partir de l'équation suivante :

$$Y = aX + b. \text{ Où } b \text{ représente } 1/V_{max} \text{ et } a \text{ représente } K_M/V_{max}.$$

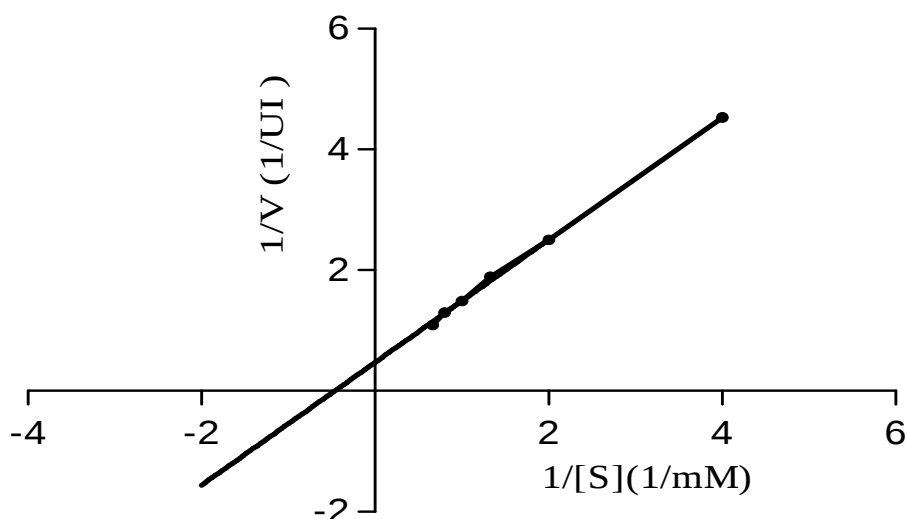


Figure 14: La représentation de la cinétique enzymatique de l'élastase (Lineweaver-Burk). Chaque point représente la moyenne de trois déterminations.

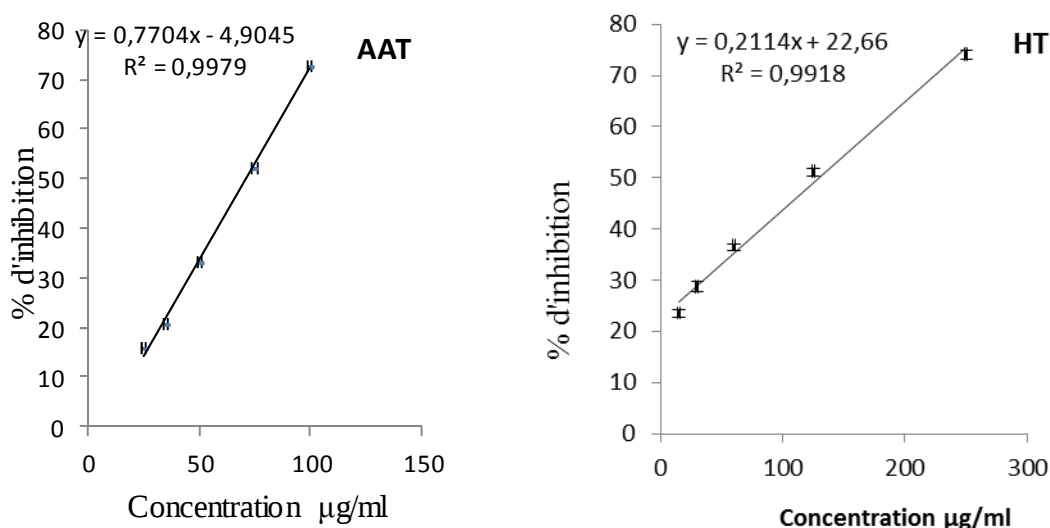
K_M de 1,9 mM qui est définie comme étant l'inverse de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis le

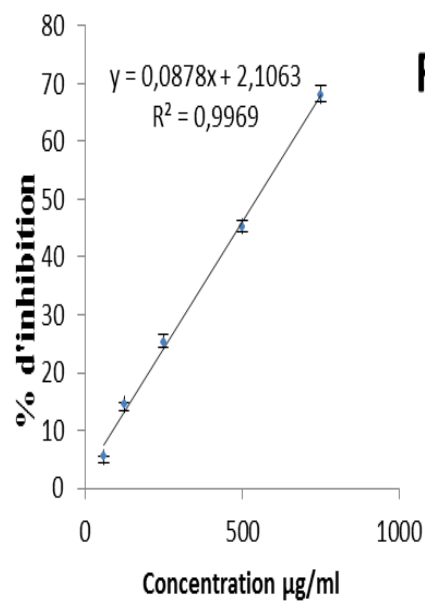
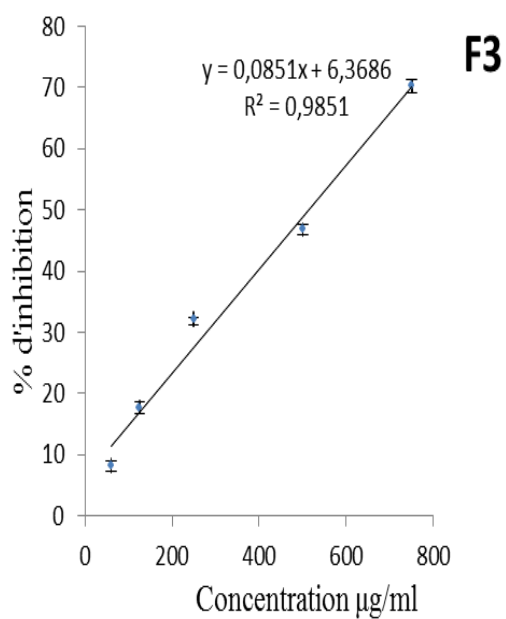
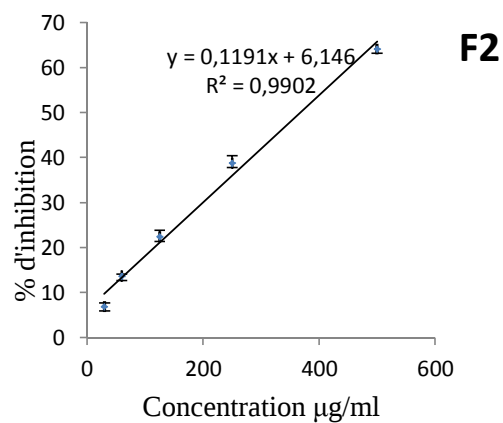
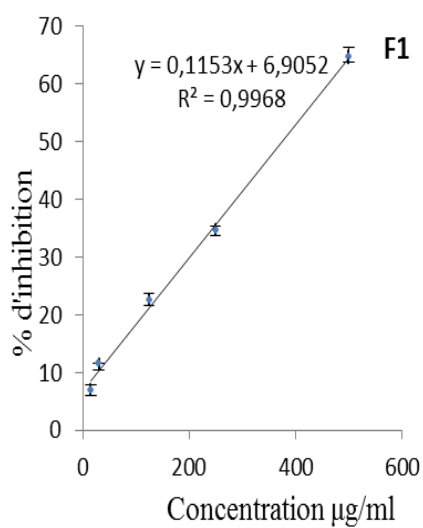
substrat. L'activité spécifique calculée est de 3,96 $\mu\text{môle/ min/ mg}$ d'enzyme, très proche à celle de l'enzyme commerciale qui est de 4,3 unité /mg d'enzyme où l'unité est définie comme étant la quantité d'enzyme qui hydrolyse un $\mu\text{môle}$ de substrat par minute. Le K_M obtenu est plus élevé que celui de 1 mM rapporté par LA Barre et collaborateurs en 1996.

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, puisque ces paramètres cinétiques varient selon l'origine d'enzyme utilisée (pancréatique, leucocytaire, humain ou porcine), le substrat utilisé et selon les propriétés de l'enzyme (degré de pureté et nombre d'unité par milligramme d'enzyme). Par exemple ; l'utilisation de l'élastase pancréatique humain avec le glutaryl-Ala₂-Pro-Leu-pnitroanilide a permis d'obtenir un K_M de 1,3 mM (Faller *et al.*, 1990) alors que l'élastase utilisé dans le présent travail est une élastase pancréatique porcine.

III.4. Inhibition de l'activité élastase par les huiles de *Nigella sativa*

L'effet inhibiteur des huiles polaires, apolaires, l'huile totale des graines de NS et α 1-antitrypsine sur l'activité protéasique de l'élastase a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la quantité de para nitro-anilide (pNA) produite par l'hydrolyse de Suc-Ala₃-pNA à 405 nm. Les résultats obtenus montrent que toutes les fractions exercent un effet inhibiteur significatif sur l'activité protéasique de l'élastase d'une manière dose-dépendante (Figure 15).





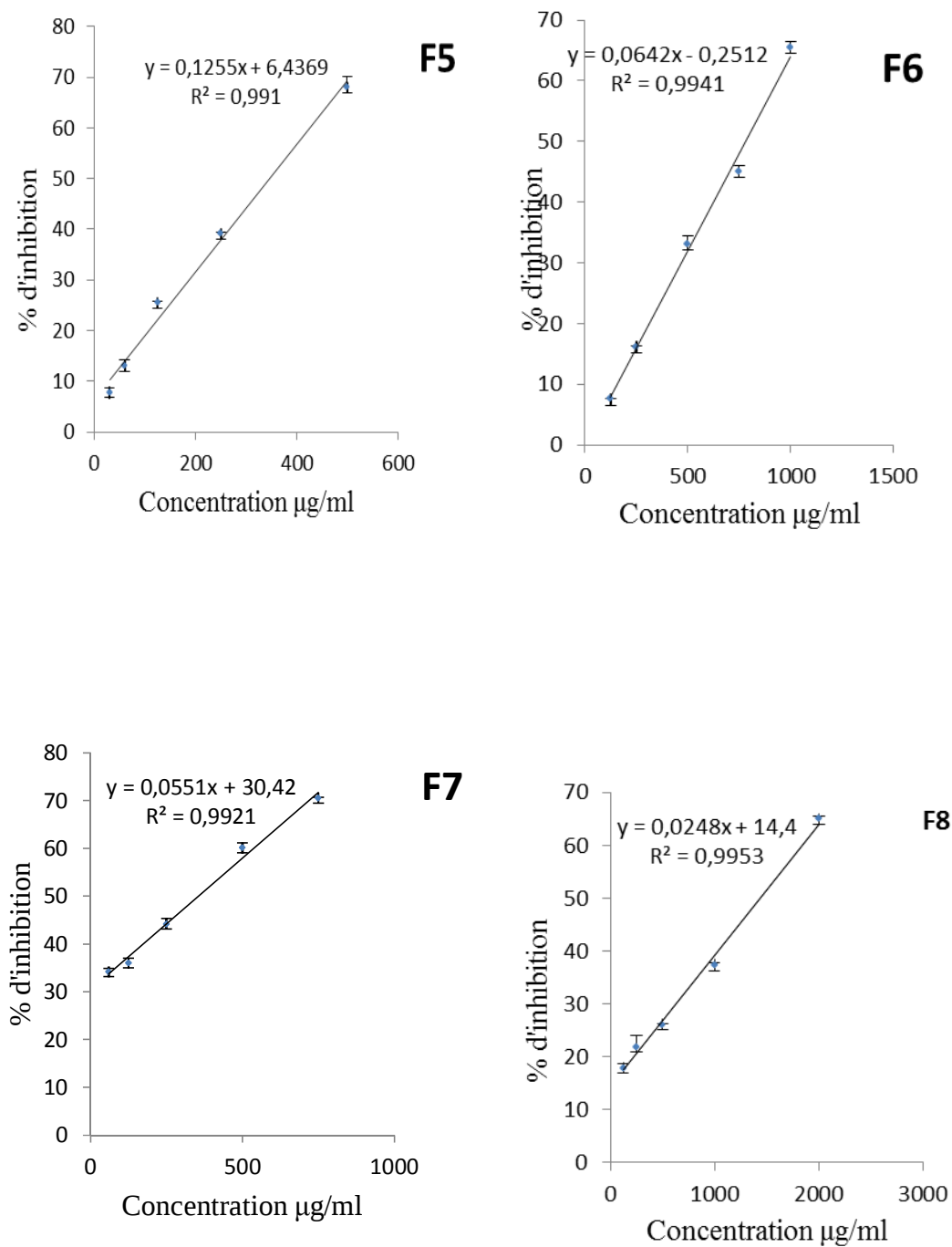


Figure 15: Effet inhibiteur des huiles totales, polaires, apolaires de NS et $\alpha 1$ - antitrypsine (AAT) sur l'activité de l'élastase. Chaque point représente la moyenne de trois déterminations.

Les valeurs des IC_{50} des fractions polaires et apolaires, de l'huile totale et de l'inhibiteur spécifique de l'élastase (AAT) montrent que l'huile totale présente l'effet inhibiteur le plus puissant ($p < 0.001$), avec une IC_{50} de $129,29 \pm 1,40 \mu\text{g / ml}$, suivi par la fraction apolaire F5 ($IC_{50} = 347,15 \pm 6,74$), fraction polaire F7 ($IC_{50} = 355,32 \pm 4,54$), fraction apolaire F2 ($IC_{50} = 363,02 \pm 0,35$), la fraction apolaire F1 ($IC_{50} = 375,85 \pm 2,96$), la fraction apolaire F3 ($IC_{50} = 512,46 \pm 5,1$), la fraction apolaire F4 ($IC_{50} = 542,9 \pm 3,64$), la fraction polaire F6 ($IC_{50} = 784,28 \pm 2,2$) et la fraction polaire F8 ($IC_{50} = 1438 \pm 4,40$) $\mu\text{g / ml}$. Toutes les fractions présentent des IC_{50} supérieures de 1 à 20 fois, à l' IC_{50} de $\alpha 1$ -antitrypsine ($IC_{50} = 70,88 \pm 0,56$) $\mu\text{g / ml}$ (Tableau IX). Les diverses fractions polaires et apolaires inhibent l'activité de l'enzyme élastase d'une manière significative ($p < 0.001$) et dose-dépendante (Figure 16 et 17).

Tableau IX : Les IC_{50} des huiles polaires et apolaires des graines de NS sur l'activité de l'élastase.

Echantillons	AAT	HT	F1
$IC_{50} (\mu\text{g / ml})$	$70,88 \pm 0,56$	$129,29 \pm 1,40$	$375,85 \pm 2,96$
Echantillons	F2	F3	F4
$IC_{50} (\mu\text{g / ml})$	$363,02 \pm 0,35$	$512,46 \pm 5,19$	$542,9 \pm 3,64$
Echantillons	F5	F6	F7
$IC_{50} (\mu\text{g / ml})$	$347,15 \pm 6,7$	$784,28 \pm 2,2$	$355,32 \pm 4,5$
Echantillons	F8		
$IC_{50} (\mu\text{g / ml})$	$1435 \pm 4,4$		

Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD ($n = 3$).

Les résultats obtenus montrent que l'huile totale inhibe l'élastase presque 2 fois moins que l'AAT. Les fractions apolaires F1, F2, F5 et la fraction F7 sont 5 fois plus faible. Par contre les fractions F3 et F4 sont presque 8 fois plus faible, alors que les fractions F6 et F8 sont presque 11 et 21 fois plus faible, respectivement. Ces résultats expliquent l'effet synergique des différentes fractions de l'huile vis-à-vis l'inhibition de l'activité protéasique de l'élastase.

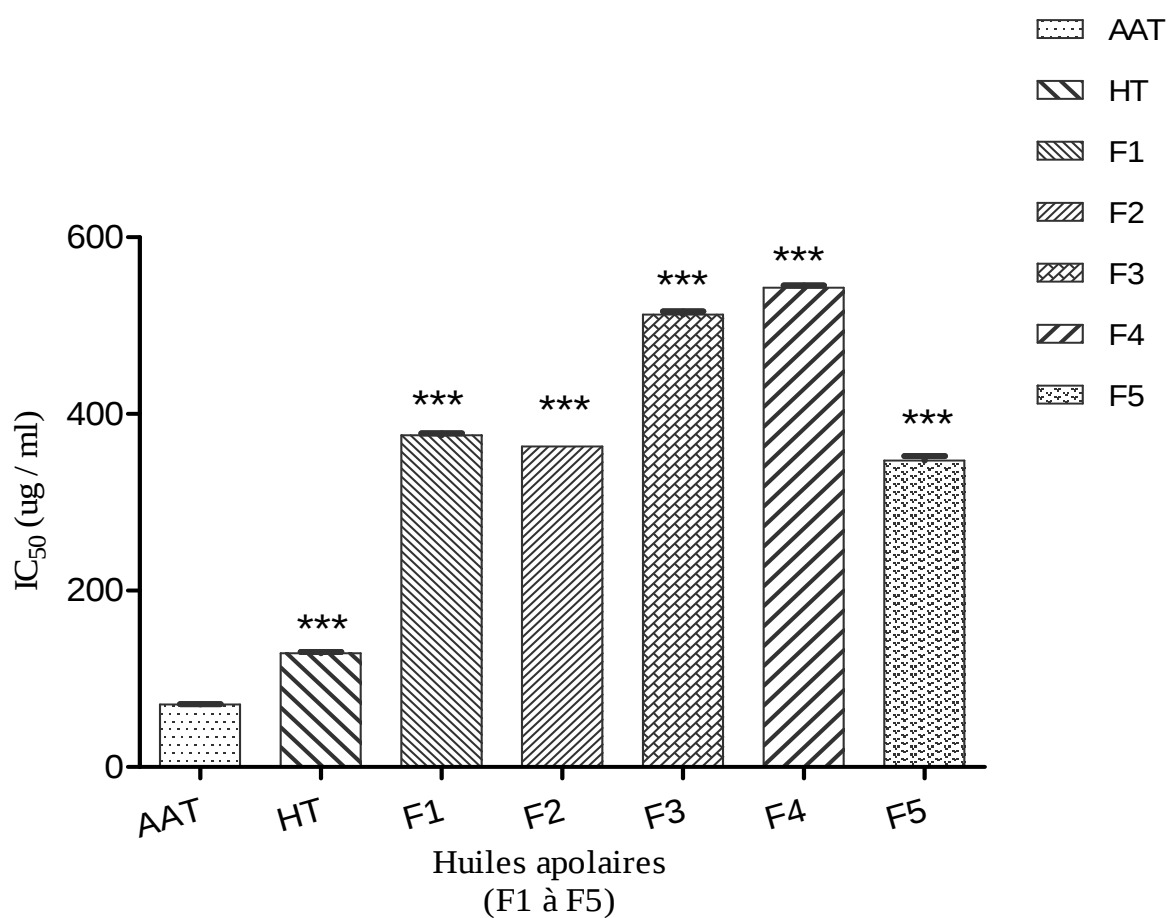


Figure 16: Les IC_{50} des fractions apolaires de l'huile de NS sur l'activité de l'élastase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD ($n = 3$). *** $p < 0.001$.

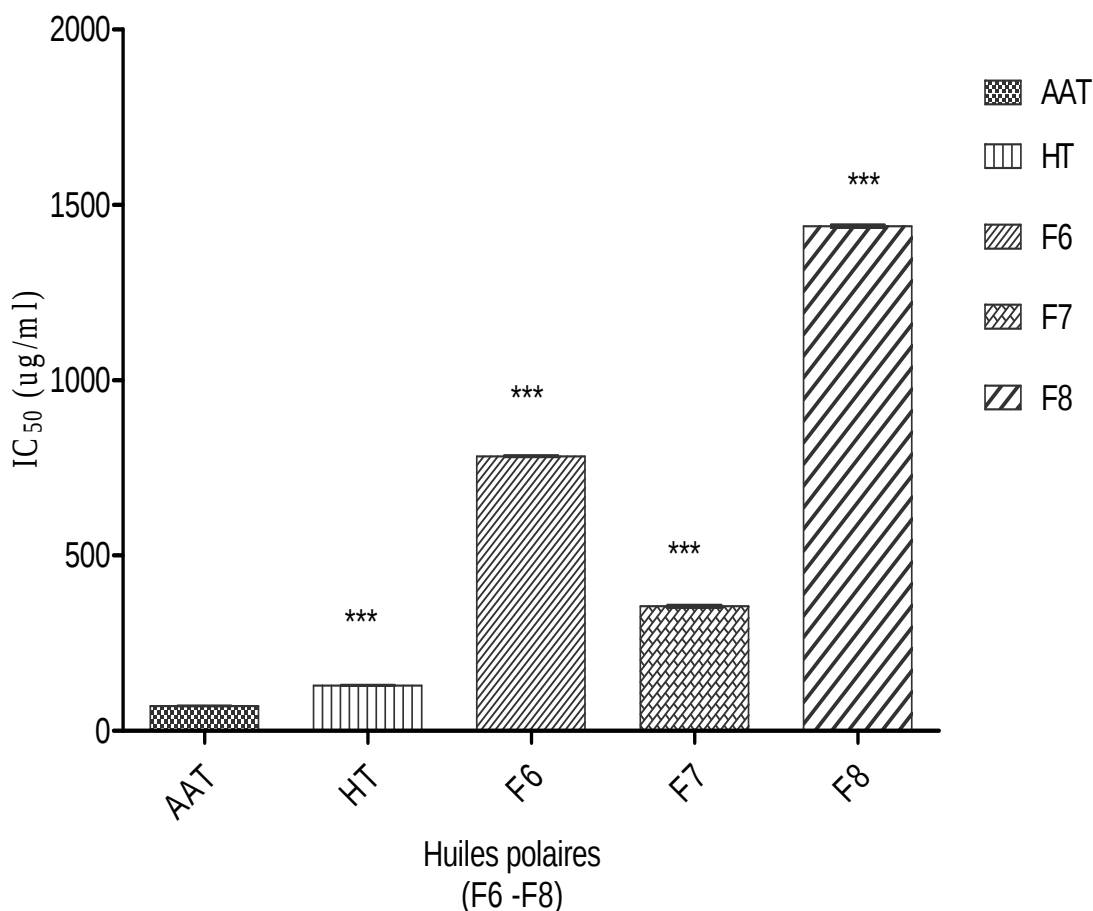


Figure 17: Les IC₅₀ des fractions polaires de l'huile de *NS* sur l'activité de l'élastase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD de trois représentations. *** $p < 0.001$.

L'inhibition de l'activité de l'élastase par les huiles de *Nigella sativa* est traduite par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant sur les sites actifs de l'enzyme. Récemment, Moroy et collaborateurs, 2011 ont évalués l'effet inhibiteur de l'acide oléique (composé majoritaire de l'huile totale de la nigelle) sur l'activité de l'élastase qui a un IC₅₀ de 3 - 16 μ M (Hornebeck *et al.*, 1985 ; Tyagi et Simon., 1990). Ont proposés le mécanisme d'inhibition suivant :

1. Le groupement carboxylique de l'acide oléique forme un pont en sel avec l'Arg²¹⁷ du site actif de l'élastase et cette liaison va empêcher l'interaction de l'enzyme avec son substrat.
2. La double liaison de l'acide oléique interagisse avec les acides aminés Phe¹⁹² et Val²¹⁶ du site S₃.
3. L'extrémité de la chaîne aliphatique occupe le site S₁ de l'enzyme.

L'huile totale de *Nigella sativa* ainsi que les différentes fractions polaires et apolaires exercent un effet inhibiteur sur l'activité de l'élastase grâce à leur richesse en acide gras insaturé particulièrement l'acide oléique qui représente 20-25 % de l'huile totale. La richesse de l'huile de *Nigella sativa* en acide gras insaturé (73 – 77 %) (Atta., 2003; Nickavar *et al.*, 2003; Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007) pourrait être à l'origine de l'effet inhibiteur le plus puissant sur l'activité de l'élastase (Moroy *et al.*, 2011).

III.5. Test d'activité de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaires

L'activité de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaire (LBA) a été évaluée spectrophotométriquement à 405 nm. Les résultats obtenus montrent que tous les échantillons provenant de sujets atteints des MPOC testés, présentent une activité de l'élastase. L'activité est quantifiée en forme du nombre d'unité d'enzyme par ml de LBA et quantifiée par la détermination de la concentration de l'élastase en nM.

III.5.1. Détermination de l'activité élastase dans les LBA

Les résultats du calcul du nombre d'unité d'élastase par millilitre de LBA a permis la répartition des LBA des sujets atteints du MPOC en deux catégories, la première catégorie à nombre d'unité d'élastase est inférieure à 0,01unité / ml d'enzyme et dont le pourcentage est de 41,67 % et la deuxième catégorie qui représente 58,33% possède plus de 0,01 unité / ml (Figure 18). Cette différence en nombre d'unité d'enzyme entre les différents sujets peut être rendus au stade de la maladie (léger, modéré ou sévère). La moyenne du nombre d'unité d'enzyme par millilitre du LBA est de $0,01486 \pm 0,0037$ unité/ml.

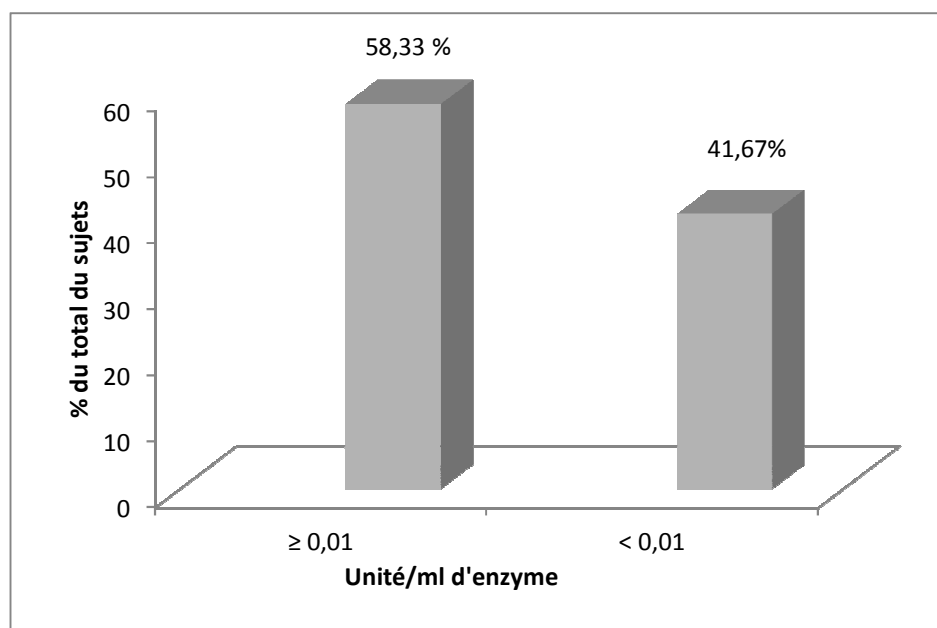


Figure 18 : Répartition des lavages broncho-alvéolaires des sujets atteints du MPOC selon l'activité élastase par ml. Chaque valeur représente la moyenne de trois déterminations.

III.5.2. Détermination de la concentration d'enzyme dans les LBA

Pour la détermination de la concentration d'élastase dans les LBA, la production de pNA par l'hydrolyse de 1mM de Succ-ala₃-pNA en présence de gamme de concentration d'élastase (10 - 50 nM) a été étudiée spectrophotométriquement à 405 nm (Figure 19). La concentration de l'élastase dans les LBA des différents sujets a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de l'élastase en utilisant l'équation $Y = aX + b$ et exprimée en nano molaire (nM). Les résultats obtenus permettent la répartition du total des sujets en trois catégories; 37,5% des sujets possèdent des concentrations inférieures à 20 nM, 16,67% possèdent 20-50 nM et 45,83 % possèdent plus de 50 nM (Figure 20). La Moyenne des concentrations d'élastase dans les LBA est de $39,19 \pm 19,54$ nM.

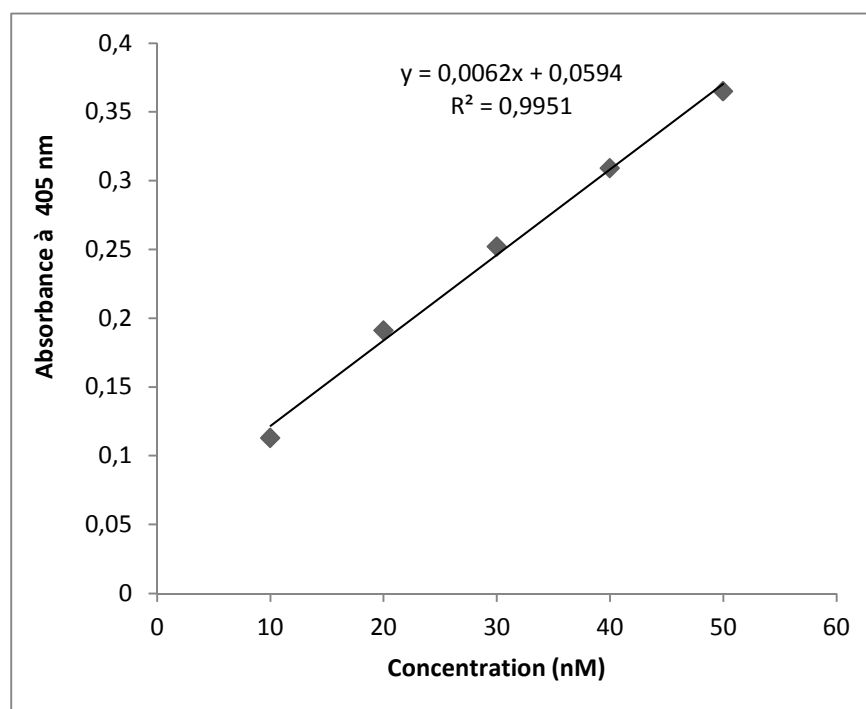


Figure 19: Courbe d'étalonnage de l'élastase. Chaque point représente la moyenne de trois déterminations.

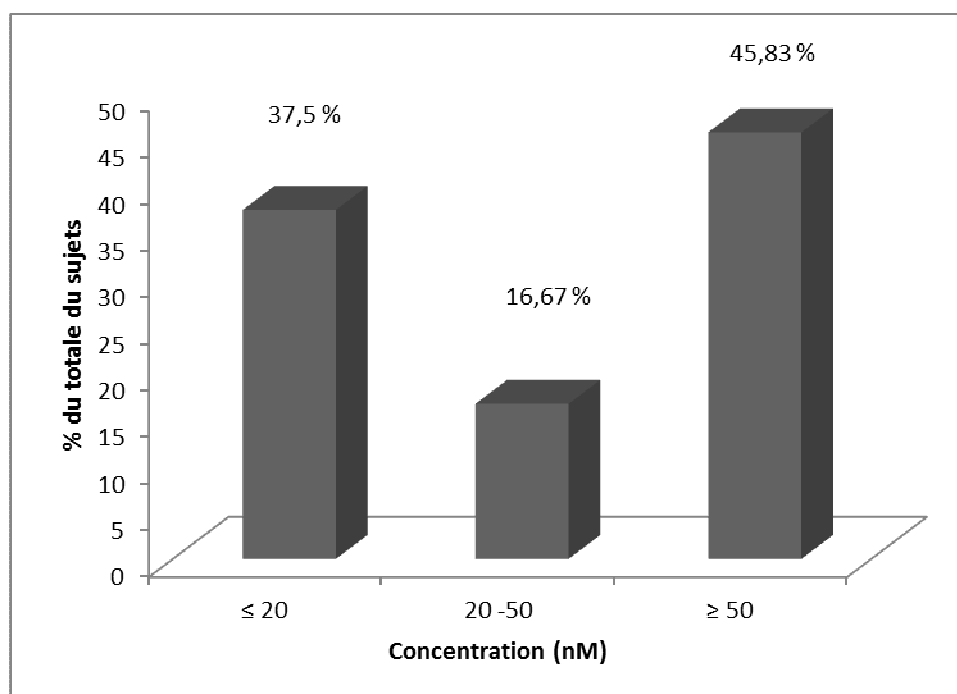


Figure 20: Répartition des lavages broncho-alvéolaires des sujets atteints du MPOC selon la concentration en élastase. Chaque valeur représente la moyenne de trois déterminations.

Les résultats obtenus soulignent la détection de l'activité élastasique et de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaires des patients atteints des MPOC. Dans la littérature plusieurs travaux confirment la présence de l'élastase et de l'activité élastasique dans les LBA. En 1986, Damiano et collaborateurs ont démontrés qu'il existe certainement une augmentation des polynucléaires neutrophiles associée à une augmentation de l'activité élastasique des neutrophiles dans le LBA chez les fumeurs et l'élastase neutrophile fut détectée dans le poumon emphysémateux humain. La destruction des espaces aériens chez les fumeurs est corrélée de façon négative avec le nombre de polynucléaires neutrophiles tandis qu'elle est corrélée positivement avec le nombre de macrophages alvéolaires (Finkelstein *et al.*, 1995) qui est très élevé chez les fumeurs. En outre, Les macrophages alvéolaires ont la capacité de dégrader les fibres élastiques (Senior *et al.*, 1989) sous l'action des métalloprotéases à activité élastolytique qu'ils sécrètent (élastase macrophagique (MMP-12), cathepsine L et S).

III.6. Inhibition de l'activité élastase dans les LBA par l'huile totale de *Nigella sativa*

L'effet inhibiteur de l'huile totale de *Nigella sativa* sur l'activité de l'élastase dans les LBA a été évaluée spectrophotométriquement à 405 nm. Les résultats obtenus montrent qu'elle inhibe l'activité de l'élastase, d'une manière dose-dépendante. L'effet inhibiteur des huiles polaires et apolaires n'a pas été étudié puisqu'ils ont un effet inhibiteur moindre par rapport de celui de l'huile totale d'une part et par l'effet synergique d'autre part.

L'IC₅₀ de l'activité enzymatique de l'élastase dans les LBA de cinq sujets atteints de MPOC de l'huile totale de NS varient de 100 à 108 µg/ml ce qui signifie qu'il n'y a pas de différence dans l'inhibition de l'élastase dans les LBA. La moyenne des IC₅₀ pour les cinq lavages est de 104,69 ± 3,583 µg/ml (Tableau X, Figure 21), deux fois plus que l'IC₅₀ pour l'α1 antitrypsine (51,41 ± 2,12 ug/ml) (Tableau XI, Figure 22).

Tableau X : Les IC₅₀ de l'huile totale de *Nigella sativa* sur l'activité de l'élastase dans les LBA de cinq sujets atteints de MPOC.

Echantillons	S1	S2	S3
IC ₅₀ (µg / ml)	100,15 ± 4,24	102,08 ± 0,88	108,35± 0,27

Echantillons	S4	S5
IC ₅₀ (µg / ml)	104,94 ± 2,29	107,93 ± 3,18

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

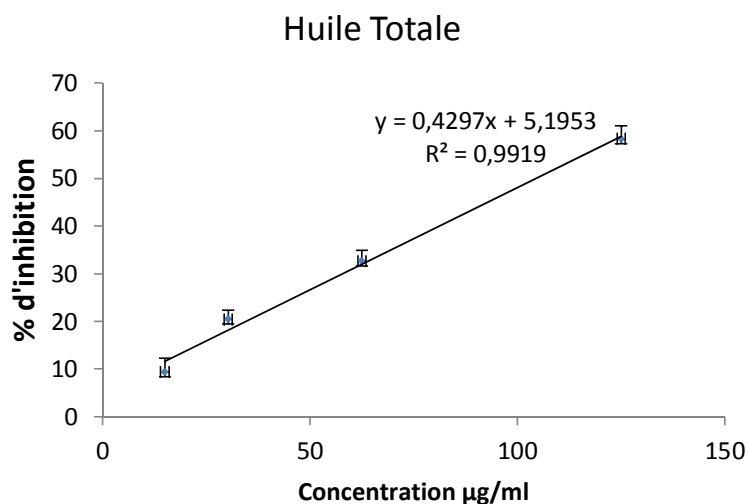


Figure 21: Effet inhibiteur de l'huile totale de *Nigella sativa* sur l'activité de l'élastase dans les Lavages broncho-alvéolaires de cinq sujets atteints de MPOC. Chaque point représente la moyenne des trois déterminations dans les cinq LBA.

Tableau XI: Les IC_{50} de l' $\alpha 1$ antitrypsine sur l'activité de l'élastase dans les LBA de cinq sujets atteints de MPOC.

Echantillons	S1	S2	S3
IC_{50} ($\mu g / ml$)	51,21 $\pm$ 0,69	52,26 $\pm$ 2,68	48,27 $\pm$ 0,89
Echantillons	S4	S5	
IC_{50} ($\mu g / ml$)	51,14 $\pm$ 2,32	54,12 $\pm$ 1,89	

Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3).

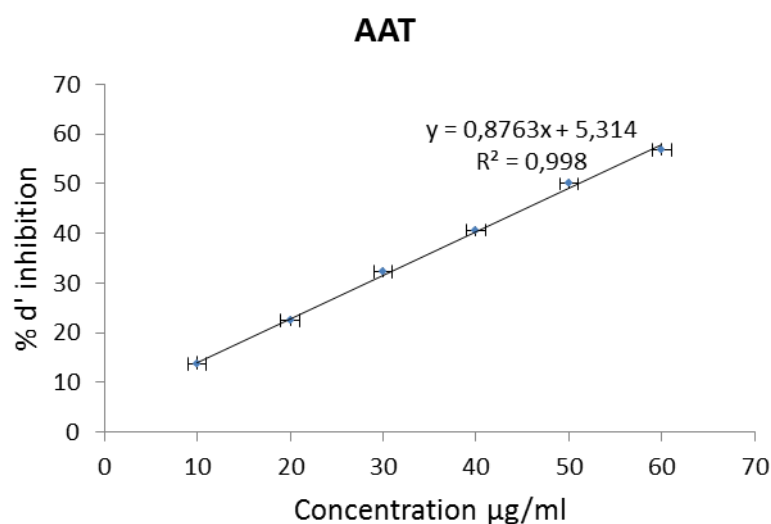


Figure 22: Effet inhibiteur de l' $\alpha 1$ antitrypsine sur l'activité de l'élastase dans les Lavages broncho-alvéolaires de cinq sujets atteints de MPOC. Chaque point représente la moyenne de trois déterminations dans les cinq LBA.

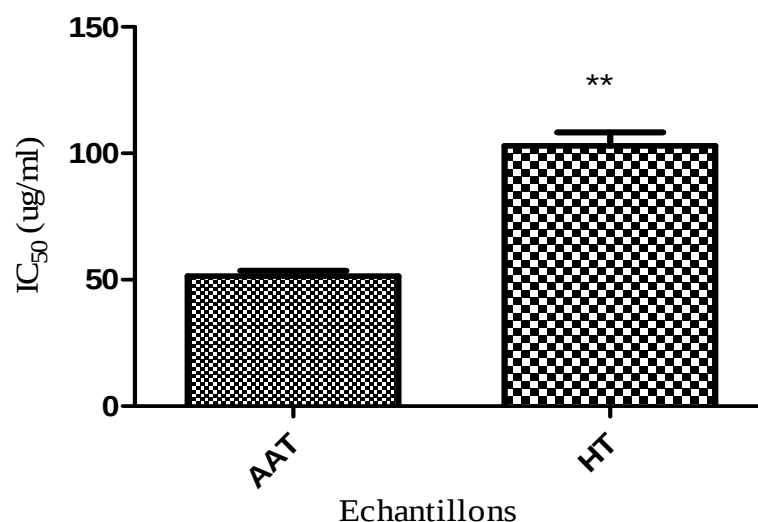


Figure 23: L'IC₅₀ de l'huile totale de NS sur l'activité de l'élastase dans les LBA. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3). ** p < 0.05.

Les résultats obtenus montrent que l'huile totale de la nigelle ainsi que l' α 1 antitrypsine inhibe l'élastase des lavages broncho-alvéolaires, qui représente l'élastase leucocytaire, d'une manière dose dépendante, dont l'effet inhibiteur est meilleure par rapport celui exercé sur l'élastase porcine pancréatique, du fait que l'IC₅₀ sur l'activité de l'élastase par l'huile totale est de 104,69 μ g/ml et de 129,29 μ g/ml pour l'élastase leucocytaire et l'élastase pancréatique porcine, respectivement. Ainsi, l' α 1 antitrypsine possède un IC₅₀ de 70,88 μ g/ml et 51,41 μ g/ml pour l'élastase pure commercialisée et l'élastase leucocytaire (des LBA), respectivement.

Cette inhibition est due à la richesse de l'huile de la nigelle par les acides gras insaturés particulièrement, l'acide oléique qui est considéré comme un puissant inhibiteur de l'élastase leucocytaire (Moroy *et al.*, 2011).

L'inhibition de l'élastase leucocytaire dans les LBA par l'huile totale de NS explique leur efficacité comme inhibiteur de cette enzyme car les LBA sont très riche en différentes protéines de l'inflammation, malgré ça l'huile totale exerce leur effet inhibiteur significatif.

D'après les résultats obtenus, l'activité inhibitrice de l'élastase des LBA par l'huile totale manifeste un effet inhibiteur relativement supérieur à celui présenté par l'élastase pure, de ce fait les huiles des graines de *Nigella sativa* semblent présenter un intérêt réel et potentiel dans l'inhibition de l'élastase produite par les polynucléaires neutrophiles et les

macrophages chez les patients atteints des MPOC, impliquée dans la destruction de l'élastine des fibres élastiques qui sont présentes en grande quantité dans le poumon et qui lui confèrent les propriétés d'élasticité caractéristique . Par conséquent, les huiles de *Nigella sativa* peuvent être utilisées comme traitement contre les MPOC.

Conclusion générale et perspectives

La physiopathologie de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) se caractérise principalement par un déséquilibre de la balance protéase-antiprotéase provoqué par l'hyperproduction lors de l'activation des cellules inflammatoires activées (polynucléaires neutrophiles, macrophages) sous l'action de la fumée de cigarette, d'un gaz nocif ou par un déficit en $\alpha 1$ antitrypsine. L'élastase fait partie de ces protéases produites en quantité importante, et est impliquée dans la destruction de l'élastine des fibres élastiques des poumons des patients emphysémateux. Par manque d'une thérapie courante empêchant l'évolution inévitable de la maladie, le recours à la phytothérapie est d'un grand intérêt. La plante *Nigella sativa* est parmi les plantes médicinales largement exploitées dans la civilisation islamique et fortement utilisées de nos jours en médecine traditionnelle à travers le monde.

Dans notre étude, les huiles des graines de *Nigella sativa* semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leur activité inhibitrice de l'élastase pure (élastase pancréatique porcine) et l'élastase leucocytaire des lavages broncho-alvéolaires.

L'huile totale des graines de *Nigella sativa* est très active comme inhibiteurs de l'activité protéasique de l'élastase pure, ainsi les fractions apolaires (F5, F2 et F1) et la fraction polaire F7 possèdent un effet inhibiteur très important *vis-à-vis* de l'enzyme pure. L'effet inhibiteur est attribué probablement à la présence des acides gras insaturés.

Le test de l'activité inhibitrice d'élastase des lavages broncho-alvéolaires par l'huile totale manifeste un effet inhibiteur relativement supérieur à celui présenté contre l'enzyme élastase porcine pure.

Ces résultats restent préliminaires, Il serait intéressant de déterminer le type d'inhibition pour l'huile totale et toutes les fractions polaires et apolaires. Et de tester les huiles polaire et apolaires sur l'activité d'enzyme leucocytaire des lavages broncho-alvéolaires. Ainsi, la recherche de l'activité $\alpha 1$ antitrypsine dans les sécrétions bronchiques serait très importante.

L'induction de l'emphysème chez les animaux de laboratoire et l'introduction des huiles afin d'évaluer l'activité inhibitrice d'élastase *in vivo* serait d'un grand intérêt, l'étude de la toxicité de ces principes actifs de *Nigella sativa* serait d'une grande utilité pour déterminer les doses préventives et thérapeutiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abboud, R. T., Vimalanathan, S. (2008). Pathogenesis of COPD. (Part I). The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *International Journal Tuberculosis Lung Disease*, **12**: 361-367.
- Abdel-Wahhab, M. A., Aly, S. E. (2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (glove) in rats during aflatoxicosis. *Journal of Applied Toxicology*, **25**: 218-223.
- Adkison, A. M., Raptis, S. Z., Kelley, D. G., Pham, C. T. (2002). Dipeptidyl peptidase I activate neutrophil-derived serine proteases and regulate the development of acute experimental arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, **109**: 363-371.
- Agence de la Santé Publique du Canada (ASPC). (2007). La vie et le souffle : Les maladies respiratoires au Canada, Ottawa. *Agence de la Santé Publique du Canada*, 131.
- Akova, A., Ustun, G. (2000). Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on Celite at different pH values. *Biotechnology Letters*, **22**: 355-359.
- Aksoy, A., Türkay, S., Tuter, T., Ustun, G., Riva, S., Secundo, F. (2001). investigation of substrate selectivity of *Nigella sativa* seed lipase(s). Joint research project (1999-2001). CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche). *Italy and Tubitak* (Turkish Scientific and Technical Research Center), Turkey.
- AI-Hader, A., Aqel, M., Hasan, Z. (1993). Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *International Journal of Pharmacognosy*, **31**: 96-100.
- Ali, B. H., Blunden, G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research*, **17**: 299-305.
- Allain, Y. M., Roche, N., Huchon, G. (2011). Pollution atmosphérique, facteur de risque des BPCO ? Atmospheric air pollution: A risk factor for COPD?. *Review française d'allergologie*, **51**: 41-55.
- Aljabre, S. H. M., Randhawa, M. A., Akhtar, N., Alakloby, O. M., Alqurashi, A. M., Aldossary, A. (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**: 116-119.
- Al-Jassir, S. (1992). Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, **45**: 239-242.
- Al-Saleh, I. A., Billedo, G., El-Doush, I. I. (2006). Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**: 167-175.
- Andreas, G. H., Oeggl, K. (2005). The oldest evidence of *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe. *Vegetation history and archaeobotany*, **14**: 562-570.
- Anna, M. S., Patrick, T. W. (2009). Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Evidence for an Autoimmune Component. *Cellular & Molecular Immunology*, **6**: 81-86.
- Atta, M. B. (2003). Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, **83**: 63-68.

- Badary, O. A., Al-Shabanah, O. A., Nagi, M. N., Al-Rikabi, A. C., Elmazar, M. M. (1999). Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone. *European Journal of Cancer Prevention*, **8**: 435-440.
- Badary, O. A., Gamal, A. M. (2001). Inhibitory effects of thymoquinone against 2o methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detection and Prevention Journal*, **25**: 362-368.
- Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal El-Din, A. M., Abdel-Wahab, M. H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*, **26**: 87-98.
- Barnes, P. J. (2000). Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, **343**: 269-280.
- Barnes, P. J. (2001). New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. *Current Opinion in Pharmacology*, **1**: 217-222.
- Barnes, P. J., Shapiro, S. D., Pauwels, R. A. (2003). Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal*, **22**: 672-688.
- Barnes, P. J., Hansel, T. T. (2004). Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, **364**: 985-996.
- Belaouaj, A. (2002). Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes and Infections*, **4**: 1259-1264.
- Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B. Y. (2006). Kinetic Study of Microwave Extraction of Essential Oil of *Nigella sativa* L. Seeds. *Chromatographia*, **64**: 227-231.
- Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2007). Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour and fragrance journal*, **22**: 148-153.
- Benson, K. F., Li, F. Q., Person, R. E., Albani, D., Duan, Z., Wechsler, J., Meade-White, K., Williams, K., Acland, G. M., Niemeyer, G., Lothrop, C. D., Horwitz, M. (2003). Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nature Genetics*, **35**: 90-96.
- Bhupendra, K. M., Prabha, M., Gupta, M. (2009). A new naturally acetylated triterpene saponin from *Nigella sativa*. *Carbohydrate Research*, **344**: 149-151.
- Boskabady, M. H., Shahabi, M. (1997). Bronchodilatory and anticholinergic effects of *Nigella sativa* on isolated guinea-pig tracheal chains. *Iranian Journal of Medical Sciences*, **22**: 127-133.
- Boskabady, M. H., Shiravi, N. (2000). Inhibitory effect of *Nigella sativa* on histamine (H1) receptors of isolated guinea pig tracheal chains. *the European Respiratory Journal*, **16**: 461.
- Boskabady, M. H., Shirmohammadi, B. (2002). Effect of *Nigella sativa* on isolated guinea pig trachea. *Archives of Iranian Medicine*, **5**: 103-107.
- Boskabady, M. H., Shirmohammadi, B., Jandaghi, P., Kiani, S. (2004). Possible mechanism(s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pig. *BMC Pharmacology*, **4**: 3-8.
- Bourgou, S., A. Pichette, B. Marzouk., J. Legault. (2009). Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany*, **76**: 210-216.

Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, **14**: 323-328.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002). Chronic Obstructive Pulmonary Disease Surveillance - United States, 1971-2000, *Surveillance Summaries*, August 2, 2002, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **51**: 1-20.

Chakravarty, N. (1993). Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Annals of Allergy*, **70**: 237-242.

Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. (2007). *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*, **101**: 673-681.

Christos, C. (1995). Clinique et évolution des BPCO. *La Revue du Praticien*, **45**: 1227-1228.

Cibson, G. J., Mac Nee, W. (2006). Chronique obstructive pulmonary disease: Investigations and assessment of severity. *European Respiratory Monthly*, **38**: 24-40.

D'Antuono, L. F., Moretti A., Lovato, A. F. S. (2002). Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Industrial Crops and Products*, **15**: 59-69.

Dekhuijzen, P. N. R., Aben, K. K., Dekker, I. (1996). Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and instable chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **154**: 813-816.

Damiano, V. V., Tsang, A., Kucich, U., Abrams, W. R., Rosenbloom, J., Kimbel, P., Fallahnejad, M., Weinbaum, G. (1986). Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs. *Journal Clinical Investigation*, **78**: 482-493.

Di Stefano, A., Maestrelli, P., Roggeri, A. (1994). Up regulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **149**: 803-810.

Dobo, J., Gettins, P. G. (2004). Alpha1-Proteinase inhibitor forms initial non-covalent and final covalent complexes with elastase analogously to other serpin-proteinase pairs, suggesting a common mechanism of inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 9264-9269.

Donaldson, G. C., Seemungal, T. A., Bhowmik, A., Wedzicha, J. A. (2002). Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, **57**: 847-852.

Duvoix, A., Mackay, R. M., Henderson, N., McGreal, E., Postle, A., Reid, K., Clark, H. (2011). Physiological concentration of calcium inhibits elastase-induced cleavage of a functional recombinant fragment of surfactant protein D. *Immunobiology*, **216**: 72-79.

El-Abhar, H. S., Abdallah, D. M., Saleh, S. (2003). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **84**: 251-258.

E1-Dakhakhny, M., Madi, N. J., Lember, N., Ammon, H. P. T. (2002). *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **81**: 161-164.

EI-Dakhakhny, M., Mady, N. I., Lember, N., Ammon, H. P. T. (2002). The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta Medica*, **65**: 465-466.

- El Gazzar, M. A. (2007). Thymoquinone suppresses in vitro production of IL-5 and IL-13 by mast cells in response to lipopolysaccharide stimulation. *Inflammatory Research*, **56**: 345–351.
- El Gazzar, M. A., El Mezayen, R., Nicolls, M. R., Dreskin, S. C. (2007). Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in lipopolysaccharide-activated mast cells by modulating NF-kappaB nuclear transactivation. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1770**: 556–564.
- El-Mahmoudy, A., Matsuyama, H., Borgan, M. A., Shimizu, Y., El-Sayed, M. G., Minamoto, N., Takewaki, T. (2002). Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *International Immunopharmacology*, **2**: 1603–1611.
- El-Obeid, A., Al-Harbi, S., Al-Jomah, N., Hassib, A. (2006). Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-a), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*, **13**: 324–333.
- El-Tahir, K. E., Ashour, M. M., Al-Harbi, M. M. (1993). The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *General pharmacology*, **24**: 1115-1122.
- El-Zawahrawy, B., Fatma, A. I., Zallraa, A. H. (1998). Effect of *Nigella sativa* on blood level and structure of liver and pancreas in adult male albino rats. *Al-Azhar Medical Journal*, **27**: 479-483.
- Faller, B., Dirrig, S., Rabaudt, M., Bieth, J. G. (1990). Kinetics of the inhibition of human pancreatic elastase by recombinant eglin c. *Biochemistry*, **270**: 639-644
- Finlay, G. A., O'Donnell, M. D., O'Connor, C. M., Hayes, J. P., Fitzgerald, M. X. (1996). Elastin and collagen remodeling in emphysema. *American Journal Pathology*, **149**: 1405-1415.
- Finkelstein, R., Fraser, R. S., Ghezzi, H., Cosio, M. G. (1995). Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **152**: 1666-1672.
- Fitch, P. M., Roghanian, A., Howie, S. E., Sallenave, J. M. (2006). Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. *Biochemical Society Transactions*, **34**: 279-282.
- Fournier, M., Lebarry, F., Le Roy, L. F., Lenormand, E., Pariente, R. (1989). Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis. *American Review of Respiratory Disease*, **140**: 737-742.
- Fukuchi, Y., Nishimura, M., Ichinose, M., Adachi, M., Nagai, A., Kuriyama, T., Takahashi, K., Nishimura, K., Ishioka, S., Aizawa, H., Zaher, C. (2004). COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*, **9**: 458-465.
- Garwicz, D., Lennartsson, A., Jacobsen, S. E., Gullberg, U., Lindmark, A. (2005). Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. *Haematologica*, **90**: 38-44.
- Ghedira, K. (2006). La nigelle cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, **4**: 1-7.
- Ghedira, K., Le Jeune, R. (2010). Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, **8**: 124–128.
- Gilani, A. H., Aziz, N., Khurram, I. M., Chaudary, K. S., Iqbal, A. (2001). Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji). *Journal of the Pakistan Medical Association*, **51**: 115-120.

Gilani, A. H., Jabeen, Q., Khan, M. A. U. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7: 441-451.

Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). (2003). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. NHLBI/WHO workshop report. Bethesda, National Heart, Lung and Blood Institute, April 2001; Update of the Management Sections, GOLD website (<http://www.goldcopd.com>). Date updated: July.

Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). (2005). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease updated. *National Institutes of Health, National Heart Lung and Blood Institute*.

Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). (2009). Global Strategy for the Diagnostic, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease – Updated 2009. *GOLD*, 1-110.

Guignard, J. L. (2001). In *Botanique systématique moléculaire. 12ème Edition Masson (Paris)*, 304.

Gullberg, U., Lindmark, A., Lindgren, G., Persson, A. M., Nilsson, E., Olsson, I. (1995). Carboxyl-terminal prodomain-deleted human leukocyte elastase and cathepsin G are efficiently targeted to granules and enzymatically activated in the rat basophilic/mast cell line RBL. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 12912-12918.

Haddad, P. S., Martineau, L., Lyoussi, B., Le, P. M. (2006). Middle Eastern and African medicine. In: Soumyanath, A. (Ed.), *In Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, 221–241.

Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Jafarabadi, H. (2004). Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytotherapy Research*, 18: 195-199.

Halbert, R. J., Natoli, J. L., Gano, A., Badamgarav, E., Buist, A. S., Mannino, D. M. (2006). Global burden of COPD: systematic review and metaanalysis. *European Respiratory Journal*, 28: 523-532.

Hargreave, E. F., Parameswaran, K. (2006). Asthma, COPD and bronchitis are just components of airway disease. *European Respiratory Journal*, 28: 264-307.

Hanafy, M. S., Hatem, M. E. (1999). Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *Journal of Ethnopharmacology*, 34: 275–8.

Haq, A., Lobo, P. I., Al-Tufail, M., Rama, N. R. Al-Sedairy, S. T. (1999). immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *International Journal of Immunopharmacology*, 21: 283-295.

Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M., Shapiro, S. D. (1997). Recurrent for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*, 277: 2002-2004.

Hawsawi, Z. A., All, B. A., Bamosa, A. O. (2001). Effect of *Nigella sativa* (Black seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Annals of Saudi Medicine*, 21: 242-244.

Hervé, M., Bruno, C., Aubier, M., Fournier, M. (1999). Emphysème pulmonaire: évolution des concepts. *Medicine/Sciences*, 15: 833-841.

Hogg, J. C. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 364: 709-721.

- Hornebeck, W., Moczar, E., Szecsi, J., Robert, L. (1985). Fatty acid peptide derivatives as model compounds to protect elastin against degradation by elastases. *Biochemistry and Pharmacology*, **34**: 3315-3321.
- Horwitz, M., Benson, K. F., Duan, Z., Li, F. Q., Person, R. E. (2004). Hereditary neutropenia: dogs explain human neutrophil elastase mutations. *Trends in Molecular Medicine*, **10**: 163-170.
- Houghton, P. J., Zarka, R., De Las Heras, B., Houlst, J. R. (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*, **61**: 33-36.
- Hutter, P., Consilia, S. (2004). Déficit en alpha-1-antitrypsine et emphysème pulmonaire. *Caduceus Express*, **6**: 1.
- Ikedak, A., Nishimura, K., Koyama, H., Izumi, T. (1995). Bronchodilating effects of combined therapy with clinical dosages of ipratropium bromide and salbutamol for stable COPD: Comparison with ipratropium bromide alone. *Chest*, **107**: 401-405.
- Ilhan, A., Gurel, A., Armutcu, F., Kamisli, S., Iraz, M. (2005). Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylene-tetrazolinduced kindling in mice. *Neuropharmacology*, **49**: 456-464.
- Imai, K., Dalal, S. S., Chen, E. S., Downey, R., Schulman, L. L., Ginsburg, M., D'Armiento, J. (2001). Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, **163**: 786-791.
- Kao, R. C., Wehner, N. G., Skubitz, K. M., Gray, B. H., Hoidal, J. R. (1988). Proteinase 3 – a distinct human polymorphonuclear leucocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *Journal of Clinical Investigation*, **82**: 1963-1973.
- Kawabata, K., Moore, A. R., Willoughby, D. A. (1996). Impaired activity of protease inhibitors towards neutrophil elastase bound to human articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **55**: 248-252.
- Khan, M. A., Ashfaq, M. K., Zuberi, H. S., Mahmood, M. S., Gilani, A. H. (2003). The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytotherapy Research*, **17**: 183– 186.
- Kido, H., Beppu, Y., Imamura, Y., Chen, Y., Murakami, M., Oba, K., Towatari, T. (1999). The human mucus protease inhibitor and its mutants are novel defensive compounds against infection with influenza A and Sendai viruses. *Biopolymers*, **51**: 79-86.
- Kököl, G., Yilmaz, H. (2005). Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella* L. (Ranunculaceae) in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: 1203-1209.
- Korkmaz, B., Attucci, S., Jourdan, M. L., Juliano, L., Gauthier, F. (2005). Inhibition of neutrophil elastase by alpha1-protease inhibitor at the surface of human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Immunology*, **175**: 3329-3338.
- Korkmaz, B., Moreau, T., Gauthier, F. (2008). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochemistry*, **90**: 227-242.
- Kramps, J. A., Morrison, H. M., Burnett, D., Dijkman, J. H., Stockley, R. A. (1987). Determination of elastase inhibitory activity of alpha 1-proteinase inhibitor and bronchial antileukoprotease: different results using insoluble elastin or synthetic low molecular weight substrates. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **47**: 405-410.

- Kumara, S. S., Huat, B. T. (2001). Extraction, isolation and characterization of antitumor principle, alphahederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta Medica*, **67**: 29-32.
- Komlev, A. D., Beida, E. V., Kuzyaev, A. I. (2005). Neutrophil elastase and IL-8 assessment in patients with COPD and asthma. *European Respiratory Journal*, **26**: 49-61.
- LA Barre, S., Ongeon, A., Arthblm, M., Uyot, M. I., Caer, J. P., Argibant, G. (1996). Characterization of a novel élastase inhibitor from a fan coral. *Biochemistry*, **319**: 365-370.
- Lafuma, C. (1991). Elastase et pathologie pulmonaire. *International Research Journal*, **203**: 49-69
- Lesser, M., Padilla, M. L., Cordozo, C. (1992). Induction of emphysema in hamsters by intratracheal instillation of cathepsin B. *American Review Respiratory Disease*, **145**: 661-668.
- Lindholm, L. H., Carlberg, B., Samuelsson, O. (2005). Should β -blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *Lancet*, **366**: 1545-1553.
- Lucey, E. C., Stone, P. J., Breuer, R., Christensen, T. G., Calore, J. D., Catanese, A., Franzblau, C., Snider, G. L. (1985). Effect of combined human neutrophil cathepsin G and elastase on induction of secretory cell metaplasia and emphysema in hamsters with in vitro observations on elastolysis by these enzymes. *American Review Respiratory Disease*, **132**: 362-366.
- Lungarella, C. G., Lucattelli, M., Martorana, P. A. (2008). The dual role of neutrophil elastase in lung destruction and repair. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **40**: 1287-1296.
- Maestrelli, P., Saetta, M., Mapp, C. E., Fabbri, L. M. (2001). Remodelling in response to infection and injury. Airway inflammation and hypersecretion of mucus in smoking subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, **164**: 76-80.
- Mahmoudi, Y. (1990). Nigelle In « La thérapeutique par les plantes les plus communes en Algérie ». *Edition palais du livre, Blida, Algérie*, 117.
- Mahmoud, M. R., EI-Abhar, H. S., Saleh, S. (2002). The effects of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* mice. *Journal Ethnopharmacology*, **79**: 1-11.
- Mannino, D. M., Gagnon, R. C., Petty, T. L., Lydick, E. (2000). Obstructive Lung Disease and Low Lung Function in Adults in the United States: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Archives International Medicine*, **160**: 1683-1689.
- Mansour, M., 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**: 431-436.
- Martinez, F. J., Jeffrey, L. C. F. S., Jeanette, M., Nicholas, D. G., Gail, W., Kazerooni, E., Murray, G., Criner, J. Donald, D., J. Hogg, A. L. R., Han, M., Alfred, P., Fishman, B. E. A., Hoffman, Z. M., Robert, W. (2007). The National Emphysema Treatment Trial Research Group. Sex Differences in Severe Pulmonary Emphysema. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **176**: 243-252.
- Mashhadian, N. V., akhshandeh, H. (2005). Antibacterial and antifungal effects of *nigella sativa* extracts against *S. Aureus*, *P. Aeruginosa* and *C. Albicans*. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, **21**: 147-152.

- Meddah, B., Robert, D., Moulay, E. A. F., Bruno, E., Mahraoui, L., Benhaddou-Andaloussi, A., Louis, C. M., Cherrah, Y., Haddad, P. S. (2009). *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **121**: 419–424.
- Menezes, A. M., Perez-Padilla, R., Jardim, J. R., Muino, A., Lopez, M. V., Valdivia, G., Montes de Oca, M., Talamo, C., Hallal, P. C., Victora, C. G., Platino, T. (2005). Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the Platino study): a prevalence study. *Lancet*, **366**: 1875-1881.
- Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., Mert, N. (2001). Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. *Journal of Veterinary Medicine American*, **48**: 593-599.
- Merfort, I., Wray, V., Barakat, H. H., Hussein, S. A. M., Nawar, M. A. M. Willuhn, G. (1997). Flavonols tryglycosides from seed of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*, **46**: 359-363.
- Mizutani, N., Fuchikami, J., Takahashi, M., Nabe, T., Yoshino, S., Kohno, S. (2009). Pulmonary Emphysema Induced by Cigarette Smoke Solution and Lipopolysaccharide in Guinea Pigs. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **32**: 1559-1564.
- Moore, A. R., Appelboom, A., Kawabata, K., Da Silva, J. A., D'Cruz, D., Gowland, G., Willoughby, D. A. (1999). Destruction of articular cartilage by alpha 2 macroglobulin elastase complexes: role in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **58**: 109-113.
- Mori, H., Nagahiro, I., Kotani, K. (2005). Addition of neutrophil elastase inhibitor to flushing solution decreases reperfusion injury in rat lung transplantation. *European Respiratory Journal*, **26**: 1-176.
- Morikawa, T., Xu, F., Kashima, Y., Matsuda, H., Ninomiya, K., Yoshikawa, M. (2004a). Novel dolabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Organic Letters*, **6**: 869-872.
- Morikawa, T., Xu, F., Ninomiya, K., Matsuda, H., Yoshikawa, M. (2004b). Nigellamines A3, A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, **52**: 494-497.
- Morsi, N. M. (2000). Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiological Polonica*, **49**: 63–74.
- Morris, A., Sciurba, F. C., Norris, K. A. (2008). Pneumocystis: A Novel Pathogen in Chronic Obstructive Pulmonary Disease ? .*COPD*, **5**: 43–51.
- Morrison, W. R., Smith L, M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *the Journal of Lipid Research*, **5**: 600-608.
- Moroy, G., Bourguet, E., Decarme, M., Sapi, J., Alix, A. J. P., Hornebeck, W., Lorimier, S. (2011). Inhibition of human leukocyte elastase, plasmin and matrix metalloproteinases by oleic acid and oleoyl-galardin derivative(s). *Biochemical Pharmacology*, **81**: 626–635.
- Nair, M. K. M., Vasudevan, P., Venkitanarayanan, K. (2005). Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **16**: 395-398.
- Nergiz, C., Otles, S. (2003). Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, **83**: 63-68.
- Nickavar, B., Mojaba, F., Javidniab, K., Amolia, M. A. R. (2003). Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Journal of Biosciences*, **58**: 629-631.

- Niemann, C. U., Cowland, J. B., Klausen, P., Askaa, J., Calafat, J., Borregaard, N. (2004). Localization of serglycin in human neutrophil granulocytes and their precursors. *Journal of Leukocyte Biology*, **76**: 406-415.
- Nobuaki, M., Jun-Ichi, F., Maki, T., Takeshi, N., Shin, Y., Shigekatsu, K. (2009). Pulmonary Emphysema Induced by Cigarette Smoke Solution and Lipopolysaccharide in Guinea Pigs. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **32**: 1559-1564.
- Nowak, D., Ruta, U. (1990). Nicotine inhibits alpha-1-proteinase inhibitor inactivation by oxidants derived from human polymorphonuclear leukocytes. *Experimental Pathology*, **38**: 249-255.
- Ohnishi, K., Takagi, M., Kurokawa, Y., Satomi, S., Kontinen, Y. T. (1998). Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Laboratory Investigation*, **78**: 1077-1087.
- Owen, C. A., Campbell, M. A., Sannes, P. L., Boukedes, S. S., Campbell, E. J. (1995). Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *Journal of Cell Biology*, **131**: 775-789.
- Pauwels, R. A., Buist, A. S., Ma, P., Jenkins, C. R., Hurd, S. S. (2001). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, **163**: 1256-1276.
- Pham, C. T. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Journal of Cell Biology*, **6**: 541-550.
- Raj Kapoor, B., Anandan, A., Jayakar, B. (2002). Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* L. against gastric ulcers in rats. *Current Science*, **82**: 177-179.
- Ramadan, M. F., Mörsel, J. T. (2002). Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and β -carotene in oil seeds. *European Food Research and Technology*, **214**: 521-527.
- Ramadan, M. F., Mörsel, J. T. (2003). Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oilseeds. *Food Chemistry*, **80**: 197-204.
- Reeves, E. P., Lu, H., Jacobs, H. L., Messina, C. G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E. O., Warley, A., Roes, J., Segal, A. W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K^+ flux. *Nature*, **416**: 291-297.
- Retamales, I., Elliott, W. M., Meshi, B., Coxson, H. O., Pare, P., Sciurba, F. C. (2001). Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, **164**: 469-473.
- Riise, G. C., Kjellström, C., Ryd, W. (1997). Inflammatory cells and activation markers in BAL during acute rejection and infection in lung transplant recipients: a prospective, longitudinal study. *European Respiratory Journal*, **10**: 1742-1746.
- Roberts, C. M., Bugler, J. R., Melchor, R., Hetzel, M. R., Rpiro, S. G. (1993). Value of pulse oximetry in screening for long-term oxygen therapy requirement. *European Respiratory Journal*, **6**: 559-562.
- Rooney, S., Ryan, M. F. (2005). Effects of Alpha-hederin and Thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on Human Cancer Cell Lines. *Anticancer Research*, **25**: 2199-2204.

- Saetta, M., Turato, G., Maestrelli, P., Mapp, C. E., Fabbri, L. M. (2001). Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **163**: 1304-1309.
- Salem, M. L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*, **5**: 1749-1770.
- Salomi, M. J., Nair, S. C., Panikkar, K. R. (1991). Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutrition and Cancer*, **16**: 67-72.
- Salvesen, G., Enghild, J. J. (1990). An unusual specificity in the activation of neutrophil serine proteinase zymogens. *Biochemistry*, **29**: 5304-5308.
- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, **23**: 197-223.
- Segura, V. L., Pardo, A., Gaxiola, M., Uhal, B. D., Becerril, C., Selman, M. (2000). Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*, **117**: 684-694.
- Selman, M., Cisneros-Lira, J., Gaxiola, M., Ramírez, R., Kudlacz, E. M., Mitchell, P. G., Pardo, A. (2003). Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Chest*, **123**: 1633-1641.
- Senior, R. M., Connelly, N. L., Cury, J. D., Welgus, H. G., Campbell, E. J. (1989). Elastin degradation by human alveolar macrophages: a prominent role of metalloproteinase activity. *American Review Respiratory Disease*, **139**: 1251-1256.
- Sethi, S., Maloney, J., Grove, L., Wrona, C., Berenson, C. S. (2006). Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*. **173**: 991-998.
- Simpson, A. J., Maxwell, A. I., Govan, J. R., Haslett, C., Sallenave, J. M. (1999). Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Letters*, **452**: 309-313.
- Snider, G., Kleinerman, L. J., Thurlbeck, W. M., Bengali, Z. H. (1985). The definition of emphysema: report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Division of lung diseases workshop. *American Review Respiratory Disease*, **132**: 182-185.
- Stockley, R. A. (1999). Neutrophils and protease antiprotease imbalance. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, **160**: 49-52.
- Stoller, J. K., Fallat, R., Schluchter, M. D., O'Brien, R. G., Connor, J. T., Gross, N., O'Neil, K., Sandhaus, R., Crystal, R. G. (2003). Augmentation therapy with alpha1-antitrypsin: patterns of use and adverse events. *Chest*, **123**: 1425-1434.
- Surkova, E., Boitsova, E., Kovaleva, L. (2005). Neutrophil activation and inflammatory response of the respiratory tract of juvenile patients with bronchiolitis. *European Respiratory Journal*, **26**: 1-29.
- Swamy, S. M., Tan, B. K. (2000). Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, **70**: 1-7.
- Swamy, S. M., Huat, B. T. (2003). Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in alpha-hederin-induced apoptosis of P388 cells. *Molecular Cellular Biochemistry*, **245**: 127-139.

Taraseviciene-Stewart, L., Douglas, I. S., Nana-Sinkam, P. S., Lee, J. D., Tuder, R. M., Nicolls, M. R., Voelkel, N. F. (2006). Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease?. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **3**: 687-690.

Taskin, M. k., Alankus Caliskan, O., Anil, H., Abou-gazar, H., Khan, A. I., Bedir, E. (2005). Triterpène saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish Journal of Chemistry*, **29**: 561-569.

Tuter, M., Secundo, F., Riva, S., Aksoy, H. A., Ustun, G. (2003). Partial Purification of *Nigella sativa* L. Seed Lipase and Its Application in Transesterification Reactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **80**: 43-48.

Tuter, M., Aksoy, H. A., Ustun, G., Riva, S., Secundo, F., Ipekler, S. (2003). Partial Purification of *Nigella sativa* L. Seed Lipase and Its Application in Hydrolytic Reactions. Enrichment of γ -Linolenic Acid from Borage Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **80**: 237-241.

Tyagi, S. C., Simon, S. R. (1990). Inhibitors directed to binding domains in neutrophil elastase. *Biochemistry*, **29**: 9970-9977.

Üstun, G., Kent, L., Cekin, N., Civelekoglu, H. (1990). Investigation of the technological properties of *Nigella sativa* (Black Cumin) Seed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **67**: 958-960.

Van Der Strate, B. W., Postma, D. S., Brandsma, C. A., Melgert, B. N., Luinge, M. A., Geerlings, M., Hylkema, M. N., van den Berg, A., Timens, W., Kerstjens, H. A. (2006). Cigarette smoke-induced emphysema: a role for B cell. *Amerian Journal Respiratory Critical Care Medicine*, **173**: 751-758.

Vincken, W., Van Noord, J. A., Greefhorst, A. P. M., Bantje, T. A., Kesten, S., Korducki, L., Cornelissen, P. J. (2002). Improved health outcomes in patients with COPD during 1 year's treatment with tiotropium. *European Respiratory Journal*, **19**: 209-216.

Watorek, W., Van, H. H., Travis, J. (1993). The isoforms of human neutrophil élastase and cathepsin G differ in their carbohydrate side chain structures. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, **374**: 385-393.

Wedzicha, J. A. (2004). Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **1**: 115-120.

Weiss, S. J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine*, **320**: 365-376.

Wright, J. L., Farmer, S. G., Churg, A. (2002). Synthetic serine elastase inhibitor reduces cigarette smoke-induced emphysema in guinea pigs. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, **166**: 954-960.

World Health Organisation. World health report (2000). Health systems: improving performance. Annex table 3. Available at www.who.int/whr/2000.index.htm Accessed January 11, 2002.

Zahoor, A., Ghafoor, A., Aslam, M. (2004). *Nigella sativa*: A potential commodity in crop diversification traditionally used in healthcare. In introduction of medicinal herbs and spices as crops. *Ministry of Food, Agricultur and Livestock, Pakistan*, 5-31.

Zimmer, M., Medcalf, R. L., Fink, T. M., Mattmann, C., Lichter, P., Jenne, D. E. (1992). Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**: 8215-8219.

Résumé

La physiopathologie de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), également connue sous le nom de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) se caractérise principalement par une inflammation des voies aériennes centrales et périphériques et du parenchyme pulmonaire, et par un déséquilibre de la balance protéase-antiprotéase, qui est la clé de voute de la physiopathologie de cette maladie. La recherche à partir des graines de *Nigella sativa* L.(NS) d'inhibiteurs de l'élastase produite lors de l'activation des polynucléaires neutrophiles et des macrophages ou sous l'effet d'un taux réduit en $\alpha 1$ antitrypsine est d'un grand intérêt thérapeutique. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer les effets des huiles polaires et apolaires des graines de NS sur l'activité de l'élastase *in vitro*. L'huile totale des graines de NS a été extraite avec un rendement de $29,21 \pm 2,012$ %, le fractionnement de cet huile par chromatographie sur colonne (CC) a été permet de séparer cinq fractions apolaires (92,12 %) et trois fractions polaires (7,83 %). L'analyse de ces huiles par CPG a révélé leurs richesses en acides gras insaturés. L'inhibition de l'activité de l'élastase pure (activité spécifique de $3,96 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ d'enzyme) par l'huile totale et les différentes fractions a révélé que l'huile totale possède l'effet inhibiteur le plus puissant avec un IC_{50} de $129,29 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{ml}$, alors que les différentes fractions exercent un effet synergique. La moyenne des concentrations de l'élastase dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints du MPOC est de $39,19 \pm 19,54 \text{ nM}$ et l'activité enzymatique détectée a une moyenne de $0,0149 \pm 0,0037 \text{ UI}/\text{ml}$. L'inhibition de cette activité par l'huile totale de NS est puissante avec un IC_{50} de $104,69 \pm 3,58 \mu\text{g}/\text{ml}$. De ce fait, l'activité inhibitrice de l'élastase des lavages broncho-alvéolaires (élastase leucocytaire) par l'huile totale manifeste un effet inhibiteur relativement supérieur à celui exercé sur l'élastase pure (élastase pancréatique porcine). D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que les huiles polaires et apolaires des graines de *Nigella sativa* possèdent une activité inhibitrice considérable de l'élastase et est localisée principalement dans les acides gras insaturés de ces huiles.

Mots-clés: Elastase, Emphysème, Inflammation, Lavages bronchiques, *Nigella sativa*, MPOC.

Summary

The physiopathology of the chronic obstructive pulmonary disease (COPD), also known as chronic obstructive lung disease (COLD), is the co-occurrence of chronic bronchitis and emphysema. It is characterized mainly by an inflammation of the central and peripheral lung airways and pulmonary parenchyma, and by an imbalance of the balance protease-antiprotease, which is the master key of the physiopathology of this disease. Research from *Nigella sativa* L seeds (NS) of inhibitors, to the highly raised elastase activity by activated polynuclear neutrophils and macrophages or to the reduction of $\alpha 1$ antitrypsin is of great medical and therapeutical use in COPD. In this context, we have attempted to assess and evaluate, *in vitro*, the effects of polar and non-polar lipids extracted from the seeds of the plant *Nigella sativa* (NS) on the protease activity of the enzyme elastase in the context of COPD and emphysema. The total oil of seeds of NS was extracted with a yield of $29, 21 \pm 2,012$ %, the separation of this oil by column chromatography (CC) was used to separate five non-polar fractions (92, 12 %) and three polar fractions (7,83 %). Analysis by gaz chromatography of polar and non-polar oils extracted from NS seeds showed revealed a high amount of non-saturated fatty acids. Inhibition of elastase activity pure (specific activity $3.96 \mu\text{mole} / \text{min} / \text{mg}$ enzyme) by the total oil and different fractions revealed that the total oil fraction showed the highest inhibitory effect with IC_{50} of $129.29 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{ml}$, while the different fractions exert a synergistic effect. The mean of protein content in the bronchoalveolar washes (BAW) from patients with COPD is $39.19 \pm 19.54 \text{ nM}$ and elastase activity was detected with the mean of $0.0149 \pm 0.0037 \text{ UI}/\text{ml}$. The inhibition of this activity by the total oil of NS is strong with a IC_{50} of $104,69 \pm 3,58 \mu\text{g}/\text{ml}$. So the inhibitory effect on the elastase activity in bronchoalveolar washings (leucocyte elastase) by total oil was relatively higher than that observed on the pure elastase (porcine pancreatic elastase). From these results, one could say that polar and non-polar lipids extracted from NS seeds possess an important inhibitory effect on the enzyme elastase which is heavily implicated in lung disease. This effect is likely to be due to the fatty acids presents on these lipid fractions.

Keywords: Elastase, Emphysema, Inflammation, Bronchoalveolar washes (BAW), *Nigella sativa*, COPD.

ملخص

يتميز مرض الانسداد الرئوي المزمن أساسا بوجود التهاب في الشعب الهوائية المركزية والمحيطية والبرنشيوم الرئوي، واختلال في التوازن بروتياز- مضاد البروتياز الذي يعد المفتاح في الفيزيولوجيا المرضية لهذا المرض. يعتبر البحث انطلاقا من بذور الحبة السوداء (*Nigella sativa*) عن مثبطات للإيلاستاز المنتج أثناء تنشيط عديدات النوى المتعادلة و البالعات الكبيرة أو تحت تأثير النسبة المنخفضة ل $\alpha-1$ antitrypsine: في هذا المرض ذي الأهمية العلاجية الكبرى. في هذا السياق حاولنا تقدير تأثير الزيوت القطبية وغير القطبية المستخلصة من بذور الحبة السوداء (*Nigella sativa*) على نشاطية الإيلاستاز وفقا لمرض الانسداد الرئوي المزمن والانفزيما (emphysème). حيث تم استخلاص الزيت الكلي من بذور الحبة السوداء بمرود يقدّر ب $29,21 \pm 2,012$ %، كما تم فصل خمسة أجزاء كزيوت غير قطبية (92,12 %) وثلاثة أجزاء كزيوت قطبية (7,83 %) بطريقة كروماتوغرافيا العمود. أن تحليل هذه الزيوت بطريقة كروماتوغرافيا الفصل الغازية كشف عن غناها بالأحماض الدهنية غير المشبعة. بين تنشيط الإيلاستاز النقي بواسطة الزيت الكلي أنه يمتلك التأثير الأكثر فعالية ($\text{IC}_{50} = 129,29 \pm 1,4 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$). في حين أن الزيوت القطبية وغير القطبية تمارس تأثير تعاوني. أن تركيز الإيلاستاز في سائل غسل القصبات الرئوية لمرضى الانسداد الرئوي المزمن يقدّر ب : $39,19 \pm 19,54$ نانومول /ملوالنشاطية الإنزيمية $0,0149 \pm 0,0037$ وحدة / مل. يعتبر تثبيط هذه النشاطية بواسطة الزيت الكلي فعال كون $\text{IC}_{50} = 104,69 \pm 3,58 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$. وعلى هذا الأساس فإن النشاطية المثبطة للإيلاستاز في سائل غسل القصبات الرئوية (إيلاستاز الكريات البيضاء) بواسطة الزيت الكلي ذيفاعلية الأكبر نسبيا من تلك التي يمارسها على الإيلاستاز النقي (إيلاستاز بنكرياس الخنازير).

حسب النتائج المتحصل عليها في هذا العمل، يمكن القول أن الزيوت القطبية وغير القطبية المستخلصة من بذور الحبة السوداء تمتلك نشاط تثبيطي كبير للإيلاستاز والذي يتركز أساسا في الأحماض الدهنية غير المشبعة الموجودة في زيوت الحبة السوداء.

الكلمات المفتاحية: مرض الانسداد الرئوي المزمن، التهاب، البروتياز، $\alpha-1$ antitrypsine، الإيلاستاز، الحبة السوداء (*Nigella sativa*)، الزيوت القطبية وغير القطبية.