UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'AMINE OXYDASE DE SOURCES VÉGÉTALES: EXTRACTION, PURIFICATION, STABILISATION ET CARACTÉRISATION

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

AKRAM (ELENA) REZAEI

JUIN 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de la réussite de ma maitrise et qui m'ont aidée lors de la rédaction de mon mémoire.

Je voudrais dans un premier temps exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche, M. MATEESCU, professeur au département de chimie à l'UQÀM qui m'a accepté au sein de son groupe, et qui a su m'encadrer, m'orienter, m'aider et conseiller tout au long de mon parcours.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Dr. Ispas-Szabo professeure associée au département de chimie à l'UQÀM, pour sa disponibilité, son grand soutien et sa gentillesse. Elle a su par ses judicieux conseils m'apporter toute l'aide nécessaire qui a grandement contribué à ma réflexion.

Je suis reconnaissante aussi au prof. Marcocci et son groupe, en particulier au Docteur Paola Pietrangeli, de l'Université de Rome pour toute l'importante assistance reçue concernant le projet.

Merci aussi à M. Le Tien Canh, professeur associé au département de chimie de l'UQÀM pour sa disponibilité durant toutes mes études à la maîtrise.

Je tiens à remercier de manière particulière Marc-André Labelle et Armelle Tchoumi pour leur patience, leur compréhension et leur inconditionnel soutien sans lequel tout le parcours aurait été très difficile.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à toute l'équipe du laboratoire : Mariela, Mirna, Nassim, Armelle, Marc-André et Victorien pour leur support et leur présence

Un grand merci à ma grande amie Anick Joliot pour son indéfectible appui et ses conseils concernant mon style d'écriture, ils ont grandement facilité mon travail, ainsi qu'à mon cher ami Michel Fortin, qui par sa réconfortante écoute sait toujours comment m'encourager. Enfin, je ne peux passer outre ma reconnaissance envers mon conjoint, Saeid Koushki. Sa présence, sa patience m'ont permis de persévérer et de me surpasser dans mes études.

Vous avez tous ma gratitude, car grâce à votre grande générosité, votre patience et votre compréhension, j'ai réussi ce grand projet

TABLE DES MATIÈRES

LIS	TE DES FIGURES	V
LIS	TE DES TABLEAUXvviiivii	iviii
RÉS	SUMÉ	xii
INT	RODUCTION	1
СНА	APITRE I: LES AMINE OXYDASES ET LEURS RÔLES BIOLOGIQUES	4
1.1	Classification des amine oxydases	5
	1.1.1 Amine oxydase à flavine adénine dinucléotide	6
	1.1.2 Amine oxydase à cuivre	11
1.2	Amine oxydase végétale	15
	1.2.1 Les propriétés de l'amine oxydase végétale	17
	1.2.2 Condition optimale de la germination	19
	1.2.3 Les méthodes de purification de l'amine oxydase à partir des sources végétales	20
	APITRE II: TECHNOLOGIES DE SÉCHAGE ET MÉTHODES DE ABILISATION DES ENZYMES	22
2.1	Techniques de séchage	23
	2.1.1 Séchage par pulvérisation	23
	2.1.2 Lyophilisation	25
	2.1.3 Comparaison de la lyophilisation et du séchage par pulvérisation	31
2.2	Stabilité de l'amine oxydase végétale en solution et en poudre	32

2.3 Les cryoprotecteurs	32
2.3.1 Le rôle des cryoprotecteurs pendant la lyophilisation	33
2.4 La contribution de l'eau à la structure des amine oxydases	39
CHAPITRE III: DYSFONCTIONS LIÉES AUX AMINES BIOGÈNES ET À L'AMINE OXYDASE	41
3.1 Les amines biogènes	41
3.1.1 Composition, nature et fonction des amines biogènes	41
3.1.2 Toxicologie des amines biogènes	44
3.1.3 Dégradation de l'excès des amines biogènes	47
3.2 Dysfonctions liées aux Amine oxydases	49
3.2.1 Monoamine oxydase et dysfonctions liées à ces enzymes	49
3.2.2 Diamine oxydase et dysfonctions liées à ces enzymes	53
CHAPITRE IV: PRÉSENTATION DU PROJET	57
CHAPITRE V: MATÉRIEL ET MÉTHODES	66
5.1 Réactifs et matériaux chimiques	66
5.2 Méthodes éxpérimentales	67
5.2.1 Extraction et purification d'amine oxydase végétale par la méthode chromatographique	67
5.2.2 Lyophilisation de l'amine oxydase	
5.2.3 Séchage de l'amine oxydase par pulvérisation	69
5.2.4 Préparation des comprimés contenant l'amine oxydase	69
5.2.5 Détermination spectrophotométrique de l'activité enzymatique de l'a oxydase	
5.2.6 Étude électrophorétique de l'amine oxydase par zymographie sur gel polyacrylamide contenant de la peroxydase	

/6
77
78
79
80
80
on 85
on 87
r 89
92
95
97
98
05
13

LISTE DES FIGURES

Figure Page
1.1 Désamination oxydative des amines biogènes catalysée par une AO 5
1.2 Classification des amine oxydases6
1.3 Monoamine oxydase (chez l'humain) et Polyamine oxydase (maïs)
1.4 Mécanisme de déamination par amine oxydase à FAD
1.5 Biosynthèse et rétroconversion des polyamines
1.6 Structure tridimensionnelle de l'AO à cuivre de <i>Escherichia coli</i> et coordination du cuivre sur le site actif de CuAO
1.7 Structure tridimensionnelle et le site actif de l'AO végétale
1.8 Activité spécifique de l'AO végétale pendant la germination
2.1 Principe de séchage par pulvérisation
2.2 Présentation schématique des différents systèmes de lyophilisation
2.3 Effet du taux de refroidissement sur la taille des cristaux de glace
2.4 Dispersion de protéines en présence des cryoprotecteurs pendant la lyophilisation
2.5 Images MET de β-Gal avant et après lyophilisation en présence et en absence de cryoprotecteur
2.6 Dilatation de l'eau pendant la congélation

2.7 Interface dimère montrant le canal avec les molécules d'eau	40
3.1 Biosynthèse des principales amines biogènes	42
3.2 Synthèse et métabolisme de l'histamine	48
3.3 Étapes de la formation de la dopamine et sa dégradation par MAO	50
3.4 Cibles pharmacologiques des antidépresseurs et l'augmentation des effets sérotoninergiques	53
3.5 Maladie de Crohn et ulcération de la muqueuse	55
4.1 Les différentes étapes de l'extraction et purification de l'amine oxydase	59
4.2 Différentes méthodes de préparation de l'AO stabilisée en poudre à partir des sources végétales	61
4.3 Protection des protéines par les sucres pendant le séchage	62
4.4 Diagramme explicatif montrant les propriétés particulières du sucre	63
5.1 Réaction chromogénique pour la détermination de l'activité de l'AO	71
5.2 Oxidation NADPH à NADP ⁺ en présence de GDH, KGA et ammonium	72
5.3 Mécanisme de polymérisation de l'acrylamide.	75
5.4 Le clivage des liaisons disulfure des protéines par β-mercaptoéthanol	77
6.1 Zymographie et coloration Coomassie durant les étapes de purification de l'AO	
6.2 Coloration Coomassie de monomère de l'AO en comparaison avec la DiaMaze	83
6.3 Effet du semicarbazide sur l'activité enzymatique de l'AO à cuivre, mis en évidence par zymographie.	84

6.4 Effet du semicarbazide sur l'activité enzymatique de la GOD, mis en évidence par zymographie
6.5 Comparaison des méthodes de séchage par pulvérisation et lyophilisation 87
6.6 Diffractogrammes de poudre lyophilisée de l'AO avec et sans cryoprotecteur 91
6.7 Profils de TGA de l'AO lyophilisée en présence des cryoprotecteurs comparés avec le profil de l'AO sans cryoprotecteurs
6.8 Profils de 2 ^e DTG de l'AO lyophilisée en présence des cryoprotecteurs comparés avec le profil de l'AO sans lyoprotecteurs
6.9 Effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique de l'AO, mis en évidence par les gels de zymographie
6.10 Représentation graphique de l'activité enzymatique de l'AO sur le gel de zymographie en présence de cryoprotecteurs
6.11 Représentation graphique des activités maintenues de l'AO après la lyophilisation en présence de cryoprotecteurs
6.12 Représentation graphique de l'activité de l'AO après lyophilisation en présence d'Agent 1b/tréhalose
6.13 Représentation graphique de l'activité de l'AO lyophilisée pendant 3 mois d'entreposage
6.14 Représentation graphique de l'activité de l'AO lyophilisée (sous forme de comprimé) pendant 3 mois d'entreposage

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Classification des amine oxydases à FAD	9
1.2 Classification des amine oxydases à cuivre	13
2.1 Les avantages et les inconvenients du séchage par pulvérisation ou lyophilis	
3.1 Des amines biogènes dans différents produits alimentaires	45
5.1 La quantité et l'activité de l'AO lyophilisée dans chaque comprimé	70
6.1 Activité spécifique de l'AO de différentes sources végétales	80
6.2 Activité totale de l'AO obtenue des différentes étapes du processus de purifi à partir des sources végétales	
6.3 Activité spécifique et rendement de l'AO récupérée des pois tachetés pendar purification	
6.4 Comparaison de l'activité de l'AO séchée obtenue par pulvérisation ou lyophilisation	86
6.5 Saccharides utilisés en tant que cryoprotecteurs pendant la lyophilisation de	
6.6 Degré de cristallinité relative de l'AO en absence et en présence des cryoprotecteurs	89
6.7 Analyse thermogravimétrique de l'effet des cryoprotecteurs sur la quantité d'humidité de l'AO lyophilisée	95
6.8 Activité enzymatique spécifique de l'AO en absence et en présence des cryoprotecteurs (par dosage couplé à la HRP)	97
6.9 Activité enzymatique spécifique de l'AO avant et après lyophilisation (par couplé à la GDH)	
6.10 Activité de l'AO lyophilisée dans chaque comprimé	99

6.11 Activité enzymatique spécifique de l'AO lyophilisée en format de poudre	100
6.12 Évaluation de l'effet de l'Agent 1b/tréhalose sur l'activité enzymatique de l'A lyophilisée	
6.13 Effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique pendant l'entreposage de l'AO lyophilisée	
6.14 Effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique de l'AO lyophilisée sous forme de comprimés pendant l'entreposage	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAP 4-Aminoantipyrine

ADN Acide désoxyribonucléique

AOAmine oxydaseAOCGènes AOC porcinsARNAcide ribonucléiqueBSAAlbumine de sérum bovinCGAl'acide α-cétoglutariqueCMCCarboxyméthylcelluloseCuAOAmine oxydases à cuivre

DAO Diamine oxydase

DEAE- cellulose
DTG
DRX
Diéthylaminoéthyl cellulose
Thermogravimétrie dérivée
Diffraction des rayons X
Commission des enzymes

ECAO Amine oxydase à cuivre de *Escherichia coli*FAD-AO Amine oxydases à flavine adénine dinucléotide
FTIR Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

GABA Acide Gamma-aminobutyrique

β-Gal β-galactosidase

GDH L-glutamate déshydrogénase

GOD Glucose oxydase

His Histidine

HNMT Histamine N-méthyltransférase HPMC Hydroxypropylméthylcellulose

HRP peroxydase de racines de raifort/ Horseradish peroxydase IUBMB International union of biochemistry and molecular biology

MAO Monoamine oxydase

MET Microscopie électronique en transmission

NAD Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

o-PDA o-phénylènediamine PAA Polyacrylamide

PAGE Polyacrylamide Gel Electrophorèse

PAO Polyamine oxydase
PBS Tampon phosphate salin
PLP Pyridoxal phosphate

RAO Amine oxydase spécifique de la rétine

RDX Diffraction des rayons X SAO Amine oxydase sérique

Sodium Dodécyl Sulfate SDS

SSAO Amine oxydase sensible à la semi-carbazide

Tc

TEMED

Température de collapse
N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
Température de transition vitreuse Tg TGA Thermogravimétrique analyse Тр Température du produit

TPQ Topaquinone

VAP-1 Protéine d'adhérence vasculaire

RÉSUMÉ

L'histamine est une amine biogène impliquée dans les maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. L'intolérance à l'histamine est le résultat d'un déséquilibre entre l'histamine accumulée et sa dégradation. L'amine oxydase (AO) est une enzyme régulatrice d'histamine qui catalyse la désamination oxydative de cette amine biogène. Afin de traiter les dysfonctionnements liés à l'histamine, un supplément oral de DAO d'origine animale est disponible. L'AO végétale, avant une activité enzymatique supérieure à celle de l'AO animale, est une nouvelle approche proposée pour traiter certaines maladies liées à l'histamine. Puisque l'AO peut être un agent antihistaminique naturel administré par voie orale, dans le projet actuel, l'identification d'une source végétale locale, l'extraction, la purification et la stabilisation de cette enzyme ont été visées. Plusieurs sources locales de la famille des légumineuses comme le pois chiche, vert, jaune et tacheté ont été présentées comme sources locales contenant l'AO. Le pois tacheté, avec une activité enzymatique de l'AO plus élevée, est présenté en tant que source locale abondante. Les méthodes de purification de cette enzyme, présentées auparavant, étaient longues, difficiles et avec un rendement bas. Face à ces inconvénients, le projet actuel présente une nouvelle méthode d'extraction et de purification à l'aide d'une résine échangeuse de cations (YMC-BioPro S75) avec un rendement d'environ 45%. Cette méthode est simple, rapide, rentable et a une capacité élevée pour la purification de grande quantité de l'AO. Étant donné que l'enzyme purifiée en solution n'est pas stable et son entreposage est difficile, deux technologies de séchage: par nébulisation et lyophilisation ont été évaluées pour obtenir l'AO en forme de poudre. Comme la lyophilisation se déroule à basse température, la protéine peut conserver son activité environ 72%-76% de son activité initiale pendant le séchage par lyophilisation. Vu que l'enzyme de l'AO subit des contraintes causées par la congélation et la déshydratation, des cryoprotecteurs peuvent être ajoutés à l'AO en phase solution avant la congélation pour surmonter ces contraintes et stabiliser l'enzyme pendant le séchage et l'entreposage. Les monosaccharides (glucose et fructose), les disaccharides (sucrose et tréhalose), les polysaccharides (dextran et CMC), PLP ou Agent 1b commercialisée avec tréhalose sont les cryoprotecteurs utilisés dans ce projet. L'AO, en présence de tréhalose, sucrose ou Agent 1b, a maintenu son activité enzymatique plus élevée par rapport à la lyophilisation sans cryoprotecteurs. L'Agent 1b est présentée en tant que meilleur cryoprotecteur pour préserver l'activité enzymatique de l'AO pendant la lyophilisation.

Mots clés: Diamine oxydase, Purification, Cryprotecteur, Lyophilisation, Stabilisation de l'enzyme, Zymographie, Comprimé, Entreposage.

INTRODUCTION

L'histamine joue un rôle fondamental dans l'anaphylaxie et est impliquée dans les réactions allergiques et pseudo-allergiques. L'intolérance à l'histamine pourrait être définie comme un déséquilibre entre l'histamine accumulée et sa dégradation (Raithel et al., 1999). La maladie inflammatoire de l'intestin causée par un excès d'histamine est une sorte de trouble qui implique une inflammation chronique du tube digestif comme la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn (Schmid et al., 1990). Des niveaux d'histamine élevés chez l'humain pourraient être liés à divers facteurs endogènes ou exogènes. En cas d'histaminose alimentaire, due à un excès d'histamine exogène, un nouveau concept a récemment été proposé - la dégradation de l'histamine par la diamine oxydase (DAO) appelée également histaminase (Calinescu et al., 2012).

Actuellement, la DAO provenant de reins de porcs a été indiquée comme une enzyme efficace pour cataboliser l'histamine et est déjà utilisée comme complément alimentaire dans des allergies alimentaires et des dysfonctionnements entériques. La DAO végétale a été choisie pour son activité spécifique beaucoup plus élevée (6,750 U/mg de protéine) que celle de la DAO animale (0,30 U/mg de protéine) (Güvenilir et Deveci, 1996; Pietrangeli *et al.*, 2007). Les enzymes provenant de sources végétales sont aussi plus acceptées par les affaires réglementaires (Jumarie *et al.*, 2017). L'objectif final est de présenter un supplément avec la DAO d'origine végétale administrable par voie orale, compte tenu de son activité spécifique plus élevée. Afin d'avoir une diamine oxydase stable avec une activité spécifique élevée dans le but de la formulation, il y a quelques défis. Tout d'abord, pour avoir accès à l'amine oxydase d'origine végétale, la source locale avec la quantité la plus élevée de la DAO est dans notre intérêt. Après sélection de la source locale, une méthode de purification simple et rapide avec un rendement élevé a été visée. Enfin, l'enzyme purifiée doit être stabilisée lors du séchage

l'utilisant des cryoprotecteurs. Compte tenu de ces différents aspects, l'introduction sera composée de trois chapitres: Dans chapitre I , les différents types d'amine oxydases et leur classification sont présentés. Les amine oxydases végétales, leurs caractéristiques et des sources contenant l'AO sont exposées. Étant donné que l'amine oxydase végétale est extraite des pousses de légumineuses, les conditions optimales de germination et des méthodes d'extraction et purification appliquées auparavant ainsi que les avantages et les inconvénients de ces méthodes seront expliqués. Vu que la stabilisation de l'enzyme produite est un facteur important, dans le chapitre II, les différentes méthodes de séchage de l'enzyme sont discutées en détail. Les aspects positifs et négatifs des méthodes de séchage seront expliqués. Dans le but de stabiliser l'enzyme pendant le séchage et entreposage, les différents types de cryoprotecteurs et leurs mécanismes de fonctionnement sont présentés en détail et les avantages et inconvénients de certains cryoprotecteurs seront discutés.

Au chapitre III, les maladies causées par l'histamine et les méthodes thérapeutiques pour réduire les symptômes causés par l'histamine sont discutées. Les dysfonctionnements liés aux amine oxydases et leurs méthodes thérapeutiques seront également présentés.



CHAPITRE I

LES AMINE OXYDASES ET LEURS RÔLES BIOLOGIQUES

De nombreuses amines biogènes possèdent un effet pharmacologique, et certaines d'entre elles sont importantes en tant que précurseurs d'hormones et composantes de coenzymes (Erdag *et al.*, 2018). Pendant de nombreuses années, il a semblé que des amine oxydases sont des enzymes qui inactivaient les amines pour protéger l'organisme contre leurs effets toxiques (Blaschko, 1974). Plus tard, il a été largement reconnu que les amine oxydases jouent un rôle dans la régulation de la concentration intraneuronale d'amines (Messerschmidt, 2010).

En général, les amine oxydases (AOs) ont été détectées dans différents organismes comme des microorganismes, des plantes et divers mammifères. Conformément à la nomenclature internationale des enzymes (IUBMB), les amine oxydases appartiennent à la classe 1 (oxydoréductases), au sein de laquelle une sous-classe 1.4 (oxydoréductases agissant sur le groupe de donneurs CH-NH₂) est distinguée, subdivisée en sous-groupes 1.4.3. (avec l'oxygène comme accepteur) dans lesquels les catégories d'amine oxydases sont: EC 1.4.3.4 amine oxydase à FAD et EC 1.4.3.6 amine oxydase à cuivre récemment reclassifiée comme: EC 1.4.3.21 amine oxydase à cuivre et EC 1.4.3.22 diamine oxydase à cuivre (Moss, 1992).

Les AOs sont des enzymes qui catalysent l'oxydation de plusieurs types d'amines biogènes, comme l'histamine, la putréscine, la cadavérine et les amines xénobiotiques

(Messerschmidt, 2010). Les xénobiotiques désignent toutes les substances étrangères présentes dans un organisme qui ne sont pas produites naturellement et qui pourraient être toxiques à des concentrations élevées (Croom, 2012). Les AOs sont aussi impliquées dans la détoxification de toxines dans les aliments et dans l'environnement (Chan, 2019). Elles catalysent les réactions de désamination oxydative (figure 1.1), produisant un aldéhyde, de l'ammoniac et du peroxyde d'hydrogène (Chan, 2019).

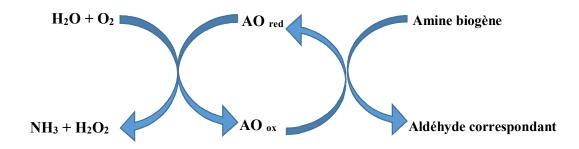


Figure 1.1 Désamination oxydative des amines biogènes catalysée par une AO.

Ces enzymes sont essentielles aux voies métaboliques homéostatiques et xénobiotiques. Les AOs contribuent à réguler les niveaux de monoamines et de polyamines telles que l'histamine, la putrescine, la spermine et la spermidine (Agostinelli *et al.*, 2010). Ces amines sont des composantes cellulaires omniprésentes (Fleming *et al.*, 1998), essentielles à la prolifération, à la différenciation cellulaire (Pegg, 1998), à l'expression des gènes et à la transduction du signal (Bachrach *et al.*, 2001). L'accumulation intracellulaire de ces amines peut induire une mort cellulaire programmée (ou apoptose) dans divers types de cellules (Tobias et Kahana, 1995). Ces amines dégradées par les amine oxydases, qui sont classées dans les monoamine oxydases, les diamineoxidases et les polyamineoxidases (Agostinelli *et al.*, 2010).

1.1 Classification des amine oxydases

Selon la nature du cofacteur, les amine oxydases sont classifiées en deux groupes principaux (figure 1.2); les amine oxydases à cuivre (CuAO, EC 1.4.3.6) et les amine

oxydases dépendantes de la flavine adénine dinucléotide (FAD-AO, EC 1.4.3.4) (Corpillo *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2013). Ces enzymes sont différentes les unes des autres en termes de spécificité du substrat, de mécanisme catalytique, de localisation subcellulaire et de leur structure moléculaire.

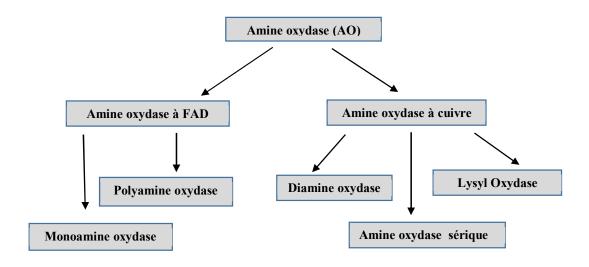
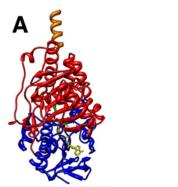


Figure 1.2 Classification des amine oxydases; d'après (Agostinelli et al., 2010)

1.1.1 Amine oxydase à FAD

Les amine oxydases à FAD oxydent une variété de substrats aminés, y compris des monoamines et des polyamines. Selon la spécificité du substrat, les amine oxydases à FAD (EC 1.4.3.4) sont subdivisées en monoamine oxydase (MAO-A, MAO-B) et polyamine oxydase (PAO). Ces enzymes ont des structures globales similaires avec des domaines de liaison au FAD presque identiques, mais contiennent des sites de liaison au substrat variés (Gaweska et Fitzpatrick, 2011). Les sites actifs de MAO sont hydrophobes, entourés par des résidus aromatiques et aliphatiques (Binda *et al.*, 2002). Ces MAO-A et MAO-B se trouvent dans les cellules de la plupart des espèces de

mammifère, mais les PAOs sont principalement dans les plantes (Agostinelli *et al.*, 2010).



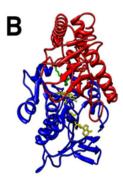


Figure 1.3 MAO-B (chez l'humain) (A), PAO (maïs) (B); choisies de la banque de données de protéines (10JA et 2UXN). Les domaines de liaison au FAD sont en bleu et les domaines de liaison au substrat en rouge; les analogues de substrat ou inhibiteurs en vert, les cofacteurs de flavine en jaune et l'hélice α de liaison à la membrane C-terminale de MAO B est en orange; d'après (Binda *et al.*, 2002; Gaweska et Fitzpatrick, 2011).

1.1.1.1 Monoamine oxydases

La monoamine oxydase (MAO) se présente dans les cellules de la plupart des tissus des mammifères, bien qu'elle soit absente des érythrocytes (Tipton, 1986). Les MAO A et B (figure 1.3) sont des protéines membranaires mitochondriales externes, distribuées dans tout le corps. Ces enzymes mitochondriales sont principalement impliquées dans le métabolisme des amines biogènes des neurotransmetteurs, xénobiotiques et aryl-alkylamines exogènes (Agostinelli *et al.*, 2010; Bortolato et Shih, 2011). Elles sont intégrées dans une structure phospholipidique qui préserve l'activité enzymatique (Greenawalt et Schnaitman, 1970; Kinemuchi *et al.*, 1985). Chez l'humain, deux isoenzymes de MAO ont été identifiées, codées par deux gènes situés sur le chromosome X: MAO-A et MAO-B (Bortolato et Shih, 2011) et sont classifiées sur la base de leur inhibition sélective respectivement par la clorgyline et la sélégiline (Agostinelli *et al.*, 2010; Binda *et al.*, 2007).

Au point de vue structural, les deux formes de MAO sont des glycoprotéines composées de deux sous-unités de poids moléculaire similaire. Les deux isoenzymes contiennent 70% d'acides aminés identiques avec un FAD qui est lié de manière covalente à un groupe de cystéine de l'enzyme (Gaweska et Fitzpatrick, 2011). Cette liaison semble toutefois instable en présence de fortes concentrations de composés sulfhydriles qui provoquent la libération de la flavine (Gaweska et Fitzpatrick, 2011; Tipton, 1986).

Les deux MAOs, en tant que flavoprotéines oxydases, catalysent l'oxydation de la monoamine (amine primaire, secondaire et tertiaire) via deux demi- réactions : dans la première réaction qui est la demi-réaction réductrice, le cofacteur de flavine est réduit lorsqu'il accepte un équivalent hydrogène du substrat, tandis que dans l'étape d'oxydation, la flavine réduite est réoxydée par l'oxygène moléculaire (figure 1.4). La première étape de l'oxydation des amines est la déshydrogénation de la liaison carbone-azote pour former un imine. Dans cette étape, FAD est réduit. Ensuite, l'aldéhyde correspondant et l'ammoniac sont produits par l'hydrolyse d'imine et FAD réduit est réoxydée par l'oxygène moléculaire (Tipton, 1986).

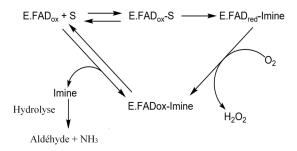


Figure 1.4 Mécanisme de déamination des amines (S) par amine oxydase à FAD; d'après (Gaweska et Fitzpatrick, 2011; Scrutton, 2004).

Des études cinétiques indirectes et directes suggèrent que cette hydrolyse a lieu à la surface de l'enzyme sans que l'imine soit libérée. Des études sur les effets du pH et sur l'activité de l'enzyme ont montré que c'est la forme non-protonée de l'amine qui agit en tant que substrat (Gaweska et Fitzpatrick, 2011; Tipton, 1986).

Les substrats endogènes de la MAO sont des neurotransmetteurs, tels que la sérotonine, la dopamine, la noradrénaline et l'épinéphrine (Blows, 2000). Le rôle de la MAO dans l'homéostasie de ces amines est essentiel pour moduler la régulation neuroendocrinienne du système nerveux central et de nombreux organes périphériques (Bortolato et Shih, 2011). Des études ultérieures ont montré que la MAO-A avait une très grande affinité pour la sérotonine (120 fois supérieure à celle de la MAO-B) et peu d'affinité pour la noradrénaline; en revanche, la MAO-B a une affinité élevée pour la 2-phényléthylamine et la benzylamine (tableau 1.1). La dégradation de la dopamine, de la tryptamine et de la tyramine est médiée par les deux MAO (Bortolato et Shih, 2011).

Tableau 1.1 Classification et caractéristiques des amine oxydases à FAD; d'après (Agostinelli *et al.*, 2010)

	Classification	Cofacteur	Distribution tissulaire	Spécificité du substrat
	MAO-A	FAD	Tous les tissus (membrane mitochondriale externe Neurones catécholaminergiques	Noradrénaline Sérotonine Tyramine Tryptamine
Amine oxydase (FAD-AO)	MAO-B		(MAO-A) Neurones et cellules gliales (MAO-B)	Dopamine Benzylamine Phényléthylamine Tyramine Tryptamine
	PAO		Tous les tissus (cytoplasme)	N ¹ Acetylspermine N ¹ ,N ¹² diacetylspermine N ¹ Acetylspermidine Spermine

1.1.1.2 Polyamine oxydase

Les polyamines se trouvent dans tous les organismes vivants, y compris les bactéries, les plantes et les animaux. La putrescine, la spermine et la spermidine jouent un rôle crucial dans la gestion du stress et participent à divers processus cellulaires fondamentaux, notamment la transcription, la modification de l'ARN, la synthèse des protéines et la modulation de l'activité enzymatique (Kusano *et al.*, 2008).

Les polyamine oxydases (PAOs) sont des enzymes cytosoliques dans des vésicules sphériques qui sont séparées avec une membrane du contenu du cytosol (Agostinelli *et al.*, 2010; Benedetti, 2011).

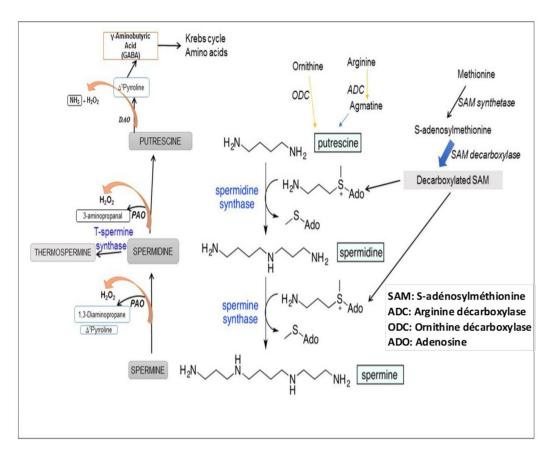


Figure 1.5 Biosynthèse et rétroconversion des polyamines; d'après (Handa *et al.*, 2018).

Les PAOs à FAD fonctionnent au niveau de l'amine secondaire des polyamines. La spermidine et la spermine sont des substrats spécifiques pour PAOs (Cui *et al.*, 2013). Les polyamines dans les cellules sont régulées par l'activité enzymatique de la diamine oxydase (DAO) et des polyamine oxydases (PAOs).

L'activité de la PAO est la plus élevée dans le foie, suivie par les testicules, les reins et la rate, alors que les activités dans l'intestin grêle, le cœur, le cerveau et les poumons ne semblent pas être particulièrement élevées. Chez l'humain, ces enzymes ne sont généralement pas détectables dans le sang. Cependant, des niveaux significatifs peuvent être trouvés au cours de l'infection, dans le "sérum durant la grossesse" et le sérum rétro placentaire (Benedetti, 2011).

1.1.2 Amine oxydase à cuivre

Chez les bactéries, les amine oxydases à cuivre (CuAO) utilisent divers substrats de type amines biogènes (Elovaara et al., 2015; Zeng et Spiro, 2013). Chez les animaux, les CuAOs sont liées à la détoxification et la régulation des amines biogéniques. Chez les plantes, les amine oxydases libèrent du H₂O₂ dans la paroi cellulaire lors de la croissance et de la différenciation cellulaires (Tisi et al., 2008). Malgré ces différences fonctionnelles, les CuAOs de toutes les sources connues sont des homodimères, les sous-unités ayant des poids moléculaires de 70 à 95 kDa et une chimie fondamentalement identique. Les structures tertiaires des CuAOs obtenues de toutes les sources sont très similaires. La structure de l'amine oxydase à cuivre de Escherichia coli (ECAO) est représentative de toutes les structures connues de CuAO (figure 1.6 (a)). La structure de la CuAO native montre que chaque site actif est constitué de Cu (II) coordinné en pyramide carrée déformée par trois ligands N des histidines en positions équatoriales et par un ligand de l'eau axial (Wa). Il y a aussi un ligand labile d'eau équatoriale (We). La topaquinone (TPQ), Reduction/Oxidation cofacteur, est proche de l'ion de cuivre, mais n'est pas directement coordinnée à l'ion de cuivre. La position O2 du cofacteur est liée à Wa par une liaison d'hydrogène, tandis que l'atome

d'O4 (figure 1.6 (b)) est lié à l'hydroxyle d'un résidu de tyrosine. La position O5 de TPQ pointe vers la poche dans laquelle le substrat aminogène est situé (Messerschmidt, 2010).

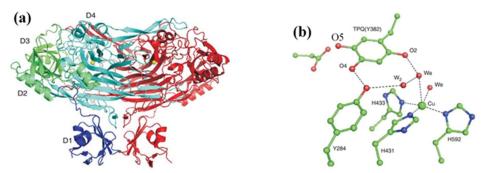


Figure 1.6 (a) Structure tridimensionnelle de l'homodimère d'amine oxydase à cuivre de *Escherichia coli* (ECAO) (code PDB: 1DYU). Un monomère est coloré en rouge. L'autre monomère est coloré par domaines (D1 bleu; D2 vert lime; D3 vert; D4 cyan). Les ions de cuivre sont représentés par des sphères jaunes; (b) Coordination du cuivre sur le site actif de CuAO; d'après (Messerschmidt, 2010).

Selon la figure 1.6, le domaine C-terminal se plie en un grand β -sandwich composé de feuillets β . Ce domaine constitue une grande partie de l'interface du dimère. De plus, le site actif de chaque monomère est également situé dans ce domaine. Les ligands de l'ion cuivre et la séquence qui inclut le résidu de tyrosine modifié sont tous placés dans ce domaine.

1.1.2.1 La fonction de l'ion de cuivre dans l'activité catalytique de la CuAO.

Les AOs à cuivre contiennent des centres de cuivre qui peuvent servir comme un centre de transfert d'électrons. Les enzymes à cuivre utilisent l'oxygène comme substrat, parce que les ions de cuivre interviennent directement dans l'activation du dioxygène et sont aussi responsables de la formation du cofacteur interne. Dans le site actif de cuivre, l'un des sites de coordination du cuivre est vide pour la liaison de l'oxygène. Au cours de la catalyse, les amines pénètrent dans le site actif via un canal de substrat qui peut jouer un rôle clé dans la définition de la spécificité du substrat pour différentes CuAOs. Les

amines lient au site actif et réduisent le TPQ, puis l'oxygène moléculaire est réduit par TPQ (appelée demi-réaction oxydative) qui produit le peroxyde d'hydrogène (Messerschmidt, 2010). Les équations suivantes représentent le mécanisme de réaction. La réaction réductive (2) et oxydative (3).

$$E_{ox} + R - CH_2NH_3^+ \rightarrow E_{red} - NH_3^+ + R - CHO$$
 (1)

$$E_{red} - NH_3^+ + O_2 + H_2O \rightarrow E_{ox} + NH_4^+ + H_2O_2$$
 (2)

En général, les amine oxydases à cuivre sont divisées en deux sous-groupes (tableau 1.2): diamine oxydase (DAO) et amine oxydase sérique (SAO) (Agostinelli et al., 2010).

Tableau 1.2 Classification des amine oxydases à cuivre; d'après (Agostinelli *et al.*, 2010). Ces amine oxydase se trouve dans le sérum et les tissus.

Classification	Cofacteur	Distribution tissulaire	Spécificité du substrat	Inhibiteur	
DAO	Cu, TPQ	Tissus (Cytoplasme, fraction microsomale) Placenta humain Tissus foetaux, Processus néoplasiques	1,3- Propanediamine Putrescine Cadavérine Histamine Spermidine Spermine	Aminoguanidine Hydrazines Hydrazides	Hydrazines
SAO		Sérum, Liquides biologiques Membranes plasmatiques (Adipocytes, Placenta, Reins, Foie)	Benzylamine Spermine Spermidine, Aminoacétone Méthylamine	cuivre	

1.1.2.2 Amine oxydase sérique (SAO)

La SAO est une enzyme présente dans le plasma sanguin. Cette amine oxydase sérique (EC 1.4.3.21) catalyse l'oxydation de monoamines et est spécifique vers les substrats benzylamine, spermine, spermidine, aminoacétone, méthylamine. Elle est distribuée dans les fluides biologiques et membranes plasmiques *ex.*: adipocytes, placenta, reins, foie, rate (Agostinelli *et al.*, 2010). Chez les mammifères, le plasma sanguin contient des quantités variables, mais individuellement relativement constantes de la SAO. La génèse des SAO dans différents organes est contrôlée par quatre gènes AOC porcins: AOC1 pour codagse de la diamine oxydase (DAO), l'AOC2 pour codage de l'amine oxydase spécifique de la rétine (RAO), AOC3 pour encoder la protéine d'adhérence vasculaire (VAP-1), et AOC4 un homologue de la VAP-1 qui s'exprime principalement dans le foie. Tous les mammifères possédant un gène fonctionnel d'AOC4 présentent une activité plasmatique élevée de l'AO, mais les humains manquent le gène AOC4 fonctionnel (Schwelberger, 2007).

1.1.2.3 Diamine oxydase (DAO)

La DAO est une amine oxydase à cuivre (EC 1.4.3.22) qui est spécifique envers les substrats 1,3-propane diamine, putrescine, cadavérine, agmatine, histamine, spermidine et spermine (Agostinelli *et al.*, 2010). La DAO est la principale enzyme responsable du métabolisme de l'histamine ingérée et est impliquée dans l'intolérance à l'histamine (Maintz et Novak, 2007).

La DAO, le produit du gène AOC1, est généralement stockée à l'intérieur des cellules, libérée uniquement lors d'une stimulation et rapidement éliminée de la circulation après sa libération (Schwelberger, 2007). Ainsi, la DAO n'est normalement pas présente dans le plasma et, contrairement à la SAO, elle préfère les diamines et non les monoamines comme substrats. La DAO (histaminase, amine oxydase rénale) est une glycoprotéine homodimère (Kirschner *et al.*, 2014) avec la masse moléculaire apparente de 186 kDa. L'activité enzymatique de la DAO peut être inhibée par l'amiloride et certains de ses

dérivés tels que l'aminoguanidine (Biegański et al., 1982). La DAO est principalement exprimée dans les tissus (cytoplasme, fraction microsomale): au niveau de la muqueuse intestinale, des reins (Schwelberger et Bodner, 1998), des fœtaux, du placenta (Morel et al., 1992), du thymus, des poumons avec des niveaux plus faibles dans le cerveau et les vésicules séminales (Finney et al., 2014). Elle est exprimée principalement dans les cellules épithéliales des reins et de l'intestin, stockée dans des vésicules situées au niveau de la membrane plasmique basolatérale. La DAO est libérée localement et juste une seule fraction mineure de la DAO libérée apparaîtra dans la circulation périphérique où elle disparaîtra avec une demi-vie d'environ une heure (Schwelberger, 2007). Pendant une grossesse en bonne santé, la DAO est fortement exprimée dans le placenta (1000 fois plus élevée que dans les autres organes) et une faible activité de la DAO a été liée à des grossesses à haut risque (Maintz et al., 2008). Une étude récente sur des souris a indiqué que la DAO joue un rôle essentiel dans l'homéostasie des taux d'histamine et de putrescine, ce qui est essentiel pour la décidualisation (le remodelage de l'endomètre en vue de l'implantation d'un embryon) et l'implantation d'embryon lui-même (Liang et al., 2010). Dans cette étude, l'expression de la DAO s'est avérée être sous le contrôle des œstrogènes via la protéine de liaison CCAAT / amplificateur.

1.2 Amine oxydase végétale

Chez les plantes, les polyamines telles que la putrescine, la cadavérine, la spermidine et la spermine sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques, tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et le système de défense immunitaire. Les polyamines sont oxydés par deux classes hétérogènes d'enzymes, les amine oxydases à cuivre (CuAO) et les polyamine oxydases à FAD, PAOs (Tavladoraki *et al.*, 2016). Les CuAO et les PAOs contribuent à plusieurs processus physiologiques par le contrôle de l'homéostasie des polyamines en tant que sources de produits de réaction biologiquement actifs (Igarashi et Kashiwagi, 2010). Les CuAOs et les PAOs ont été

retrouvées à un niveau élevé dans la paroi cellulaire de plusieurs espèces appartenant aux familles de *Fabaceaes* et de *Poaceaes* (Tavladoraki *et al.*, 2016).

Dans les plantes, les amine oxydases sont des glycoprotéines contenant de 3 à 15% de glucides (Rossi et al., 1992) et la DAO est la protéine soluble la plus abondante détectée dans les fluides extracellulaires de Fabaceaes, en particulier de plantules de pois (Pisum sativum), de lentilles (Lens culinaris), de pois chiches (Cicer arietinum) et chez Latirus sativus, où cette enzyme est présente à des concentrations élevées, jusqu'à 4% de la teneur totale en protéines (Medda et al., 1995; Vianello et al., 1993). La DAO de plantes (histaminase) diffèrent des enzymes des mammifères et procaryotes par un certain nombre de caractéristiques particulières, principalement une affinité de liaison élevée pour l'histamine et une stabilité élevée. De plus, cette enzyme peut être isolée à un degré de pureté élevé en deux étapes chromatographiques simples et peu coûteuses (Mondovi et al., 2013).

Un brevet international (n° PCT/EP2001/013770) a été déposé pour un médicament à base d'histaminase d'origine végétale destiné au traitement de maladies à médiation par l'histamine, telles que l'anaphylaxie, l'asthme allergique, l'urticaire, la rhinite et la conjonctivite (Mondovi *et al.*, 2013). Malgré le potentiel pharmacologique prometteur des DAO de plantes, leur utilisation thérapeutique est limitée par leur immunogénicité et leur courte demi-vie dans le sang (Masini *et al.*, 2007).

Les pousses de pois (*Pisum sativum*) sont la source la plus active de DAO (Smith, 1985), qui se trouvent principalement dans l'épicotyle, étant absentes de la graine (Smith, 1985). La DAO des pousses de pois est la plus active avec la putrescine et la cadavérine comme substrats (Smith, 1985). L'enzyme est présente en plus grande concentration pendant la première semaine de croissance. Chez les plantes, l'AO catalyse l'oxydation des amines et produit du NH₃ et du H₂O₂ (Federico *et al*, 1986). Le peroxyde d'hydrogène produit est une molécule de signalisation importante dans les différents processus physiologiques, y compris la maturation de la paroi cellulaire et la

lignification pendant la croissance, ainsi que la cicatrisation et le renforcement de la paroi cellulaire lors de l'invasion de pathogènes. (Wimalasekera *et al.*, 2011, Cona *et al.*, 2006). De plus, il est connu que le catabolisme des amines influence la réponse au stress des plantes lors d'une exposition au cadmium ou à un excès de sel (Campestre *et al.*, 2011).

L'une des amine oxydases trouvées dans la plante est la polyamine oxydase, une oxydase spécifique des polyamines qui n'a aucun effet sur les diamines. Contrairement à la DAO qui se trouve généralement dans les légumineuses (*Fabaceaes*), la PAO est présente dans toutes les graminées (*Poaceaes*). Cette enzyme oxyde la spermidine et la spermine et se trouve dans la paroi cellulaire de la plante (Smith, 1985).

1.2.1 Les propriétés de CuAO végétale

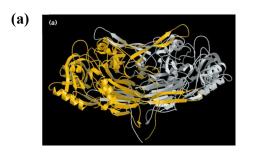
La structure moléculaire

La structure cristalline de l'amine oxydase de plante montre que l'enzyme est un dimère de sous-unités indépendantes mais chimiquement identiques. Les dimensions moléculaires sont approximativement les mêmes que celles de CuAO de *E. coli* (ECAO). Le domaine N-terminal supplémentaire de l'ECAO, D1, est absent du gène de l'AO de plante (figure 1.7 (a)) (Kumar *et al.*, 1996).

Le site actif

Le site actif de l'AO végétale a plusieurs propriétés notables. Il est caché et l'accès au substrat semble nécessiter un réarrangement substantiel du polypeptide. Il semble que le cofacteur organique soit très flexible pourrait faire ce réarrangement. Dans le site actif, l'atome de Cu (II) et le cofacteur organique sont proches mais non liés. Le site actif de chaque sous-unité est situé vers un bord du domaine β-sandwich. L'atome de Cu est coordinné par les groupes imidazole de trois résidus d'histidine et par deux

molécules d'eau (figure 1.7 (b)), La géométrie de coordination est décrite comme approximativement pyramidale carrée (Kumar *et al.*, 1996).



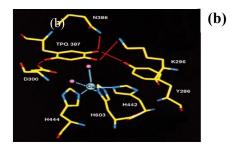


Figure 1.7 Structure tridimensionnelle de l'AO des pousses de pois (*Pisum sativum*) (a) et le site actif de l'AO végétale (b), montrant l'atome de Cu (sphère bleue), les deux molécules d'eau coordonnées (sphères magenta), les résidus de liaison au Cu (His442, His444 et His603), le cofacteur (TPQ387), et d'autres résidus de sites actifs. Les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes pointillées rouges; d'après (Kumar *et al.*, 1996).

La stœchiométrie des cofacteurs métalliques et TPQ

La masse molaire de l'AO obtenue à partir des pousses de pois (*Pisum sativum*) est 150 ± 6 kDa. De plus, dans chaque subunité, la stœchiométrie des cofacteurs métalliques et organiques topaquinone et la protéine est 1: l: l (McCuirl *et al.*, 1994).

Le point isoélectrique

Le point isoélectrique de l'AO obtenue des pousses de pois déterminé sur le système Phast, dans une solution d'ampholyte (de Pharmacia) est 7,4. Cette valeur est supérieure à celle d'autres amine oxydases, qui ont tendance à être acides et dont les points isoélectriques sont compris entre 4 et 6 (Cogoni *et al.*, 1990).

La spécifité pour les substrats

L'amine oxydase obtenue des pousses de pois a une activité spécifique relative envers les substrats suivants; le 1,4-diaminobutane (putrescine): 86%, le 1,5-diaminopentane (Cadavérine): 100%, le 1,6-diaminohexane: 42%, l'histamine: 9.8%

et le 1,3 diaminopropane : 8%. Les pourcentages sont présentés par rapport au 1,5-diaminopentane (Kivirand et Rinken, 2007).

1.2.2 Condition optimale de germination

Les pousses de pois doivent être germées dans des conditions optimales pour atteindre la quantité maximale de l'AO. L'activité spécifique d'enzyme augmente régulièrement avec l'augmentation de la masse de cotylédon au cours de la première semaine. Elle atteindrait son maximum le huitième jour à 25 °C et commencerait alors à chuter. En fait, l'activité totale et spécifique de l'AO obtenue des pousses de pois augmente avec la longueur du cotylédon, mais la teneur en protéines diminuerait linéairement avec la croissance du cotylédon (Vianello *et al.*, 1999). La condition optimale est la germination des pousses dans l'obscurité à la température ambiante et le temps optimal est entre 3 à 16 jours de germination (Federico et Angelini, 1988; Kivirand et Rinken, 2007; Luhova *et al.*, 2003)

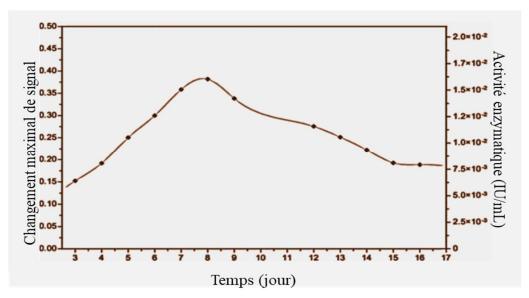


Figure 1.8 Activité spécifique de l'AO à partir des pousses des pois verts pendant la germination; d'après (Kivirand et Rinken, 2007).

1.2.3 Les méthodes de purification de l'AO à partir des sources végétales

Différentes méthodes de purification de OA à partir des sources végétales variées ont été rapportées.

En 1952, Kenten et Manne (Kenten et Mann, 1952) ont utilisé une méthode d'extraction et de purification partielle. Dans cette méthode, l'amine oxydase a été extraite par l'eau à partir des pousses de pois. Après précipitation avec le sulfate d'ammonium, dialyse contre de l'eau distillée et centrifugation, le résidu a été traité avec de l'acétone. Le précipité a été centrifugé et séché. L'activité faible de l'enzyme isolée et la procédure longue sont les inconvénients de cette méthode.

Ensuite, Mann en 1955 (Mann, 1955) a appliqué une méthode de purification de l'AO végétale dans laquelle l'extrait brut a été mélangé avec de l'éthanol et du chloroforme et il a été centrifugé. Le surnageant jaune a été versé et le reste a été traité avec du (NH₄)₂SO₄. Le précipité a été dissout dans le tampon et dialysé contre de l'eau. La suspension dialysée a été centrifugée et amenée à un pH 5 par l'acide acétique. La suspension obtenue a été conservée à 0-2 °C pendant plusieurs heures jusqu'à la floculation du précipité. Le précipité a été recueilli par centrifugation et mis en solution avec de l'eau et ensuite le pH a été ajusté à 7 avec KOH. La solution finale à pH 7 a été centrifugée et stockée à -10 °C. L'AO obtenue par cette méthode est 300 fois plus pure que l'AO dans l'extrait brut, mais le rendement de cette méthode est bas.

Kluetz (Kluetz *et al.*, 1980) a présenté une méthode très longue pour la purification de l'AO à partir des pousses de pois (*Pisum sativum*). Après avoir préparé le surnageant, il a fait un fractionnement au sulfate d'ammonium et le précipité obtenu après la centrifugation a été dissout dans les tampons. En ajoutant la solution d'éthanol / chloroforme, la diamine oxydase à ce stade est contenue dans la solution d'eau-éthanol. Dans cette méthode, à chaque étape, l'AO subit un fractionnement au sulfate d'ammonium, dissolution et dialyse. La solution contenant AO obtenue est passé à travers la colonne chromatographique par échange d'ions (diéthylaminoéthyle

cellulose, une résine chargée positivement). Après la deuxième colonne chromatographique et filtration sur gel (Ultrogel AcA-34), la bande rose, qui était éluée au premier, représentait la diamine oxydase purifiée. L'AO a été séchée par lyophilisation et stockée à -20 °C. Elle reste stable pour des mois sous cette condition.

En 1993 et en 1999 Vianello a purifié l'AO à partir des pousses de soja et pois (Vianello *et al.*, 1993; Vianello *et al.*, 1999). La méthode qu'il a présentée est une méthode de purification de plusieurs étapes, y compris la chromatographie d'affinité. La préparation d'une quantité relativement importante de l'AO purifiée a été réalisée en quatre étapes: (a) germination des graines, (b) fractionnement au sulfate d'ammonium, (c) chromatographie par échange d'ions (diéthylaminoéthylcellulose) et (d) chromatographie par affinité sur du 6-aminohexyle -Sepharose 2B. Les trois dernières étapes ont été réalisées à 4 °C. À l'étape (d), afin de créer la colonne d'affinité pour atteindre un degré de purification plus élevé, différentes résines d'affinité ont été préparées par immobilisation covalente de polyamines sur du Sepharose. La colonne d'affinité de type 6-aminohexyl-Sepharose 2B donne le meilleur résultat de purification, puis l'enzyme a été éluée par une solution contenant le 1,4-diaminocyclohexane comme éluant compétitif.

Cette méthode a été utilisée pendant des années avec des petits changements. Par exemple Šebela a ajouté Cu (II) 1 µM au tampon d'extraction et il a aussi utilisé les différents types de colonne chromatographique DEAE-cellulose SH-23 et la colonne d'hydroxyapatite (Šebela *et al.*, 1997).

Les différentes méthodes expliquées de purification de l'AO à partir des sources végétales ont eu un rendement bas. Pendant la procédure longue de purification de l'AO, la quantité de l'enzyme et aussi son activité enzymatique diminuent. Les méthodes plus simples et rapides sont préférables.

CHAPITRE II

TECHNOLOGIES DE SÉCHAGE ET MÉTHODES DE STABILISATION DES ENZYMES

La plupart des protéines, particulièrement les enzymes, ne sont pas toujours stables, ce qui établit un défi majeur pour les scientifiques du domaine biopharmaceutiques. De plus, il faut noter que les protéines thérapeutiques ont des poids moléculaires plus élevés et une structure plus compliquée que les médicaments chimiques conventionnels (Emami et al., 2018). Elles sont sensibles aux composés chimiques et aux dégradations physiques tels que l'oxydation, la désamination, l'hydrolyse, les changements conformationnels, l'adsorption indésirable sur les surfaces, la précipitation et l'agrégation (Morais et al., 2016). Les contraintes environnementales telles que les pH extrêmes, les températures élevées, la lumière, l'agitation et les solvants organiques sont des facteurs qui affectent la stabilité des protéines, en particulier lorsqu'elles sont en solution (Daugherty et Mrsny, 2006). En conséquence, l'élimination de l'eau et l'inclusion de protéines dans une matrice sont de bonnes approches pour améliorer le stockage à long terme et réduire la dégradation physicochimique des protéines (Maltesen et van de Weert, 2008). Sous forme de poudre, elles peuvent offrir une bonne durée de conservation et conserver leur activité à la température ambiante (≤ 25 °C) (Mensink et al., 2017). La déshydratation est une approche simple et économique dont le but consiste à changer l'état liquide des enzymes en état solide plus stable (Langford et al., 2017). Il existe différentes méthodes pour sécher les protéines. Étant donné que les protéines sont sensibles aux différents stress environnementaux, les techniques disponibles pour la production de composés biopharmaceutiques séchés sont limitées par des facteurs tels que: le temps de production, la température, la pression et divers stress liés aux processus. Chaque processus de séchage doit prendre en compte la nature du matériel enzymatique et son mode d'administration (Emami *et al.*, 2018).

2.1 Techniques de séchage

En règle générale, le séchage comporte trois étapes, qui peuvent être effectuées simultanément :

Dans la première, l'énergie est transférée d'une source externe vers la solution. La deuxième étape est la transformation de la phase liquide soit en une phase vapeur ou soit en phase solide. Enfin la dernière; la vapeur va être sortie avec la formation des produits pharmaceutiques séchés (Emami *et al.*, 2018). Les caractéristiques des particules séchées peuvent être influencées par différents paramètres, tels que la température, la pression, l'humidité relative et le débit de la solution à sécher (Guerrero *et al.*, 2016). Le séchage par élimination de l'eau peut être classifié en trois principaux procédés;

- Le séchage peut être effectué à l'aide d'un mécanisme d'évaporation, tel que le séchage sous vide ou le séchage en mousse;
- les méthodes d'évaporation et d'atomisation telles que le séchage par pulvérisation;
- mécanismes de sublimation tels que la lyophilisation (Abdul-Fattah *et al.*, 2007).

Ces deux dernières méthodes sont les plus utilisées dans l'industrie pharmaceutique et seront plus détaillées dans la suite du projet.

2.1.1 Séchage par pulvérisation

Le séchage par pulvérisation (nébulisation, *spray drying*) est une méthode qui peut générer des protéines solides pour les applications pharmaceutiques (Ameri et Maa,

2007). Le séchage par pulvérisation se réalise généralement en une seule étape. Elle peut fournir des particules de protéines séchées avec la taille et la morphologie requises. La technologie de séchage par pulvérisation se déroule suivant un ordre bien précis : l'atomisation, le séchage et la séparation des particules. La solution de protéines est pulvérisée par des buses dans une chambre de séchage (figure 2.1). La formation de gouttelettes et ensuite la déshydratation, sont effectuées très rapidement dans cyclone de séchage chaud. À la fin, les poudres de protéines sont récuperées. Vu que la procédure de cette méthode est courte, c'est une technique utilisable pour produire des poudres à partir des solutions contenant des protéines (Ajmera et Scherliess, 2014).

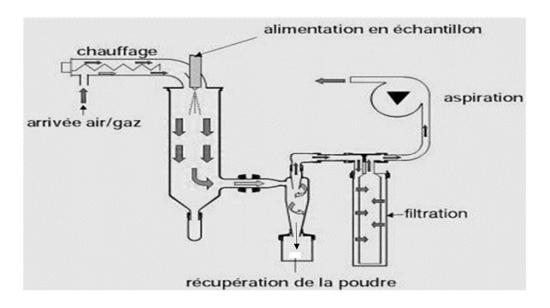


Figure 2.1 Principe de séchage par pulvérisation; d'après (Nguyen, 2014)

La concentration des protéines en solution, le débit d'alimentation et le débit d'azote chaud, ainsi que la température d'entrée sont des paramètres de processus ajustables dans la méthode de séchage par pulvérisation.

Comme principal inconvénient si la protéine est thermosensible, pendant l'étape d'atomisation, la perte de la couche d'hydratation au contact de l'air (azote) chaud et

l'exposition à l'interface air /liquide à la surface de la gouttelette, peut provoquer la dégradation de protéines lors de la pulvérisation (Ajmera et Scherliess, 2014). De plus, cette technique peut induire une contrainte de cisaillement dans la structure de la protéine pendant l'étape d'atomisation. Les applications de la technologie du séchage par pulvérisation sont nombreuses. Elle est présentée dans l'industrie des produits chimiques, l'agroalimentaire, la pharmaceutique et la mise au point des microorganismes probiotiques. Toutefois, cette technique n'est pas recommandée pour les protéines thermosensibles (Emami *et al.*, 2018).

2.1.2 Lyophilisation

La lyophilisation est largement utilisée dans le domaine pharmaceutique pour améliorer la stabilité au stockage à long terme des médicaments instables, en particulier des médicaments à base de protéines (Heljo *et al.*, 2013; Tang et Pikal, 2004).

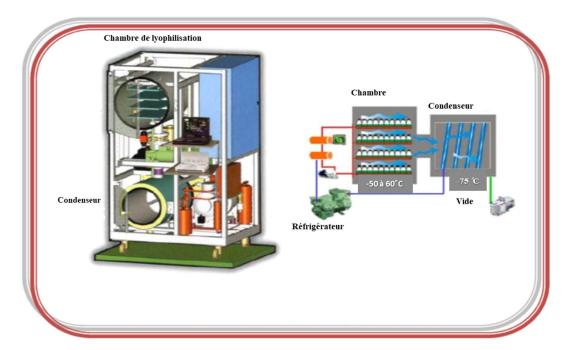


Figure 2.2 présentation schématique des différents systèmes de lyophilisation; d'après (Bogdani, 2011)

La lyophilisation est l'élimination de l'eau à l'état de glace par sublimation. Dans ce processus, les extraits de protéines sont d'abord congelés puis séchés par sublimation sous vide.

Par rapport à la protéine en solution, les poudres lyophilisées ont non seulement l'avantage d'avoir une meilleure stabilité, mais elles sont également plus faciles à transporter et à entreposer. Si le cycle de lyophilisation n'est pas optimisé, la lyophilisation peut durer plusieurs jours ou plusieurs semaines (Carpenter *et al.*, 1997). Un processus de lyophilisation comprend trois étapes; congélation, séchage primaire et séchage secondaire (Tang et Pikal, 2004).

2.1.2.1 Congélation

La congélation est la première étape de la lyophilisation où la plus grande partie de l'eau est retirée du médicament pour former la glace. Le système se sépare en plusieurs phases et des interfaces entre la glace et le médicament se forment. La congélation induit souvent de nombreux stress déstabilisants pour les protéines. L'une de ces contraintes est l'augmentation de la concentration de protéines qui améliore l'interaction protéine-protéine, menant à l'agrégation. Au fur et à mesure que la congélation progresse, la phase de soluté devient très concentrée, qui est appelée « concentration de congélation ». À la fin de la congélation, la concentration de congélation ne contient généralement plus qu'environ moins de 1% de l'eau au total (Heller et al., 1999). Un autre stress causé par la congélation est le changement de pH résultant de la cristallisation des sels tampons. La formation de glace élimine l'eau en vrac de la phase protéique et provoque une augmentation considérable de la force ionique. Ce changement de la force ionique est un facteur de stress qui affecte la stabilité des protéines pendant la lyophilisation (Tang et Pikal, 2004). L'introduction d'interfaces glace-solution aqueuse et les changements de pH sont bien connus pour causer des problèmes de stabilité des protéines. Le changement du pH pendant la congélation peut être minimisé en choisissant les tampons idéaux et en réduisant leur

concentration à quelques millimolaire (Murase et Franks, 1989). Les tampons de phosphate (Jiang et Nail, 1998), de succinate et de tartrate ne sont pas convenables pendant la congélation. La dégradation des protéines à l'interface glace-solution aqueuse peut être minimisée en utilisant des tensioactifs (Chang *et al.*, 1996). Pour une formulation protéique donnée, la planification du processus de congélation joue un rôle très important dans la stabilisation des protéines.

L'un des facteurs importants pendant la procédure de congélation est le taux de refroidissement. Une approche pratique de la stabilisation consiste à minimiser la surface de la glace en développant de gros cristaux de glace, ce qui peut être réalisé en réduisant la température de surfusion. Plus le taux de congélation est élevé, plus les cristaux de glace sont petits et nombreux, résultant la surface spécifique de la glace plus grande (figure 2.3). Si la congélation est rapide, la grande surface spécifique de la glace provoque le dépliement partiel des protéines et en conséquence, la récupération de l'activité des protéines est faible. D'autre part, la congélation lente peut augmenter les dommages causés aux protéines dans les systèmes prédisposés à la séparation de phases, car c'est un processus cinétique qui se produit avec le temps de refroidissement (Heller et al., 1999). Si la séparation de phases entraîne la séparation de la protéine et du stabilisant, l'effet de stabilisation sera perdu. Alors, le taux de refroidissement doit être optimisé en fonction du système appliqué. Strambini et Gabellieri (Strambini et Gabellieri, 1996) ont utilisé la durée de vie de phosphorescence de résidus de tryptophane pour démontrer que la congélation de solutions protéiques aqueuses pourrait causer le déploiement partiel des protéines. Ils ont aussi montré qu'avec congélation, la protéine perd le repliement natif et en conséquence, elle perd sa structure secondaire et tertiaire. Ce phénomène est largement réversible, mais une petite fraction des protéines étudiées n'était pas récupérée, ni les propriétés initiales de la phosphorescence, ni son activité enzymatique. Un refroidissement lent entraînait une perturbation moins importante de la durée de vie de la phosphorescence, probablement parce que des cristaux de glace plus gros se formaient avec une surface de glace

relativement faible (Jiang et Nail, 1998). Il y a différentes méthodes de congélation: La congélation à l'azote liquide, le chargement des flacons sur des étagères pré-refroidies et le refroidissement par rampe sur les étagères, qui donnent différents effets de surfusion.

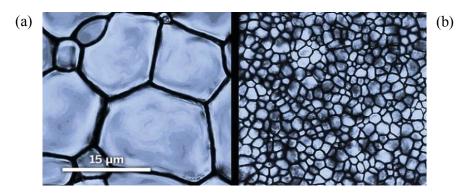


Figure 2.3 Effet du taux de refroidissement sur la taille des cristaux de glace. Le taux congélation basse (a) et élevée (b); d'après (Halford, 2014)

La congélation à l'azote liquide cause normalement la surfusion la plus élevée (les glaces petites et nombreuses, avec une grande surface spécifique de la glace) et la surfusion est minimale par la méthode de refroidissement sur les étagères prérefroidies. Après la congélation, le produit doit être maintenu suffisamment longtemps à la température basse jusqu'à ce que toute la solution soit transformée en solide. De plus, en raison de la conductivité thermique limitée entre les flacons et l'étagère, la congélation complète nécessite un temps considérable (Tang et Pikal, 2004).

2.1.2.2 Le séchage primaire, sous vide

Le séchage primaire est une étape dans laquelle la glace séparée de la solution est éliminée par sublimation sous vide, tandis que la température du produit reste relativement constante (Craig *et al.*, 1999). La température de l'échantillon est un paramètre plutôt critique qui doit être optimisé, mais étant donné qu'elle dépend des propriétés des formulations, de la température de conservation et de la pression de la

chambre du lyophilisateur, elle ne peut pas être contrôlée directement pendant le séchage primaire. La température doit être contrôlée avant cette étape. Ce contrôle de température pourrait être difficile et prendre beaucoup de temps, mais le séchage primaire occupe normalement la plus grande partie du temps du cycle de lyophilisation. Ainsi, l'optimisation de cette partie du processus a un impact économique significatif (Tang et Pikal, 2004). Les procédés de lyophilisation non optimisés peuvent augmenter le temps de traitement, et compromettre la qualité du produit final. Afin d'ajuster la température des produits dans cette étape, trois températures doivent être considérées. La température de transition vitreuse (Tg), l'effondrement/le collapse (Tc) et la température du produit (Tp). Dans l'étape de congélation, le produit en solution est congelé et solidifié en continu à l'état non cristallin (vitreux). Ce processus est appelé vitrification ou transition vitreuse (Hua et al., 2010), alors pendant le séchage, Tg est la température à laquelle le produit gelé passe à une forme flexible en préservant sa tructure. La température de l'effondrement est la température à laquelle le produit ne peut plus préserver sa structure et commence à s'éffondrer pendant le séchage. La Tp est la température du produit lors du séchage qui est de plusieurs degrés en dessous de Tc afin d'obtenir un produit sec avec un apparence acceptable (Tang et Pikal, 2004).

La Tg et la Tc connues d'un système permettent une plus grande prévisibilité de la procédure de séchage. Hatley (Hatley, 1992) a montré que durant le séchage primaire, une température au-dessus de la Tc donne des échantillons lyophilisés de qualité inférieure. D'un autre côté, une élévation de température de 1 °C accélèrerait le séchage de 13% (Craig *et al.*, 1999). Alors, il est essentiel de sécher le matériau en dessous de la température de collapse (Tc) et au-dessus de la température de la transition vitreuse pour obtenir un produit sec qui a une apparence acceptable. Dans la plupart des cas, elle est 20 °C supérieure à la Tg (Craig *et al.*, 1999). Ainsi, pour avoir un processus de lyophilisation optimisé, la température du produit doit être aussi élevée que possible. La différence de température entre Tp et Tc s'appelle la marge de sécurité en température. Il est suggéré d'utiliser une petite marge de sécurité (2 °C) si le temps de

lyophilisation est long (par exemple, plus de 2 jours), mais si le temps de lyophilisation est court (< 10 h), une grande marge de sécurité (5 °C) est nécessaire et à la fin, une marge de sécurité de 3 °C si le temps de séchage primaire est compris entre 10 et 48 heures (Pikal, 1990).

Un autre facteur important qui doit être optimisé est la pression de la chambre de lyophilisation ou la qualité du vide. Le séchage primaire est effectué à basse pression pour améliorer le taux de sublimation de la glace. La pression de la chambre (Pc) a un impact sur les transferts de chaleur et de masse, et constitue un paramètre important pour la conception du processus de lyophilisation. La Pc doit être bien en dessous de la pression de vapeur de la glace à la température du produit (Tp) pour permettre un taux de sublimation élevé. Le taux de sublimation est la masse de glace sublimée (g) par unité de temps (heure). La surcharge du lyophilisateur entraîne généralement une perte de contrôle de la pression de la chambre et de la température du produit (Tang et Pikal, 2004).

2.1.2.3 Séchage secondaire

En plus de la glace libre qui est sublimée lors du séchage primaire, il reste une quantité importante de molécules d'eau liées au produit. Cette eau doit être éliminée (désorbée) lors du séchage secondaire. Immédiatement après le séchage primaire, un produit amorphe contient encore une bonne quantité d'eau résiduelle : 5 à 20% sur la base de la matière sèche, en fonction de la formulation. L'objectif du séchage secondaire est de réduire la teneur en humidité résiduelle à un niveau optimal pour la stabilité, généralement moins de 1% (Tang et Pikal, 2004). La température des produits pour le séchage secondaire est beaucoup plus élevée que celle utilisée pour le séchage primaire, généralement entre 30 et 50 °C et cela cause une désorption beaucoup plus rapide. Les taux de séchage secondaires dépendent de la température du produit. Le vide du système peut être maintenu au même niveau utilisé pendant le séchage primaire; des niveaux de vide plus faibles n'amélioreront pas les temps de séchage secondaires. Le

séchage secondaire est poursuivi jusqu'à ce que le produit présente une teneur en humidité acceptable pour un stockage à long terme. Dans la plupart des cas, plus le produit est sec, plus la durée de vie de l'entreposage de produit est long, mais si le produit final est trop sec, certains produits biologiques complexes pourraient perdre leur humidité résiduelle et en réalité perdre leur stabilité (Alkeev *et al.*, 2015; Barley, 2018). Alors, le processus de séchage secondaire doit être contrôlé. En fonction de l'application, la teneur en humidité dans les produits entièrement secs est généralement comprise entre 0,5% et 3% (Alkeev *et al.*, 2015; Barley, 2018).

2.1.3 Comparaison de la lyophilisation et du séchage par pulvérisation

Chaque technique de séchage a des avantages et des inconvénients (tableau 2.1).

Tableau 2.1 Les avantages et les inconvénients de séchage par pulvérisation ou lyophilisation

	Séchage par pulvérisation	Lyophilisation		
Avantages	-Vitesses de séchage élevées - Simple (en une seule étape) - Rentable - Reproductible - Une large gamme de composés	- Sous vide: absence d'air -Température basse: donc plus adaptée aux composés sensibles		
Inconvenients	 Le rendement dépend de l'échelle de travail Température élevée : dégradation de produit 	- Faible vitesse de séchage- Coût élevé- Faible capacité de production		

Vu que dans la méthode de lyophilisation un refroidissement en profondeur et une grande consommation d'énergie sont nécessaire, la méthode de séchage par pulvérisation est plus rentable. L'avantage du séchage par lyophilisation est que l'absence d'air prévient la détérioration due à l'oxydation ou à la modification chimique des produits au cours du séchage.

En fait, le séchage cause des contraintes liées au changement de température et à la déshydratation des protéines, ce qui peut entraîner leur dénaturation. Il y a des cryoprotecteurs qui peuvent constituer une couche fonctionnelle autour de la protéine et empêcher son exposition à l'interface de surface (en cas de lyophilisation) ou à l'atmosphère chaude (en cas de pulvérisation) (Costantino *et al.*, 2002). Le choix rationnel des stabilisants et l'optimisation des variables du processus sont des approches essentielles pour garantir la stabilité des protéines et atteindre les propriétés souhaitées pour les poudres.

2.2 Stabilité de l'AO végétale en solution et en poudre

À l'entreposage l'amine oxydase obtenue des sources végétales (soja) en solution était stable environ 1 mois dans un tampon phosphate de potassium 5 mM, pH 7 à 4 °C et elle peut retenir l'activité enzymatique pendant 5 mois à - 80 °C (Vianello *et al.*, 1993). Afin d'améliorer la stabilité des protéines pendant l'entreposage, elles peuvent être intégreés dans une matrice solide (Depreter *et al.*, 2013) par plusieurs techniques, dont la lyophilisation (Kanojia *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2016). Le séchage par lyophilisation provoque la dénaturation des protéines à cause des contraintes liées à la congélation et à la déshydratation des protéines (Lim *et al.*, 2016; Pieters *et al.*, 2012; Roy et Gupta, 2004). L'amine oxydase végétale de la fève de soya, préserve 60% de l'activité initiale après la lyophilisation dans NaCl ou (NH₄)₂SO₄ (1mM) tandis que la lyophilisation de l'amine oxydase d'origine animale (provenant du plasma) préserve 80-85% de l'activité initiale (Yamada et Yasunobu, 1962).

2.3 Les cryoprotecteurs

Un cryoprotecteur est une substance utilisée pendant la lyophilisation pour protéger le matériel biologique contre les dommages causés par cette méthode. Les cryoprotecteurs peuvent être ajoutés à la solution de protéine avant la congélation pour

surmonter des contraintes causées par la congélation et aussi par la déshydratation. Ils peuvent améliorer la stabilité des protéines pendant entreposage. Cependant, ces stabilisants sont à large spectre et ne peuvent pas garantir la stabilité adéquate de toutes les protéines (Kanojia *et al.*, 2016).

Les cryoprotecteurs présentent des effets bénéfiques (Abdelwahed *et al.*, 2006), (Mensink et al., 2017) comme:

- Prévenir les tensions dans les protéines pendant les étapes de congélation et de séchage
- Fournir une protection partielle ou totale pendant le processus de séchage

Plusieurs sucres ont été utilisés comme cryoprotecteurs, notamment des monosaccharides (glucose, fructose, mannitol), des disaccharides (maltose, sucrose, tréhalose et lactose) et des polysaccharides (dextran, CMC). Les cryoprotecteurs les plus utilisés sont le tréhalose, le saccharose, le fructose, le glucose et le maltose, qui ont des propriétés chimiques semblables (Morais *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2008).

2.3.1 Le rôle des cryoprotecteurs et lyoprotecteurs pendant la lyophilisation

Dans la nature, les cellules de levure de boulanger accumulent des osmolytes en réponse aux plusieurs conditions de stress, telles que les changements de température et la déshydratation. L'un des principaux osmolytes qui s'accumule est le tréhalose, qui protège la fonction et la structure des enzymes cytosoliques de levure contre la dénaturation chimique par le chlorure de guanidinium (Sola-Penna *et al.*, 1997). Les cryoprotecteurs, qui sont solubles dans l'eau, doivent être relativement non toxiques même à haute concentration. Tous les cryoprotecteurs forment des liaisons hydrogène avec de l'eau. Depuis la découverte du glycérol comme premier cryoprotecteur, il y a plus de 50 ans (Polge *et al.*, 1949), environ 100 composés ont été explicitement identifiés et étudiés. Les stabilisants peuvent protéger les protéines pendant la

congélation (cryoprotecteurs) et la lyophilisation (lyoprotecteurs). Ils protègent la protéine contre la dénaturation par différents mécanismes (Emami *et al.*, 2018) :

- Diminution d'agrégation avec le rôle de la dispersion protéique
- L'effet sur la vitrification
 - L'augmentation de la température de transition (Tg)
 - La protection des protéines contre les cristaux de glace
- Remplacent des molécules d'eau dans la structure de la protéine à l'état solide

2.3.1.1 L'exclusion préférentielle

L'eau devient de la glace pendant l'étape de congélation qui se sépare des autres composantes de la formulation. Ensuite, la protéine peut commencer à s'agréger de manière irréversible, ce qui provoque la déstabilisation du système (Morais *et al.*, 2016; Wang, 2000). Cependant, en présence de cryoprotecteurs, les dommages lors de la congélation peuvent être évités (figure 2.4).

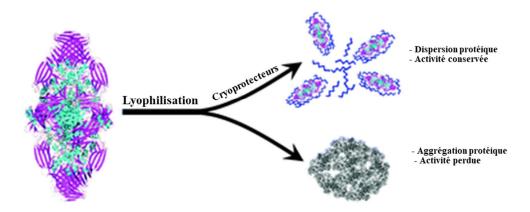


Figure 2.4 Dispersion de protéines en présence des cryoprotecteurs pendant la lyophilisation; d'après (Li *et al.*, 2019)

À une vitesse optimale de congélation, les cryoprotecteurs peuvent migrer vers la phase liquide concentrée et disperser les protéines en diminuant les interactions protéine-protéine qui empêchent l'agrégation des protéines (Costantino *et al.*, 2002). Ce mécanisme ne peut pas se produire pendant la congélation rapide parce que les cryoprotecteurs n'ont pas de temps pour diffuser complètement vers la phase liquide concentrée. Cependant, l'ajout d'une quantité appropriée de cryoprotecteurs à une vitesse de congélation élevée peut améliorer ces processus (Lee *et al.*, 2009). La comparaison structurale par MET de la β-galactosidase (β-Gal) avant et après la lyophilisation montre l'agrégation après la lyophilisation (figure 2.5 a et b).

La β -Gal fraîche dispersée de manière homogène avait une taille de particule comprise entre 15 et 20 nm (Fig. 2.5 a).

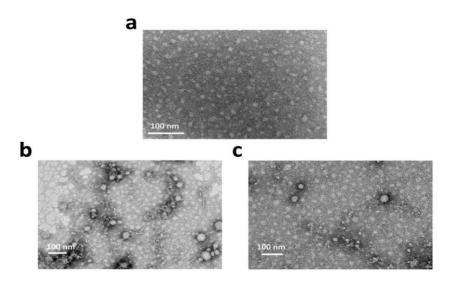


Figure 2.5 Images MET de β-Gal (a) avant lyophilisation; (b) après lyophilisation et sans protection et c) après lyophilisation en présence de cryoprotecteur; d'après (*Li et al.*, 2019).

La β-Gal lyophilisée sans protection présente des aggrégations de grandes tailles évidentes et aux formes irrégulières (Fig. 2.5 b). Lorsque la β-Gal était lyophilisée en présence de cryoprotecteurs, la protéine se dispersait toujours bien et avait une taille moyenne comprise entre 20 et 30 nm (Fig. 2.5 c) (Li *et al.*, 2019).

2.3.1.2 La vitrification au point de vue d'augmentation de la température de transition vitreuse

La température plus basse de la lyophilisation ne garantit pas la stabilité des protéines car de nombreuses protéines subissent une dénaturation à cause de la présence de cristaux d'eau (une dénaturation aux interfaces protéine – air et protéine – glace). Elle rend la procédure de séchage plus longue et déstabilise les protéines. Cela signifie que la protéine doit être lyophilisée en toute sécurité à une température plus élevée que la Tg, permettant ainsi un processus de séchage beaucoup plus rapide (Liao *et al.*, 2004; Tang et Pikal, 2004). Les cryoprotecteurs peuvent augmenter cette température.

La Tg d'un système est relative et dépend de nombreux facteurs tels que le type de sucre utilisé (seul ou en mélange) ou la concentration des protéines et des sucres. Les courbes de la température de transition vitreuse dans différentes études montrent une grande variation, jusqu'à \pm 20 °C aux mêmes concentrations des sucres. Dans ces études, la Tg du tréhalose se situe entre 75 et 120 °C. Toutes les études confirment que la Tg du tréhalose est supérieure à celle du saccharose. En résumé, les valeurs de Tg pour le glucose pur, le saccharose et le tréhalose ont été déterminées à 30 ± 1 , 58 ± 1 , 108 ± 3 °C respectivement.

Liao et al. (Liao et al., 2004) ont montré par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), l'effet des cryoprotecteurs, tels que le glycérol, le saccharose, le tréhalose et le dextran, sur la stabilité des protéines lyophilisées. Selon leurs études, la combinaison de tréhalose et de saccharose pouvait augmenter la Tg des protéines lyophilisées, stabilisant la protéine dans les formulations lyophilisées (Liao *et al.*, 2004). La Tg des formulations lyophilisées et la stabilité des protéines pendant la lyophilisation dépendent du type des cryoprotecteurs, de la taille et la flexibilité moléculaire des sucres, ainsi que du rapport de masse des cryoprotecteur à l'enzyme (Liao *et al.*, 2004; Tonnis *et al.*, 2015). Parmi les protéines lyophilisées préparées en présence ou en absence de disaccharide (tréhalose) ou des polysaccharide (inuline, 4

kDa; dextran, 6 kDa; dextran à 70 kDa), celles préparées en présence du plus petit sucre (tréhalose) ont présenté une grande stabilité. De plus, l'inuline (oligosaccharide souple) conférait une plus grande stabilité aux protéines qu'un polysaccharide rigide dextrane. La combinaison du polysaccharide dextran et du tréhalose a considérablement augmenté la Tg de la formulation et amélioré la stabilité des protéines, par rapport aux formulations contenant du dextrane seulement (Tonnis *et al.*, 2015). Bref, la température de transition vitreuse (Tg) des sucres dépend du poids moléculaire du sucre ainsi que des interactions intermoléculaires. Parmi les disaccharides, le tréhalose a une température de transition vitreuse anormalement élevée de près de 50 - 60 °C supérieure à celle du saccharose qui a le même poids moléculaire (Zhang *et al.*, 2017).

2.3.1.3 La vitrification au point de vue de la protection des protéines contre les cristaux de glace

La plupart des liquides se condensent lorsqu'ils gèlent, parce que les liens les plus étroits sont plus forts tandis que l'eau se dilate. En fait, l'eau montre également un comportement de contraction due au refroidissement jusqu'à 4 °C. Mais lorsqu'elle refroidit à des températures inférieures à celle-ci, elle commence à se dilater en volume. En effet, les molécules d'eau commencent à entrer dans une structure de réseau hexagonal qui contient plus d'espace que l'état liquide. Les molécules d'eau sont plus stables dans ce réseau hexagonal. C'est une structure très ouverte avec beaucoup d'espace intermoléculaire (figure 2.6). Les sucres sont des composés qui contiennent plusieurs groupes hydroxyle dans leur structure et sont capables de former un mélange eutectique avec de l'eau. Ce nouveau composé a des nouvelles propriétés qui forment des cristaux amorphes solides de glace. Cet effet diminue l'extrusion de cristaux de glace et les dommages mécaniques contre les protéines (Zhang *et al.*, 2008). Un autre mécanisme de protection, basée sur la vitrification est l'immobilisation globale de la protéine dans une matrice de sucre vitreuse, amorphe et rigide (Slade et Levine, 1991).

À la présence des cryoprotecteurs, l'interaction des groupes hydroxyle du cryoprotecteur avec les molécules d'eau et les groupes hydroxyle libres à la surface de la protéine augmente la viscosité de la solution, réduit la vitesse de cristallisation dans la glace et limite les phénomènes mécaniques et le stress (Sussich *et al.*, 2001).

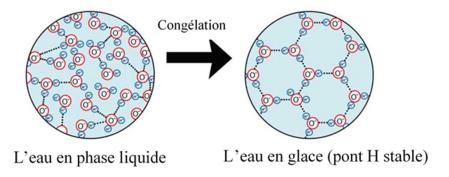


Figure 2.6 Dilatation de l'eau pendant la congélation (Bhuyan et Mukherjee, 2019)

Il y a une autre hypothèse de formation des poches non-congelées autour de la protéine par des cryoprotecteurs. Pendant la congélation, les cryoprotecteurs appropriés aident à former de grandes poches dégelées. Ces poches aident à prévenir la formation de cristaux et les dommages mécaniques. À l'aide de la vitrification, les protéines sont encerclées dans la poche vitreuse non congelée contenant le cryoprotecteur. Étant donné que la température de transition vitreuse (Tg) du tréhalose est supérieure à celle du saccharose, cela lui permet de rester vitrifié à des températures plus élevées que le saccharose (Crowe *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2017).

2.3.1.4 Remplacement de l'eau structurale des protéines

Les protéines lient généralement de nombreuses molécules d'eau en solution. Lorsque l'eau est éliminée pendant le séchage, les cryoprotecteurs forment des liaisons hydrogène avec la protéine pour réduire la mobilité locale de la protéine et créer un

environnement semblable à l'eau autour de la protéine pour préserver sa structure secondaire et tertiaire (Allison *et al.*, 1999; Carpenter *et al.*, 1994). En fait, les sucres empêchent les déplacements de la bande amide II qui est reliée à la structure secondaire de la protéine et la liaison hydrogène pendant le séchage (Carpenter et Crowe, 1989). Alors, les molécules hydrophiles de sucres peuvent être incorporées à la formulation de protéines en tant que lyoprotecteurs pour surmonter la dénaturation des protéines et préserver la stabilité pendant la lyophilisation (Ajmera et Scherliess, 2014; Liao *et al.*, 2004).

En résumé, l'optimisation de procédures et les combinaisons appropriées d'additifs en tant que stabilisants sont des exigences pour atteindre des produits lyophilisés stables (Costantino *et al.*, 2002). La concentration du cryoprotecteur est très importante pour la stabilisation des protéines. Des concentrations élevées de cryoprotecteurs montrent une meilleure activité protectrice. Cependant, une fois la limite de stabilisation atteinte, une concentration plus élevée peut induire une déstabilisation de la protéine (Abdelwahed *et al.*, 2006). La concentration idéale de cryoprotecteur dépend de différents facteurs, tels que la composition du système, la vitesse de refroidissement et la température de congélation (Sussich *et al.*, 2001).

2.4 La contribution de l'eau à la structure des amine oxydases

L'hydratation des protéines est essentielle pour leur structure tridimensionnelle (Tompa et al., 2015) et leur activité (Tompa et al., 2015). L'examen des structures cristallines aux rayons X pour l'AO végétale indique une interface dimère extrêmement hydratée, avec les sous-unités qui se tiennent entre elles étroitement (Mure et al., 2002). En fait, deux canaux d'eau, un de chaque côté du TPQ, sont observés dans la structure qui fournit un accès entre le site actif et le solvant (figure 2.7). Ces canaux permettent un accès direct du solvant à l'interface dimère par lequel l'oxygène moléculaire peut entrer et le peroxyde d'hydrogène s'écarter (Li et al., 1998; Mure et al., 2002). Le réseau de liaisons hydrogène autour du site actif implique des molécules d'eau coordonnées et

non-coordonnées aux métaux (Kishishita *et al.*, 2003). Alors, il y a une hypothèse que les cryoprotecteurs peuvent stabiliser les amine oxydases par interférence avec ces molécules d'eau en préservant ce canal.

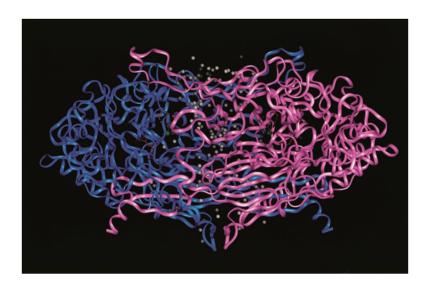


Figure 2.7 Interface dimère montrant le canal avec les molécules d'eau (en gris). Les sous-unités sont indiquées en rose et en bleu; d'après (Mure *et al.*, 2002)

CHAPITRE III

DYSFONCTIONS LIÉES AUX AMINES BIOGÈNES ET AUX AMINE OXYDASES

3.1 Les amines biogènes

Les amines biogènes sont des substances endogènes ou exogènes avec un ou plusieurs groupes amines. Elles sont des composés azotés basiques formées principalement par décarboxylation d'acides aminés (figure 3.1) ou par amination et transamination d'aldéhydes et de cétones (Rice et Koehler, 1976).

3.1.1 Composition, nature et fonction des amines biogènes

Les amines biogènes sont des bases organiques de faible poids moléculaire qui sont synthétisées par les métabolismes microbiens, végétaux et animaux (Brink *et al.*, 1990). Ces composés ont une ou plusieurs charges positives (suite à la captation d'un ion hydronium) et certains possèdent un caractère hydrophobe (Costa *et al.*, 2018). Selon le nombre de groupements amines, les amines biogènes pourraient être classées en monoamines, diamines et polyamines. Ces amines biogènes sont classées en trois groupes principaux: aliphatiques (cadavérine, putrescine, spermidine, spermine); aromatiques (phényléthylamine, tyramine); hétérocycliques (tryptamine, histamine) (Santos, 1996). Les amines telles que les polyamines, la putrescine, la spermidine, la spermine et la cadavérine sont des composés indispensables aux cellules vivantes pour leur croissance, régénération et leur métabolisme, et aussi, de façon indirecte pour la synthèse des protéines, ADN et ARN (Bardocz, 1995).

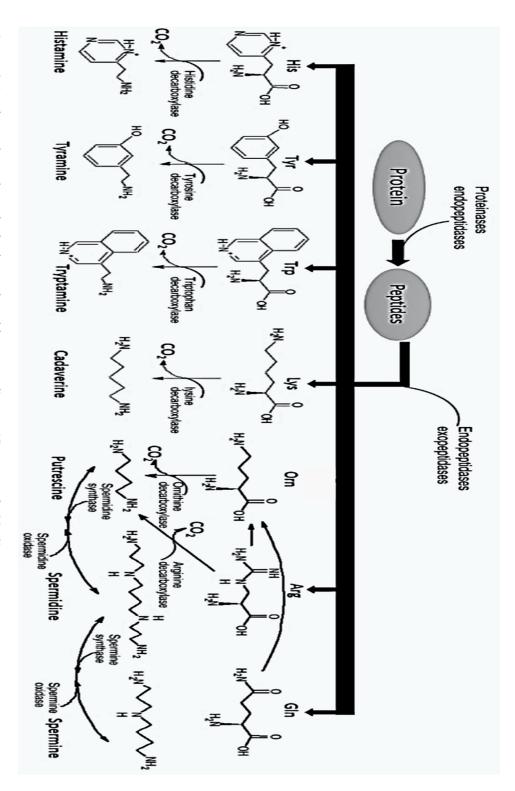


Figure 3.1 Biosynthèse des principales amines biogènes; d'après (Costa et al., 2018).

À faible concentration, les amines biogènes sont essentielles aux fonctions métaboliques et physiologiques normales des animaux, des plantes et des microorganismes. Les plantes accumulent un certain nombre d'amines spécifiques comme la putrescine, la spermidine et la spermine sous des formes libres ou conjuguées. Dans des tissus végétaux, les amines biogènes sont impliquées dans le développement et la division cellulaire, dans la floraison, dans le développement des fruits ainsi que dans les signaux environnementaux (Handa et Mattoo, 2010). Étant donné que des amines existent dans les plantes, la qualité des aliments et des boissons d'origine végétale doit être contrôlée (Bouchereau et al., 2000). Chez l'humain, les amines biogènes jouent un rôle important dans l'activité cérébrale, dans la régulation de la température corporelle, dans le contrôle du pH de l'estomac, dans la sécrétion d'acide gastrique, dans la réponse immunitaire, dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (Ladero et al., 2010). Les amines biogènes classiques comme la sérotonine, la noradrénaline, la dopamine et l'histamine jouent un rôle important en tant que neurotransmetteurs. Ces neurotransmetteurs sont synthétisés à partir d'acides aminés précurseurs dans des neurones spécifiques et stockés dans des vésicules aux terminaisons synaptiques afin d'être libérés dans la fente synaptique en réponse à la dépolarisation neuronale (Premont et al., 2001). Leur biosynthèse est essentielle dans les cellules eucaryotes, étant donné que ces composés sont des sources d'azote et des précurseurs de la synthèse d'hormones, d'alcaloïdes, d'acides nucléiques et de protéines essentielles à la physiologie (Ancín-Azpilicueta et al., 2019; Premont et al., 2001).

L'une de ces amines biogènes est l'histamine. Les divers effets de l'histamine sur la régulation immunitaire sont dus à l'expression différentielle et à la régulation de quatre récepteurs d'histamine et à leurs signaux intracellulaires distincts (Jutel *et al.*, 2009). Elle joue un rôle important dans la régulation du cycle veille-sommeil (Passani *et al.*, 2007). Cette amine est également importante pour le système digestif car elle intervient dans la régulation de la sécrétion d'acide gastrique (Coruzzi *et al.*, 2001; Fargeas *et al.*, 1989) et elle est aussi impliquée dans la contraction des muscles lisses utérins et

intestinaux (Rangachari, 1992). En tant qu'amine biogène vasoactive, l'histamine est capable d'agir sur les récepteurs H1-H4 en activant la protéine G et de déclencher des signaux modulant les vaisseaux sanguins (Jutel *et al.*, 2009). L'histamine peut fortement augmenter la perméabilité vasculaire et réguler la pression artérielle. Elle intervient également dans la neurotransmission dans le système nerveux central (Schwartz, 1975), l'immunomodulation (Baumer et Rossbach, 2010), et la prolifération cellulaire (Molina-Hernandez et Velasco, 2008). L'histamine est produite par l'organisme lui-même et est présente dans de nombreux tissus. L'histamine est principalement générée dans les cellules entérochromaffines gastriques, les neurones histaminergiques, les basophiles, les plaquettes et les mastocytes qui la stockent dans des vésicules intracellulaires (Smolinska *et al.*, 2014).

3.1.2 Toxicologie des amines biogènes

Bien que des amines biogènes, telles que l'histamine, la tyramine et la putrescine, soient nécessaires à de nombreuses fonctions essentielles chez l'humain et les animaux, la consommation d'aliments contenant de grandes quantités de ces amines peut avoir des effets toxiques. Ces amines biogènes se trouvent dans plusieurs aliments fermentés et dans certains non-fermentés. Halász et al. (Halász et al., 1994) ont montré des taux élevés d'amine dans le jus d'orange (noradrénaline, tryptamine), la tomate (tyramine, tryptamine, histamine), la banane (tyramine, noradrénaline, tryptamine, sérotonine), la prune (tyramine, la noradrénaline) et les feuilles d'épinard (histamine). La phényléthylamine est également un constituant naturel des fèves de cacao et se retrouve dans le chocolat, des produits à base de chocolat et des confiseries contenant du chocolat. Certaines espèces de champignons contiennent également des taux élevés de phényléthylamine. Dans le poivre blanc et noir et la sauce de soja, des taux élevés de pyrrolidine ont été détectés (Pfundstein et al., 1991). La viande contient des niveaux élevés d'adrénaline, de spermidine et de spermine et des niveaux faibles de noradrénaline, de putrescine, d'histamine, de cadavérine et de tyramine (Halász et al.,

1994; Santos, 1996). De nombreux types d'amines biogènes ont été détectées dans les aliments fermentés comme les vins blancs et rouges: la tyramine, l'histamine, la tryptamine, la monométhylamine, la 2-phénéthylamine, la putrescine, la cadavérine et la spermidine (tableau 3.1). Dans les bières, la présence de tyramine a également été démontrée (Santos, 1996).

Tableau 3.1 Des amines biogènes dans différents produits alimentaires (Ladero *et al.*, 2010).

Amine Biogène (mgL ⁻¹ ou mg kg ⁻¹)							
L'aliment	Tyramine	Histamine	Putrescine	Cadavérine	phénéthylamine	Spermidine	
Soja fermenté	-	4620	12340	6340	-	-	
Tomate concentrée	10.4	4.6	25.9	5.8	-	8.4	
épinard	8	2	8	-	1	23	
Poisson	61.8	23.4	-	-	-	-	
Thon en boîte	-	20000	2000	4470	-	-	
Viande	38	-	-	-	-	19	
Vin rouge	18.2	19.6	99.9	1	1.4	2.6	
Bière	10.5	8.8	11.9	50.7	-	-	

Ces amines biogènes exogènes présentent un risque d'intoxication alimentaire (Ordóñez et al., 1997). Les caractéristiques toxicologiques de l'intoxication alimentaire sont généralement associées à l'histamine et à la tyramine. D'autres amines, telles que la putrescine, la cadavérine et la phényléthylamine, sont également importantes car elles pourraient intensifier les effets indésirables de l'histamine (Özogul et Özogul, 2019). Les amines biogènes peuvent exercer des effets vasoactifs (tyramine), des effets psychoactifs ou les deux (histamine). Les symptômes qui peuvent apparaître après une ingestion excessive d'amines biogènes par voie orale sont les suivants: nausée, détresse respiratoire, transpiration, palpitations cardiaques, maux de tête et hypotension (Rice et Koehler, 1976). Un phénomène typique est la «réaction du fromage», généralement causée par des taux élevés de tyramine dans le fromage (Schirone et al., 2011). Cependant, les intoxications d'origine alimentaire les plus graves causées par les amines biogènes sont liées à l'histamine. L'histamine est impliquée dans divers processus physiologiques tels que les réponses inflammatoires, la régulation de la motilité intestinale et la sécrétion d'acide gastrique (Fargeas et al., 1989). Elle est également impliquée dans les maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn, les ulcères gastriques et la colite ulcéreuse (Benly, 2015). Une intoxication à l'histamine est souvent évoquée comme «intoxication scromboïde du poisson ou scombrotoxicose» en raison de l'association fréquente de cette condition à la consommation de poisson scromboïde, tel que le thon, le maquereau et les sardines. La formation d'histamine dans les poissons scombroïdes et autres poissons marins contenant une abondante histidine endogène a été attribuée à l'action microbienne plutôt qu'à l'activité de la décarboxylase endogène (Halász et al., 1994; Taylor et al., 1989). L'histidine peut être catabolisée de deux manières dans le muscle du poisson. La désamination de l'histidine pour obtenir de l'acide urocanique ou la décarboxylation de l'histidine pour former de l'histamine (Mackie et al, 1977). Les effets de l'histamine sont mieux connus, probablement parce que l'histamine est impliquée dans la plupart des cas d'intoxication aux amines. En outre, l'histamine est un médiateur des troubles allergiques (White, 1990). La libération d'histamine se fait par la dégranulation des mastocytes (en réponse à une réaction allergique) et la consommation d'aliments contenant de l'histamine peut exercer les mêmes effets.

3.1.3 Dégradation de l'excès des amines biogènes

L'intolérance à l'histamine résulte d'un mauvais équilibre entre l'histamine accumulée et la capacité de dégradation de l'histamine. L'augmentation de la disponibilité d'histamine peut être due à une surproduction endogène d'histamine ou à une augmentation d'ingestion exogène d'histidine ou d'histamine (dans les aliments, l'alcool ou des bactéries), mais la cause principale est due à une dégradation enzymatique altérée de l'histamine, probablement due à une altération génétique ou à une altération des fonctions enzymatiques d'amine oxydase ou de HNMT (Kovacova-Hanuskova et al., 2015). L'histamine peut être métabolisée principalement par deux procédés, via la désamination oxydative par une enzyme à cuivre (diamine oxydase, DAO) ou via l'histamine N-méthyltransférase (HNMT) par méthylation de l'histamine (Valen et al., 1996). Ces mécanismes dépendent de la localisation de l'histamine. Chaque mécanisme génère des produits finaux différents (Kovacova-Hanuskova et al., 2015). La DAO est exprimée dans le placenta, dans les reins, dans l'intestin, dans les poumons et à des niveaux inférieurs dans le cerveau. La libération de la DAO se fait par les cellules intestinales et rénales épithéliales. Elle est libérée des vésicules basolatérales au niveau de la membrane plasmique en réponse à un stimulus externe de l'héparine et est ensuite rapidement éliminée de la circulation (McGrath et al., 2009). HNMT est une enzyme cytosolique qui inactive l'histamine intracellulaire (Kovacova-Hanuskova et al., 2015).

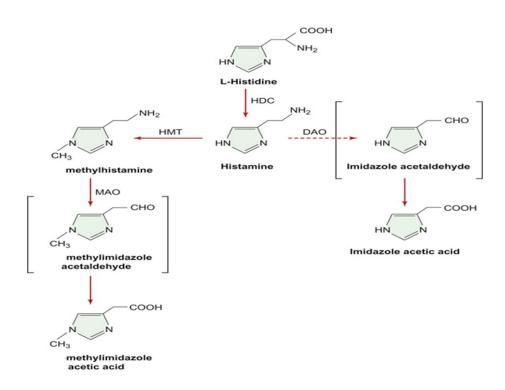


Figure 3.2 Synthèse et métabolisme de l'histamine; d'après (Leurs et al., 2012)

Les enzymes monoamine oxydase (MAO) et diamine oxydase (DAO) jouent un rôle important dans ce processus de détoxification (Bortolato et Shih, 2011). Toutefois, le système de détoxification ne parvient pas à éliminer les quantités élevées d'amines biogènes ingérées avec certains aliments pourris ou fermentés. La DAO est la principale enzyme nécessaire à la dégradation de l'histamine ingérée (Maintz et Novak, 2007). Elle catalyse la désamination oxydative de l'histamine et d'autres amines biogéniques qui libèrent des aldéhydes correspondants, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de l'ammoniac (Buffoni et Ignesti, 2000). Dans le tractus intestinal des mammifères, il existe un système de désintoxication efficace capable de métaboliser la quantité alimentaire normale d'amines biogènes.

Bien que la toxicité d'amines biogènes individuelles, en général, ne fasse aucun doute, il est très difficile de déterminer le seuil de toxicité exact de ces composés. Les effets de l'histamine et de la tyramine peuvent être augmentés par d'autres composés consommés, y compris la putrescine et cadavérine (Bjeldanes *et al.*, 1978). L'utilisation de certains médicaments (inhibiteurs de la MAO) diminue l'efficacité du système de désintoxication. De plus, la consommation de boissons alcoolisées augmente la sensibilité aux amines biogènes.

3.2 Dysfonctions liées aux Amine oxydases

Les fonctions des amine oxydases sont très importantes dans le métabolisme de dégradation des amines biogènes et le déficit de chaque type d'amine oxydase cause des désordres psychiatriques et neurologiques (Bortolato et Shih, 2011) ou des maladies inflammatoires.

3.2.1 Monoamine oxydase et dysfonctions liées à ces enzymes

Les monoaminse oxydases (MAO-A et MAO-B) appartiennent à une famille de flavoprotéines liées aux mitochondries qui catalysent la désamination oxydative des neurotransmetteurs monoamines, des neuromodulateurs, des hormones ainsi que des amines xénobiotiques. En fait, alors que la MAO-A a une forte affinité pour la sérotonine et la noradrénaline, la MAO-B sert principalement au catabolisme de la 2-phényléthylamine et contribue à la dégradation d'autres amines et aussi de la dopamine (figure 3.3) (Bortolato et Shih, 2011). En raison du rôle vital que jouent les MAOs dans l'inactivation des neurotransmetteurs monoamines, le dysfonctionnement des MAOs (trop ou trop peu d'activité) est responsable de nombreux troubles psychiatriques et neurologiques. Par exemple, des niveaux élevés ou faibles de MAO ont été associés à la schizophrénie (Domino et Khanna, 1976), à la dépression (Meyer *et al.*, 2006), au trouble du déficit de l'attention (Domschke *et al.*, 2005) et aux migraines (Filic *et al.*, 2005).

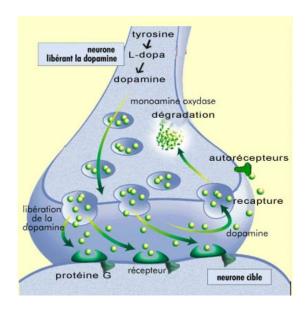


Figure 3.3 Étapes de la formation de la dopamine et sa dégradation par MAO; d'après (Neptune, 2016)

La fonction effectuée par la MAO est extrêmement critique pour la régulation de réaction d'oxydoréduction (réaction rédox) intracellulaire dans des neurones et d'autres cellules; en effet, l'un des sous-produits de la réaction médiée par la MAO, le peroxyde d'hydrogène, est un oxydant puissant qui peut déclencher la formation de radicaux superoxydes et d'autres espèces oxygénées réactives, pouvant causer des dommages mitochondriaux et cytoplasmiques (Bortolato et Shih, 2011). Dans des conditions physiologiques, le potentiel rédox global est maintenu en équilibre par des enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase; néanmoins, il a été montré que des concentrations élevées d'ammoniac (l'autre sous-produit de la réaction) diminuaient l'activité de ces enzymes et ainsi conduisaient à la formation de radicaux superoxydes (Kosenko *et al.*, 1997). L'excès d'espèces oxydantes dans le système nerveux central entraîne des dommages permanents par la mort des neurones et de la glia (Bortolato et Shih, 2011). Ces mécanismes jettent les bases théoriques de l'implication de la MAO dans la

physiopathologie de certains troubles neurodégénératifs, tels que la schizophrénie (Murphy et al., 1974), la maladie de parkinson et la démence (Bortolato et Shih, 2011; Danielczyk et al., 1988). En lien à ce concept, une augmentation de l'activité de l'isoenzyme MAO-B dans les plaquettes a été constatée chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Grunblatt et al., 2005). Enfin, la MAO joue un rôle primordial dans la dégradation des amines xénobiotiques primaires, secondaires et certaines autres, ce qui est particulièrement important pour la prévention de leur cardio et neurotoxicité (Bortolato et Shih, 2011). Un exemple bien caractérisé de ces effets néfastes est la «réaction fromagère», une crise vasoconstrictive (souvent mortelle) provoquée par l'absorption d'amines sympathomimétiques dans des aliments fermentés (tels que du fromage, du vin, etc.) suite à l'administration d'inhibiteur irréversible de MAO comme antidépresseur (dérivé d'hydrazine) (Anderson et al., 1993). Une autre maladie causée par un manque de MAO est le trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention qui se caractérise par des symptômes d'inattention, une activité motrice excessive et une impulsivité détectés principalement pendant l'enfance (Domschke et al., 2005). Ces caractéristiques sont contrôlées par des neurotransmetteurs monoamines, principalement la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline (Domschke et al., 2005; Karmakar et al., 2016; Kwon et al., 2014).

Le déficit en monoamine oxydase A est un trouble rare qui survient presque exclusivement chez les humains. Il se caractérise par une déficience intellectuelle légère et des problèmes de comportement débutant dans la petite enfance. La plupart des garçons présentant un déficit en monoamine oxydase A souffrent d'accès de colère et d'agression (Brunner *et al.*, 1993; Cases *et al.*, 1995; McDermotta *et al.*, 2009). En outre, les personnes affectées peuvent présenter d'autres troubles du comportement, notamment le trouble du spectre autistique et le trouble du déficit de l'attention / hyperactivité (Domschke *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2019). Les problèmes de sommeil, tels que les difficultés à s'endormir ou les terreurs nocturnes sont d'autres symptômes de la déficience en MOA-A (Brummett *et al.*, 2007). Des

mutations dans le gène MAO-A réduisent l'activité de la monoamine oxydase A, ce qui provoque l'accumulation de sérotonine et d'autres neurotransmetteurs dans le cerveau (Domschke *et al.*, 2005; McDermotta *et al.*, 2009). L'une des maladies orphelines causées par un déficit en MAO-A est le syndrome de Brunner (Brunner *et al.*, 1993; Hunter, 2010) causé par un excès de monoamines dans le cerveau, telles que la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline. C'est une maladie génétique rare associée à une mutation du gène MAO-A et se caractérise par un QI (quotient intellectuel) inférieur à la moyenne (Brunner *et al.*, 1993), un comportement impulsif problématique (tel que la pyromanie et la violence), des troubles du sommeil et des sautes d'humeur (Hunter, 2010).

3.2.1.1 Méthodes thérapeutiques liées au déficit en MAO

Les inhibiteurs de la MAO sont une classe de médicaments prescrit pour le traitement de la dépression, bien qu'ils constituent souvent un traitement de dernière ligne en raison du risque d'interaction avec d'autres médicaments. Par exemple, l'interférence d'inhibiteurs de la MAO-B et d'inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine peut entraîner une augmentation des effets sérotoninergiques (figure 3.4), entraînant un syndrome sérotoninergique (Aboukarr et Giudice, 2018). En fait, les inhibiteurs de la MAO-A agissent comme des antidépresseurs et des agents anxiolytiques, alors que les inhibiteurs de la MAO-B sont utilisés seuls ou en association pour traiter la maladie d'Alzheimer (Thomas, 2000) et la maladie de Parkinson (Aboukarr et Giudice, 2018; Riederer et Laux, 2011). Les inhibiteurs de la MAO peuvent être efficaces dans les cas de dépressions résistantes au traitement, en particulier celles qui ne répondent pas aux antidépresseurs tricycliques (Kim *et al.*, 2019).

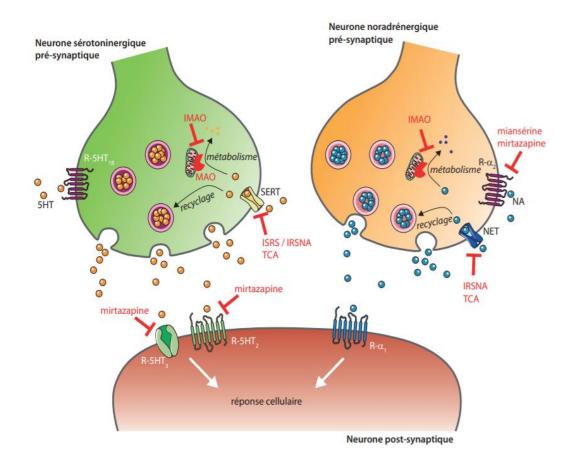


Figure 3.4 Cibles pharmacologiques des antidépresseurs et l'augmentation des effets sérotoninergiques; d'après (Niederhoffer *et al.*, 2016)

3.2.2 Diamine oxydase et dysfonctions liées à ces enzymes

L'enzyme clé pour le métabolisme des diamines chez l'humain est la diamine oxydase (DAO). Ses activités les plus élevées sont dans la muqueuse intestinale, localisées dans le cytoplasme des entérocytes matures du petit et du gros intestin (Schmid *et al.*, 1990). Il a été suggéré que la DAO, lorsqu'elle fonctionne comme une protéine sécrétoire, pourrait être responsable de la dégradation de l'histamine extracellulaire après l'ingestion d'aliments riches en histamine. À l'inverse, l'histamine N-méthyltransférase,

l'autre enzyme importante qui inactive l'histamine, est une protéine cytosolique qui ne peut convertir l'histamine que dans l'espace intracellulaire des cellules (Maintz et Novak, 2007). L'excès d'histamine causé par la réduction de l'activité de DAO peut provoquer de nombreux symptômes imitant une réaction allergique (Maintz et Novak, 2007). L'ingestion d'aliments riches en histamine, d'alcool ou de médicaments qui libèrent de l'histamine ou bloquent la DAO peut provoquer une diarrhée, maux de tête, symptômes rhinoconjonctivaux, asthme, hypotension, arythmie, urticaire, bouffées vasomotrices et autres conditions chez les patients intolérants à l'histamine (Maintz et Novak, 2007). Les symptômes peuvent être réduits par un régime sans histamine ou être éliminés par des antihistaminiques.

Un déficit en DAO est l'une des causes les plus courantes d'intolérance à l'histamine (Izquierdo-Casas et al., 2019). Maintz et al. ont mentionné qu'il y a des variantes du gène DAO qui influencent fortement l'expression et l'activité de la DAO mais ne suffisent pas, en elles-mêmes, à mener à bien l'état de maladie potentiellement associé à l'intolérence à l'histamine, ce qui suggère une interaction entre facteurs génétiques et environnementaux (Maintz et al., 2011). Il y a les facteurs pharmacologiques qui affectent l'activité de la DAO. Il existe un ensemble de médicaments pouvant causer la déficience ou la faible activité de la DAO ou d'autres enzymes impliquées dans la métabolisation de l'histamine, la DAO en particulier. Leitner et al. ont évalué les effets de certains médicaments qui ont une influence sur l'activité de la DAO humaine. La chloroquine et l'acide clavulanique présentaient les potentiels d'inhibition de la DAO les plus élevés (> 90%). La vérapamil avait une inhibition d'environ 50%. Une influence modérée sur la DAO a été causée par l'isoniazide et le métamizole, l'acétylcystéine et l'amitriptyline (>20%). Le diclofénac, le métoclopramide, le suxaméthonium et la thiamine ont un potentiel d'inhibition très faible (<20%). Étant donné que même des niveaux d'environ 30% d'inhibition peuvent être critiques, la plupart des substances mentionnées peuvent être désignées comme inhibiteurs de la DAO (Leitner *et al.*, 2014).

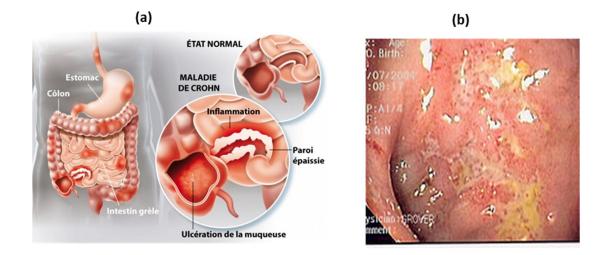


Figure 3.5 Maladie de Crohn et ulcération de la muqueuse (a) et image endoscopique du colon (b); d'après (Pepsia, 2013).

Les facteurs pathologiques qui jouent un rôle important dans le déficit en DAO semblent être plus fréquents dans la population atteinte de maladies inflammatoires de l'intestin. L'accumulation endogène d'histamine ou le déficit en DAO sont souvent associés à la colite ulcéreuse et à la maladie de Crohn. Si l'intestin est affecté par la maladie de Crohn, on observe des modifications macroscopiques (Schmid *et al.*, 1990). La maladie de Crohn est une dysfonction majeure et de longue durée qui affecte principalement l'iléon et le côlon. Normalement, sur une période de 20 ans, 80 à 90% des patients présentent des complications nécessitant une intervention chirurgicale (Schmid *et al.*, 1990). L'activité de la diamine oxydase a été mesurée chez des patients avec la maladie de Crohn et le niveau de AO était significativement diminué (environ 50%) dans les zones concernées par rapport aux patients.

3.2.2.1 Méthodes thérapeutiques liées au déficit en DAO

Il existe deux méthodes thérapeutiques pour traiter le déficit en DAO. Les stratégies cliniques actuelles reposent sur l'exclusion des aliments contenant de l'histamine ou d'autres amines bioactives (Izquierdo-Casas *et al.*, 2019). Le deuxième traitement proposé est une supplémentation en DAO exogène. Le supplément d'enzyme DAO est considéré pour apaiser l'intolérance à l'histamine. Des patients suivis pendant quatre semaines, devaient prendre les gélules de DAO avant les repas, tout au long de la période de suivi. Tous les symptômes se sont nettement améliorés lors de la supplémentation orale de DAO (Schnedl *et al.*, 2019). Le supplément réduit les maux de tête chez les patients migraineux présentant un déficit en DAO et constitue un moyen de soulager ce trouble. La DAO est présentée en tant qu'un traitement préventif de la migraine (Izquierdo-Casas *et al.*, 2019). La DAO est aussi utilisée comme agent thérapeutique pour apaiser l'urticaire chronique spontanée (Yacoub *et al.*, 2018).

Actuellement, un supplément oral de DAO rénale du porc est disponible dans le commerce sous la forme de capsules Histame® ou DAOSIN® (Manzotti *et al.*, 2016).

CHAPITRE IV

PRÉSENTATION DU PROJET

L'amine oxydase (Histaminase) se trouve dans de nombreux organismes comme les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. L'AO est une enzyme thérapeutique prometteuse qui est proposée comme ajout au traitement ou prévention dans les maladies intestinales aggravées par l'histamine. La Diamine oxydase (DAO) est l'enzyme principale dégradant l'histamine qui agit le plus dans le tractus intestinal et qui peut protéger l'intestin contre l'histamine endogène ou exogène (alimentaire), qui peut être toxique en quantité élevée.

Un supplément oral de l'AO d'origine animale (Missbichler *et al.*, 2010) est recommandé pour l'histaminose alimentaire et les dysfonctionnements intestinaux liés à l'histamine. Récemment, une AO végétale, seule ou en association avec la catalase, a été proposée pour traiter ces dysfonctionnements (Mondovi *et al.*, 2013). Masini a montré qu'une AO végétale, ayant une activité enzymatique supérieure à celle de l'AO animale, présente des effets bénéfiques pour certaines maladies (Masini *et al.*, 2007). Ils ont montré que l'AO obtenue à partir des pousses de pois, administrée par voie parentérale, pouvait avoir des effets thérapeutiques et protecteurs sur l'ischémie intestinale, en réduisant l'inflammation des tissus locaux et en neutralisant les lésions tissulaires induites par les radicaux libres (Masini *et al.*, 2007).

Premier objectif : L'extraction et la purification de l'AO à partir légumineuses germées

L'AO végétale, ayant une activité enzymatique supérieure à celle de l'AO animale, est une nouvelle approche proposée pour traiter certaines maladies liées à l'histamine. L'identification d'une source végétale locale contenant l'AO, la présentation d'une méthode d'extraction et purification de l'AO à partir des sources végétales identifiées et à la fin, trouver une méthode de la stabilisation de cette enzyme pendant le séchage et l'entreposage ont été visées par ce projet de la maîtrise. L'AO est la protéine soluble la plus abondante détectée dans les liquides extracellulaires de Fabaceae, en particulier *Lathyrus sativus* et *Pisum sativum* (Masini *et al.*, 2007).

Le premier objectif de ce projet était la mise au point d'une méthode d'extraction et de purification de l'AO à partir des sources végétales locales avec la teneur de l'AO la plus élevée. Les prémisses de cette partie du projet étaient que les pousses germées des différentes espèces locales de Pisum sativum, de la famille des légumineuses (Fabacées) contenaient l'amine oxydase avec une activité enzymatique élevée. Les différentes méthodes d'extraction et de purification de l'AO à partir des sources végétales présentées auparavant étaient si longues qu'elles pouvaient réduire le rendement, ainsi que l'activité enzymatique de l'AO pendant les différentes étapes du processus. L'hypothèse était que la chromatographie par échange d'ions qui est une méthode simple, rapide et rentable pour la purification des protéines pourrait être efficace pour la purification de l'AO végétale. Alors, une méthode de l'extraction et la purification de l'AO végétale par la colonne chromatographique échangeuse d'ions (YMC-BioPro, SP75) a été proposée en tant qu'une méthode rapide et facile avec un rendement plus élevé par rapport aux méthodes utilisées auparavant. La procédure détaillée de différentes étapes de l'extraction et purification est schématisée par la figure 4.1.

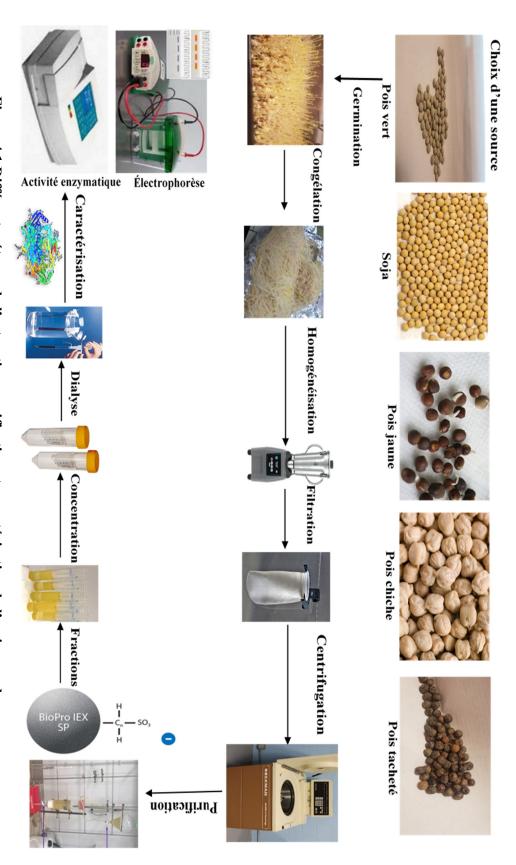


Figure 4.1 Différentes étapes de l'extraction, purification et caractérisation de l'amine oxydase

Deuxième objectif : La préparation de l'AO en poudre à partir de l'enzyme purifiée

Parmi les agents thérapeutiques, il y a certaines protéines comme des enzymes qui nécessitent une stabilisation en raison de leur instabilité inhérente en solution aqueuse. Le deuxième objectif de la recherche actuelle était de trouver une méthode efficace avec un rendement acceptable pour obtenir l'AO en poudre pour augmenter la stabilité. La méthode de séchage par nébulisation et par la lyophilisation étaient les deux méthodes appliquées pour la préparation de l'AO en poudre.

L'hypothèse était que la lyophilisation est une méthode douce, fiable et convenable pour la préparation de l'AO en poudre à partir de l'enzyme en solution (figure 4.2). Puisque la lyophilisation se déroule à basse température, l'eau est congelée et éliminée par sublimation, il y a donc une hypothèse que la protéine peut conserver sa structure tridimensionnelle et en conséquence son activité enzymatique pendant le séchage. Bien que l'AO est sensible à la chaleur, la méthode de séchage par nébulisation se réalise en chauffant la protéine. Puisque le temps d'exposition des échantillons à la chaleur est court (secondes ou millisecondes), l'AO pourrait être transformée en poudre par la méthode de séchage par pulvérisation sans effet nuisible majeur (Sosnik et Seremeta, 2015). Alors, en utilisant les conditions optimales, la dénaturation de l'AO pourrait être contrôlée pendant la procédure de séchage par nébulisation.

Considérant qu'il y a des avantages et des inconvénients pour les deux méthodes de séchage, elles ont été proposées pour obtenir l'AO en poudre à partir de la solution contenant de l'AO purifiée. La température élevée pendant séchage par pulvérisation et le risque de dénaturation de l'enzyme à cause de la congélation et déshydratation pendant la lyophilisation (Roy et Gupta, 2004) sont les inconvénients de ces méthodes de séchage.

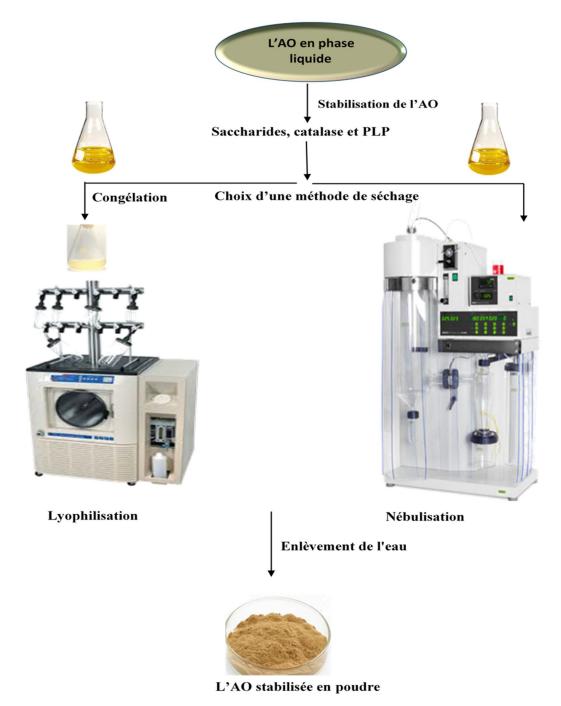


Figure 4.2 Différentes méthodes de préparation de l'AO stabilisée en poudre à partir des sources végétales

Troisième objectif : stabilisation de l'AO pendant la lyophilisation en utilisant les cryoprotecteurs

Le troisième objectif du projet était la stabilisation des protéines pendant la lyophilisation en ajoutant des cryoprotecteurs comme des monosaccharides, disaccharides et polysaccharides à la solution de protéines (figure 4.3). Pour être efficaces, ces cryoprotecteurs doivent protéger la structure de la protéine pendant les deux «facteurs de stress» : la congélation et le séchage (Roy et Gupta, 2004).

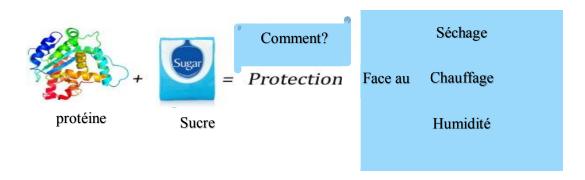


Figure 4.3 Protection des protéines pendant le séchage et l'entreposage par les sucres; d'après (Mensink *et al.*, 2017).

L'hypothèse d'utilisation des cryoprotecteurs est que ces agents stabilisants pourraient stabiliser l'enzyme avec différents mécanismes pendant les différentes étapes de lyophilisation et d'entreposage (figure 4.4). Il y a différentes hypothèses pour expliquer les propriétés de certains disaccharides surtout le tréhalose et le sucrose. La théorie de la vitrification propose que le sucre forme une matrice vitreuse qui agit comme 'un cocon' et protège physiquement la protéine (figure 4.4A). L'autre théorie est basée sur le mécanisme de l'exclusion préférentielle (figure 4.4B). Ce mécanisme suggère qu'il n'existe aucune interaction directe entre le sucre et la protéine. Comme on peut le constater, l'ajout de sucre permet de séquestrer les molécules d'eau de la protéine, réduisant ainsi son rayon hydraté et en augmentant sa compacité et sa stabilité. La

dernière hypothèse est la théorie du remplacement de l'eau (figure 4.4C) qui parle de la substitution de molécules d'eau par des liaisons hydrogènes formées par le sucre, en maintenant la structure tridimensionnelle et en stabilisant les biomolécules (Chiu *et al.*, 2011; Jain et Roy, 2009).

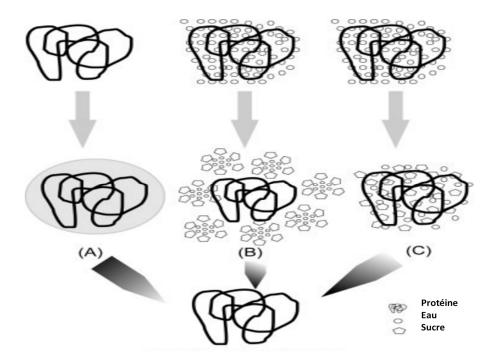


Figure 4.4 Diagramme explicatif montrant les propriétés particulières du sucre : (A) La vitrification, (B) l'exclusion préférentielle et (C) la théorie du remplacement de l'eau; d'après (Jain et Roy, 2009).

Les effets des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique de l'AO seront vérifiés pendant la lyophilisation, d'entreposage de poudre et d'entreposage des comprimés préparés avec les poudres obtenues en présence et en absence de cryoprotecteurs à 4 °C pendant 3 mois.

L'efficacité des cryoprotecteurs peut être évaluée par la mesure de l'activité enzymatique de l'AO lyophilisée en absence et en présence des cryoprotecteurs dans les poudres et aussi dans les comprimés jusqu'à ce que l'activité enzymatique de l'AO s'approche de zéro.

Étant donné que dans le projet actuel le mélange de sucres n'était pas essayé, il restera comme perspective, dans un projet futur d'investiguer les effets de l'association de différents sucres comme le tréhalose et le sucrose avec un polysaccharide complexe comme le dextran T-70 pour améliorer le processus de lyophilisation et d'entreposage.



CHAPITRE V

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les amine oxydases, des enzymes régulatrices importantes, catalysent l'oxydation d'une vaste gamme d'amines biogènes comme la putrescine et l'histamine (Messerschmidt, 2010). L'intolérance à l'histamine survient lorsque la dégradation de l'histamine est altérée, principalement par une activité plus faible de l'amine oxydase (AO). Afin de traiter les dysfonctionnements liés à l'histamine, un supplément oral de DAO rénale du porc est disponible (Manzotti *et al.*, 2016). Une nouvelle approche a été proposée avec une AO végétale extraite de *Lathyrus sativus* (Mondovi *et al.*, 2013). Vu que l'AO peut être un agent antihistaminique naturel administré par voie orale, dans le projet actuel, l'extraction, la purification et la stabilisation de cette enzyme d'origine végétale pendant le séchage et aussi pendant son entreposage en format de poudre et comprimé ont été visées.

5.1 Réactifs et matériaux chimiques

La diamine oxydase (DiaMaze) de *Pisum sativum* (Lot: DAO-B17F01 et Lot: DAO-B18102) a été achetées chez (Bio-Research Products, Inc., Iowa, USA). La diamine oxydase végétale a aussi été préparée au laboratoire à partir de *Pisum sativum* par la manière décrite par Blemur (Blemur *et al.*, 2016; Jumarie *et al.*, 2017). Les pousses de différents pois ont été achetées d'un marché local (Montréal). La résine échangeuse de cations (YMC-BioPro S75) a été achetée de YMC Co., Ltd. (Kyoto, Japan), les sels monobasique et dibasique de phosphate de sodium, albumine de sérum bovin (BSA), réactif de Bradford, Tris-Base, glycine, putrescine (dichlorhydrate de 1,4-

diaminobutane), dichlorhydrate d'ortho phenylenediamine, peroxydase de racines de raifort/ Horseradish peroxidase (HRP de type I, 5,2 U / mg de solides), N, N, N', N'tétraméthyléthylènediamine (TEMED), pyridoxal-5'-phosphate monohydrate, carboxymethylcellulose sodique (MW 90000 Da), kit de dosage de l'ammoniac, Dfructose, D-saccharose, D-tréhalose dishydrate, 4-aminoantipyrine et le sel de sodium de l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzènesulfonique ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, ON, Canada). Le glucose a été acheté chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'acrylamide, le N, N '-méthylène-bisacrylamide, le réactif de coloration des protéines R-250 bleu brillant de Coomassie et la solution de standard de masses moléculaires (large gamme) provenaient de Bio-Rad (Richmond, VA, USA). Le β-mercaptoéthanol a été acheté de BioShop (Burlington, Ontario, Canada). Le Dextran T70 a été acheté chez Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suède) et l'Agent 1b contenant 50% de tréhalose a été préparé au laboratoire. D'autres produits chimiques ont été de qualité Réactif et utilisés sans purification supplémentaire.

5.2 Méthodes expérimentales

5.2.1 Extraction et purification d'amine oxydase végétale par la méthode chromatographique

Afin d'avoir accès aux sources locales, la présence de l'AO a été vérifiée dans différentes sortes de légumineuses de pois comme soya, pois vert, pois sucré, pois jaune, pois chiche et pois tacheté. L'amine oxydase a été extraite de ces sources. Les pousses congelées ont été coupées en petits morceaux et mélangées avec un volume de tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 5,5 contenant 200 mM de chlorure de sodium. Le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un mélangeur et l'homogénat a été passé à travers un tissu en nylon. Le surnageant obtenu a été filtré et centrifugé deux fois à 4 °C, 10000 g pendant 40 et 30 minutes. Après la première centrifugation, la conductivité et le pH ont été ajustés avec de l'eau et HCl 5% à 9 (mS) et 5,5 respectivement. Les débris ont été séparés à chaque fois. Le surnageant a été transféré sur la colonne

chromatographique de type YMC-BioPro S75 portant des motifs fonctionnels -SO₃-chargés négativement. La colonne de type échangeuse de cations a été lavée avec 1 L de tampon phosphate de sodium 50 mM (50 mM, pH 5,5 et conductivité 3 mS). Finalement, à l'aide de l'augmentation de la force ionique de la phase mobile, l'enzyme retenue sur la colonne a été éluée par 500 mL de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 5,5, NaCl 300 mM). La couleur brunâtre dans les échantillons des tubes pourrait indiquer la présence de l'AO. L'activité des différentes fractions a été mesurée et celles contenant l'AO avec l'activité la plus élevée ont été transférées dans un tube de concentration (tubes Sartorious Vivaspin Turbo 15) et centrifugées à 4 °C, 4000 g. La solution obtenue de l'AO concentrée a été dialysée contre le tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,4), sous agitation pendant une nuit à 4 °C. L'effet de dialyse sur l'activité enzymatique de l'amine oxydase a été véfirié. La solution finale a été conservée à -80 °C pendant une nuit et a été lyophilisée pendant 72 heures. La poudre obtenue a été conservée à 4 °C pour les tests supplémentaires.

5.2.2 La lyophilisation d'amine oxydase

L'amine oxydase en solution a été traitée avec différents cryoprotecteurs. Les échantillons ont été congelés à - 80 °C pendant 24 heures. Ensuite, les échantillons congelés ont été lyophilisés avec le lyophilisateur Virtis Freezemobile 25EL (Now York, USA). Le vide permet à toute l'eau gelée de l'échantillon de se sublimer (directement de la phase solide à la phase gazeuse). La température du condenseur a été ajustée à environ -70 °C ce qui a été convenable pour la condensation de l'eau et le temps d'extraction à vide à 100 millitorr (0,133 millibar) était d'environ 20 minutes. La lyophilisation a été poursuivie pendant 72 heures. Des poudres séchées ont été réchauffées à la température de la pièce pendant le séchage secondaire. Tous les échantillons ont été lyophilisés selon le même cycle de lyophilisation. Toutes les poudres obtenues ont été conservées à 4 °C pour vérifier leur stabilité pendant 3 mois. Les différents cryoprotecteurs utilisés étaient: (i) monosaccharides : le glucose et le

fructose, (ii) disaccharides: le saccharose et le D-tréhalose dihydrate, (iii) polysaccharides: le dextran T70 et la carboxymethylcellulose de masse molaire 90000 Da. (iv) le pyridoxal-5'-phosphate monohydrate (PLP), (v) l'Agent 1b mélangée contenant du tréhalose (50:50 w:w). La concentration d'enzyme dans la solution en vue de lyophilisation était de 0,8 mg / mL d'amine oxydase. Afin d'éviter un excès d'eau dans la solution, tous les cryoprotecteurs ont été ajoutés directement à la solution de protéine. Le rapport de l'amine oxydase: cryoprotecteur était de 1:10 (w:w) pour tous les cryoprotecteurs, sauf le PLP qui a été ajouté au rapport 1:1 (w:w). L'Agent 1b commerciale (contenant 50 % de tréhalose) a été ajoutée au rapport 1:20 (w:w), pour que chaque ingrédient ait un rapport de 1:10 par rapport à l'AO.

5.2.3 Séchage de l'AO par pulvérisation

Le séchage a été effectué par le Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suisse). Ce séchoir par nébulisation possède une buse de 0,7 mm pour la pulvérisation de la solution contenant la protéine. Un système cyclone avec du N₂ a été utilisé pour sécher les particules. La température d'entrée était ajustée à 80 °C. Une solution de 250 mL sans protecteurs contenant 0.17 mg/mL amine oxydase a été préparée. Comme contrôle une autre solution semblable de l'AO a été préparée en ajoutant 129 mg de D-tréhalose dihydrate comme protecteur à la solution contenant 43 mg d'amine oxydase. Le rapport de la protéine / tréhalose était 1:3 (w/w). Le protecteur était complètement dissout. Le solvant utilisé était de l'eau distillée. 250 mL de la solution de l'enzyme ont été séchés pendant deux heures.

5.2.4 Préparation des comprimés contenant l'AO

Des comprimés (300 mg) contenant de 5.1 mg de l'AO lyophilisée avec et sans les cryoprotecteurs (tableau 5.1) ont été préparés avec la formulation suivante : 83% de carboxymethylcellulose (CMC), 10% d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) avec 7% de l'AO traitée. Les poudres dans les proportions mentionnées ont été mélangées

dans un mortier en céramique et les comprimés de l'AO ont été préparés sous pression (2,5 T / cm²) à l'aide de poinçons à surface plane de 9,54 mm de diamètre. La presse utilisée pour fabrication des comprimés était de la compagnie Carver (USA). Tous les comprimés préparés ont été conservés à 4 °C pour évaluer leur stabilité au bout de 1, 2 et 3 mois. Comme témoins, des comprimés sans AO ont été également préparés.

Tableau 5.1 La quantité et l'activité de l'AO lyophilisée dans chaque comprimé

	AO	AO/Sucrose	AO/Tréhalose	AO/Agent	AO/PLP
La quantité de l'AO (mg/chaque comprimé)	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
L'activité spécifique de l'AO lyophilisée (U/mg de protéine)	1,15	1,36	1.40	1,50	1,17
Unité enzymatique totale/ chaque comprimé	5,9	6,9	7,1	7,6	6.0

5.2.5 Détermination spectrophotométrique de l'activité enzymatique de l'amine oxydase

5.2.5.1 Détermination d'activité enzymatique de l'AO par la méthode de dosage couplée avec la peroxydase (HRP).

L'activité enzymatique de l'AO a été mesurée à partir du peroxyde d'hydrogène généré par la diamine oxydase. Lors de l'oxydation du substrat (putrescine) en présence de l'AO en tant que catalyseur, une quantité stœchiométrique de H₂O₂ est produite (équation 5.1) par réduction de l'oxygène (Ferrari *et al.*, 2014).

Putrescine +
$$O_2$$
 + H_2O \longrightarrow Aldéhyde correspondant + H_2O_2 + NH_3 Éq. 5.1

Ensuite, la peroxydase consomme le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction catalytique de l'AO pour coupler l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzènesulfonique (DCHBS) oxydé à 4-aminoantipyrine (AAP) (figure 5.1) afin de former un colorant rose ayant une absorption maximale à 515 nm (Ferrari *et al.*, 2014; Obzansky *et al.*, 1991; Pietrangeli *et al.*, 2004; Stoner, 1985). Le rapport entre la putrescine consommée et le H₂O₂ généré et le complexe final produit est de 1:1:1 (mol:mol:mol), de sorte qu'une unité enzymatique (U) de l'AO est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'oxydation de 1 μmol de putrescine par minute à pH 7,4, à 25 °C (avec un coefficient d'extinction molaire à 515 nm de 2,6 x 10⁴ M⁻¹.cm⁻¹).

Figure 5.1 Réaction chromogénique pour la détermination de l'activité de l'AO. La formation de colorant quinone-imine par condensation d'AAP avec DCHBS oxydé a été catalysée par la peroxydase en présence de H₂O₂; d'après (Angelini *et al.*, 2018).

En utilisant un spectromètre à fibre optique de marque Ocean Optics (Dunedin, FL, USA), l'activité enzymatique de l'AO a été mesurée dans un volume final de 1 mL de tampon phosphate de potassium (100 mM, pH 7) contenant 10 μ L d'AAP 10 mM, 10 μ L de DCHBS 100 mM, 10 μ L de la peroxydase (HRP, solution 5,2 U/mL) et 20 μ L de l'AO. Les réactions enchaînées ont débutées par l'ajout de 30 μ L de putrescine 100 mM (Angelini *et al.*, 2018). Chaque expérience a été réalisée avec trois répliques indépendantes.

5.2.5.2 Le dosage d'activité enzymatique couplé de l'AO avec la L-glutamate déshydrogénase (GDH).

Le pyridoxal-5'-phosphate monohydrate (PLP), une forme active de la vitamine B6 qui possède la propriété d'antioxydants et de cryoprotecteurs, pourrait avoir des effets antioxydants sur le H_2O_2 . L'activité de l'AO ne peut donc pas être analysée par la décomposition du H_2O_2 , alors que la détermination de l'ammoniac est une méthode appropriée pour la mesure de cette activité enzymatique. L'AO oxyde la putrescine et libère de l'ammonium (équation 5.1). Le NH_4^+ produit réagit avec l'acide α -cétoglutarique (CGA) et oxyde le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) à $NADP^+$ en présence de L-glutamate déshydrogénase (GDH) comme expliqué par figure 5.2

Acide alpha-cétoglutarique (CGA)

Acide glutamique

Figure 5.2 Oxidation de NADPH à NADP⁺ en présence de GDH, CGA et ammonium produit par l'oxydation de substrat (Grimaldi *et al.*, 2017).

Dans cet essai, 10 μL de la DAO contenant l'agent a été ajoutée à 1 mL de réactif d'essai à l'ammoniac contenant CGA, NADPH, tampon, stabilisant et charges non-réactives (Sigma-Aldrich). Le mélange a été incubée pendant 5 minutes à température ambiante en présence de 10 μL de GDH et Finalement 30 μL de putrescine (100 Mm) a été ajoutée au mélange et la cinétique de la réaction a été mesurée par diminution de l'absorption à 340 nm pendant 5 minutes (ε 340 nm = 6,22 x 10⁴ M⁻¹.cm⁻¹) (Calinescu *et al.*, 2012; Cheuk et Finne, 1984). L'absorbance à 340 nm est liée à la concentration de NADPH. La vitesse de la réaction a été suivie par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm, due à l'oxydation de l'ADPH qui est proportionnelle à la concentration en ammoniac. La glutamate déshydrogénase réagit avec l'ammoniac libérée par désamination de la putrescine par AO.

Le NADPH est connu pour être étroitement lié à l'Agent 1a, de sorte que la consommation de NADPH est affectée par l'Agent 1a. Cet effet doit être pris en compte dans la réaction catalytique par cette méthode. Cet effet de l'agent sur le NADPH a été soustrait dans chaque mesure d'activité de l'AO. Étant donné que le pyridoxal-5'-phosphate monohydrate (PLP), une forme active de la vitamine B6 qui possède la propriété d'antioxydants et de cryoprotecteurs, pourrait avoir des effets antioxydants sur le H₂O₂ (Mahfouz et al., 2009), l'activité de l'AO en présence de PLP a été mesurée par dosage de l'ammoniac (Cheng *et al.*, 2013; Kannan et Jain, 2004; Singh *et al.*, 2013).

Bref, l'activité de l'amine oxydase a été mesurée via la concentration de H_2O_2 (dosage couplé à la HRP) ou la concentration de NH_4^+ (dosage couplé à la GDH). La mesure de l'activité enzymatique de l'amine oxydase via H_2O_2 est susceptible à l'interférence d'antioxydants ou d'enzymes qui dégradent le H_2O_2 (association d'AO avec agent ou PLP). Dans ce cas, l'activité de l'AO a été mesurée à base de la concetration de NH_4^+ (au lieu de H_2O_2).

5.2.5.3 Le dosage de l'activité enzymatique de l'AO dans les comprimés

Chaque comprimé de 300 mg contenant 5.1 mg de protéine de l'AO (tableau 5.1) a été écrasé dans un mortier et la poudre obtenue a été bien homogénéisée. La poudre a été mise en suspension dans 10 mL tampon de phosphate 100 mM, pH 7.4. La solution obtenue a été maintenue pendant 1 heure (sur la glace) pour libérer l'enzyme autant que possible. L'activité spécifique de l'AO lyophilisée en présence et en absence de cryoprotecteurs a été mesurée par la méthode de dosage d'activité enzymatique couplée.

5.2.6 Étude électrophorétique SDS-PAGE de l'AO par zymographie sur gel de polyacrylamide contenant de la peroxydase

5.2.6.1 Préparation de gel

Des gels de séparation de polyacrylamide (8%) contenant du SDS et de la peroxydase ont été préparés (Ahmadifar *et al.*, 2017). Bref, 1 mL de la peroxydase (1 mg mL⁻¹), 4.4 mL d'acrylamide / bis-acrylamide à 30% (29: 1), 4.2 mL de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 166 µL de SDS (10%), 8.3 µL de TEMED, 6.8 mL d'eau ont été mélangés. Ensuite 83.3 µL de persulfate d'ammonium (10%) ont été ajoutés. Lorsque le persulfate d'ammonium est dissous dans l'eau, il forme des radicaux libres de persulfate qui activent le monomère d'acrylamide. TEMED a été ajouté en tant qu'accélérateur de la réaction de polymérisation, car c'est un bon transporteur d'électrons. Le monomère d'acrylamide activé peut ensuite réagir avec un monomère inactivé pour former des intermédiaires activés et ainsi produire une longue chaîne de polymères.

Les chaînes de polymères allongées sont réticulées avec le bisacrylamide pour former un réseau tridimensionnel de chaînes d'acrylamide (figure 5.3) (Hames, 1998; Righetti *et al.*, 2001). Des gels d'empilage (stacking) ont été préparés en mélangeant 0,65 mL d'acrylamide / bis-acrylamide à 30% (29:1), 1.25 mL de Tris-HCl 1 M (pH 6,8), 50 μL

de SDS (10%) , 3.05 mL d'eau, 5 μ L de TEMED et 25 μ L de persulfate d'ammonium (10%).

Figure 5.3 Mécanisme de polymérisation de l'acrylamide pour obtenir de gel de polyacrylamide; d'après (Huang *et al.*, 2018).

5.2.6.2 Électrophorèses de l'AO

Des volumes de $10~\mu L$ de chacun des échantillons (1mg/mL) ont été mélangés avec du tampon de charge (5,3 mL d'eau distillée, 1,7 mL de tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 2 mL de SDS (10%) et 1 mL de glycérol) dans le rapport 1:1 (v:v) et ont été chargés sur le gel PAA contenant de la peroxydase. La solution standard de masses moléculaires (gamme large, mélangée avec du tampon de charge 1:20, v:v) a été préparée et 20 μL ont été chargés sur le gel. L'électrophorèse a été réalisée pendant 2 h, à 120 volt dans un tampon d'électrophorèse (pH 8,8) fait de Tris base 0,025 M, de glycine 0,192 M et de

SDS à 0,1% avec un système d'électrophorèse MiniProtean® de Bio-Rad (Ahmadifar *et al.*, 2017).

5.2.6.3 Développement et coloration des bandes de l'AO sur le gel de zymographie

À la fin de l'électrophorèse, afin d'éliminer le SDS, les gels ont été rincés plusieurs fois à l'eau distillée. Dans l'étape suivante, les gels ont été incubés 10 min dans l'obscurité à 25 °C sous agitation douce avec la solution de développement préparée avec un mélange de putrescine 30 mM (substrat de l'AO) et de o-phénylènediamine (o-PDA) 30 mM (substrat de la peroxydase) dans le tampon (PBS 50 mM, pH 7,2). Après 10 minutes d'incubation, les bandes de l'AO sur le gel zymographique étaient apparues. Afin de comparer l'effet des différents agents stabilisants sur l'AO, les gels ont été scannés et évalués par le logiciel ImageJ (Win64, version 1.47, National Institutes of Health, USA). Ensuite, les gels ont été développés pour obtenir les profils électrophorétiques des protéines par coloration avec le réactif Coomassie bleu. Mais, avant la coloration Coomassie, il était nécessaire de décolorer les bandes zymographiques (Le et al., 2018). Afin de faire disparaître les bandes zymographiques, les gels ont été lavés au méthanol (50%). Les bandes des protéines ont été obtenues après incubation (2h) dans une solution de coloration contenant 0,5% de Coomassie (Brilliant Blue G-250 BioRad) préparée dans un mélange de méthanol / acide acétique / eau (40:10:50, v/v/v). À la fin, les gels ont été décolorés par une solution de décoloration constituée de méthanol / acide acétique / eau (20:5:75, v/v/v).

5.2.7 Détermination de la masse molaire de l'AO par électrophorèse

La masse molaire des monomères de l'AO a été mesurée par le dimère dénaturé sur SDS-PAGE. Cette technique de la détermination de masse molaire sur le gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes est présentée par Laemmli (Laemmli, 1970). Dans cette méthode, l'enzyme est bouillie avec β -mercaptoéthanol. Bref, 10 μ g de tous les échantillons ont été mélangés avec du tampon de charge réducteur (4.8 mL

d'eau distillée, 1,2 mL de tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 2 mL de SDS 10%, 1 mL de glycérol et 0.5 mL du bleu de bromophénol (0.1 %)) dans le rapport 1:1 (v:v) et bouillis pendant 1 minute. Les échantillons ont été chargés sur le gel. Le β-mercaptoéthanol et le chauffage ont produit la dénaturation des dimères de l'AO en monomères de l'AO dénaturée. En fait, l'excès de 2-mercaptoéthanol clive les liaisons disulfure entre les groupes thiol des résidus cystéine en les réduisant (Chang, 1997), ce qui transforme la structure de la protéine en monomères (figure 5.4). En utilisant le sodium dodecyl sulfate (SDS), l'enzyme a été entourée par les charges négatives qui déplient les chaines polypeptidiques de l'AO (Laemmli, 1970). 20 μL de solution standard de masse moléculaire (gamme large, préparée 1:20, v:v de tampon de charge réducteur) ont été chargés sur le gel et la BSA a été utilisé comme contrôle. Des quantités de 10 μg d'échantillons ont été chargées sur SDS-PAGE. Afin de préparer un gel de 10%, 5.6 mL d'acrylamide à 30% de bis-acrylamide (29:1), 4.2 mL de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 166 μL de SDS (10%), 8.3 μL de TEMED et 6.9 mL d'eau ont été mélangés et 83.3 μL de persulfate d'ammonium (10%) ont été ajoutés pour polymérisation.

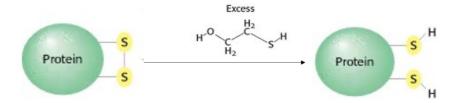


Figure 5.4 Le clivage des liaisons disulfure des protéines par β-mercaptoéthanol; d'après (Berg *et al.*, 2000).

5.2.8 Détermination du type de l'AO en fonction de son cofacteur (FAD ou ion de cuivre) par zymographie

Il existe deux classes d'amine oxydase : les amine oxydases à cuivre et à FAD, différentes les unes des autres par la spécificité du substrat, par les inhibiteurs, par le mécanisme catalytique et par leurs cofacteurs. Le cofacteur TPQ de l'AO à cuivre peut

réagir avec le semicarbazide, ce qui peut inhiber les amine oxydases à cuivre (Finney *et al.*, 2014), tandis que le cofacteur de l'AO à FAD ne fait aucune réaction avec le semicarbazide. Alors, le semicarbazide a été utilisé pour distinguer les deux cofacteurs. Un volume de 10 μL de la solution de semicarbazide (30 mM) a été préparé dans l'eau et ajouté au 290 μL d'AO (0,86 mg protéine / mL) dans un tampon de phosphate de sodium (0,1 M, pH 7,2) (De Biase *et al.*, 1996). Pour comparaison, la glucose oxydase (GOD - enzyme de type FAD) dans le tampon acétate (0,1 M, pH 5,5) a été traitée dans les mêmes conditions que l'AO. Les solutions ont été incubées à 25 °C pendant deux heures. Les enzymes l'AO et la GOD, en absence ou en présence de semicarbazide, ont été incubées dans les mêmes conditions. L'activité enzymatique de l'AO et celle de la GOD ont été mesurées par spectroscopie et par la méthode de zymographie (sections 5.2.5 et 5.2.6). Pour mesurer l'activité enzymatique de la GOD et aussi pour développer en zymographie la bande sur le gel contenant de la peroxydase, le glucose a été utilisé en tant que substrat de la GOD.

5.2.9 Détermination thermogravimétrique de l'humidité de la DAO lyophilisée

La proportion d'eau des échantillons lyophilisés en présence et en absence des cryoprotecteurs a été déterminée par analyses thermogravimétriques (TGA) à l'aide d'un Q5000 de la compagnie TA Instrument (New Castle, USA). Après optimisation des facteurs clés liés à l'évaporation de l'humidité, tous les échantillons de 15 à 20 mg ont été chauffés sous l'argon avec un débit constant de 100 mL / min. La perte de masse a été mise en évidence par la dérivée de la masse en fonction du temps. Cette méthode, et aussi seconde dérivée thermogravimétrique (2°DTG), qui présente la vitesse de perte de masse, permet de distinguer l'eau libre (à la surface) de l'eau présente dans la structure cristalline (Wang *et al.*, 2018). L'humidité des échantillons a été mesurée entre 30 et 120 °C jusqu'à ce que leur poids ait atteint un plateau. Comme la perte de poids due à l'évaporation de l'eau était terminée après 120 °C, les échantillons ont été ensuite chauffés jusqu'à 200 °C afin de s'assurer qu'il n'y ait plus de perte de masse.

La valeur d'humidité a été calculée par la différence entre la masse initiale et la masse à $120\,^{\circ}$ C.

5.2.10 Diffraction des rayons X

Les spectres de diffraction des rayons X (XRD) ont été obtenus à la température ambiante en utilisant un diffractomètre D8 Advance de la compagnie Bruker (Madison, USA). Les mesures ont été effectuées avec une géométrie Bragg-Berentano (Kriegner et al., 2015), avec une configuration Twin-Twin. Le détecteur a été LynxEye et la source utilisée dans cette méthode a été CuK α (λ = 1,5418 Å) fonctionnant à 40 kV et le courant de 40 mA. Les spectres ont été enregistrés entre 5 et 90 °, avec un incrément de 0.02 ° et un temps d'intégration de 2 secondes. À partir de l'analyse DRX, le pourcentage de cristallinité (%) et l'intensité relative des pics ont été mesurés. Le logiciel EVA a été utilisé pour les traitements des spectres de diffraction des rayons X.

CHAPITRE VI

RÉSULTATS

6.1 L'extraction de l'AO à partir des sources végétales

L'amine oxydase se trouve en grande quantité chez les *Fabacées*, surtout dans *lathyrus* sativus et dans le *Pisum sativum* (Luhova et al., 2003). La quantité et l'activité d'AO dans les pousses des différentes sources de la famille des *Fabacées* comme le soya, pois vert, pois sucré, pois jaune, pois chiche et pois tacheté a été mesurée (tableau 6.1).

Tableau 6.1 Activité spécifique obtenue de l'AO de différentes sources végétales (mesurée en triplicata)

Espèces*	U (total)/kg de pousses	Protéine (g)/ kg de pousses	Activité spécifique (U/mg de protéine)
Pois chiche	1327 ± 120	$5,2 \pm 0,2$	0,26
Pois sucré	1154 ± 100	$4,65 \pm 0,1$	0,25
Pois vert	1133 ± 87	$4,05 \pm 0,25$	0,28
Pois jaune	997 ± 50	$5,65 \pm 0,3$	0,18
Pois tacheté	1581 ± 75	$3,58 \pm 0,1$	0,44
Soja	1350 ± 80	$6,4 \pm 0,4$	0,21

^{*}L'homogénat a été préparé à partir des pousses congelées, coupées et mélangées avec du tampon de phosphate de sodium (50 mM, pH 5,5 contenant 200 mM de NaCl).

Les pousses de pois germées dans la noirceur contiennent plus d'AO que les pousses germées en présence de lumière (Federico et Angelini, 1988). De plus, la quantité d'AO est aussi reliée au temps de germination. Les pousses germées pendant environ 6-8 jours contiennent plus d'AO que si elles ont germées plus longtemps (Luhova *et al.*, 2003). Parmi les sources vérifiées (tableau 6.1), les sources suivantes (tableau 6.2) ont

été purifiées à travers la colonne chromatographique à échange de cation (YMC-BioPro S75). L'activité totale de l'AO extraite à chaque étape a été mesurée et le pourcentage de l'activité préservée par rapport à l'activité initiale a été calculée.

Tableau 6.2 U (total) obtenues des différentes étapes du processus de purification de l'AO à partir des sources végétales (mesurées en triplicata)

	Pois tacheté (1kg)	Pois chiche (1kg)	Soja (1 kg)
Étapes de la purification	U (total, %)	U (total, %)	U (total, %)
Homogénat	1001 100%	850 100%	857 100%
Surnageant centrifugé (1)*	898	156	682
	90%	18%	80%
Surnageant centrifuge (2)**	900	122	647
	90%	14%	75%
Colonne YMC-BioPro S75 ***	126	9	115
	13%	1%	13%
Lavage****	14	0	77
	1%	0%	9%
L'AO éluée	459	63	275
	46%	7%	32%

^{*} Le surnageant a été centrifugé à 10 000 g pendant 40 minutes à 4 °C. ** Après avoir ajusté la conductivité et le pH à 9 ms et 5.5 respectivement, le surnageant a été centrifugé à 10 000 g pendant 30 minutes à 4 °C. *** Le surnageant a été passé à travers la colonne mentionnée et l'activité de toutes les fractions a été mesurée. **** Le lavage a été effectué avec le PBS (50 mM, pH 5.5).

L'une des sources qui contient le plus de DAO a été le pois tacheté, à 1000 U enzymatiques par kilogramme de pousses germées. Puisque le rendement de la purification par la méthode appliquée a été assez élevé, environ 45%, cette source a donc été choisie pour un examen plus approfondi (tableau 6.3).

Tableau 6.3 Activité spécifique et le rendement d'AO récupérée des pois tachetés pendant la purification (mesurée en triplicata)

Étapes de purification	étape	Activité totale (U)	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Activité récupérée (%)
Homogénat	1	954	1456	$0,66 \pm 0,05$	100
Surnageant centrifugé (1)	2	850	954	$0,89 \pm 0,08$	89
Surnageant centrifugé (2)	3	820	1078	$0,76 \pm 0,06$	86
Colonne YMC-BioPro S75	4	125	470	$0,27 \pm 0,02$	13
Lavage	5	21	40	$0,54 \pm 0,03$	2
L'AO éluée	6	417	46	$9,10 \pm 0,09$	44

Selon les résultats obtenus au tableau 6.3, l'amine oxydase chargée sur la colonne de chromatographie n'est pas sortie de la colonne par le lavage avec du tampon phosphate de sodium 50 mM (étape 4 et 5) et avec l'élution (étape 6), l'activité récupérée d'AO est de 44% de son activité initiale. Le pH de la solution de l'AO obtenue était de 5,5. Afin d'ajuster le pH à 7,4, elle a été dialysée pendant 24 h à 4 °C, en utilisant une membrane de cellulose (tubes de dialyse de SIGMA, en retenant un poids moléculaire de 12 000 Da ou plus) dans 4,5 L de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,4) sous agitation. L'activité enzymatique de l'AO a été mesurée avant et après la dialyse. Une perte d'activité enzymatique a été observée. L'activité a diminué de 9,1 \pm 0,1 à 8,2 \pm 0,1 U/mg de protéine environs (90% de l'activité de départ). La solution finale a été conservée à - 80 °C avant la lyophilisation. L'AO obtenue a été caractérisée par les différentes méthodes suivantes.

Caractérisation de l'AO extraite de la source végétale

Zymographie de différentes étapes de purification et détermination de la masse moléculaire de l'AO. L'AO obtenue à partir de pois tachetés a été caractérisée par différentes techniques. L'activité spécifique de l'AO obtenue dans chaque étape de l'extraction a été déterminée par l'essai enzymatique couplé de l'AO et la peroxydase en utilisant la spectrophotométrie UV (tableaux 6.2 et 6.3). Les différentes étapes de purification par la méthode chromatographique d'échange de cations (YMC-BioPro

S75) ont été suivies en zymographie par SDS-PAGE sur des gels contenant la peroxydase. Cette analyse a montré l'intensité (donc l'activité) et la pureté de l'AO obtenue à chaque étape de la purification (figure 6.1). La masse moléculaire de l'AO végétale obtenue au laboratoire a été mesurée à 145 kDa. Ce résultat a été obtenu suite à l'analyse par l'électrophorèse SDS-PAGE du monomère de l'AO avec une masse moléculaire de 72,7 ±3 kDa (figure 6.2). Cette valeur correspond à la masse moléculaire de l'amine oxydase commerciale (DiaMaze).

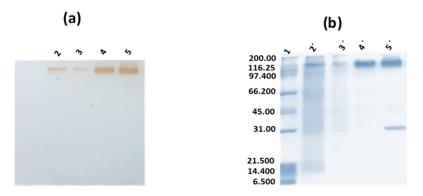


Figure 6.1 Zymographie (a) et la coloration Coomassie (b) durant des étapes de purification de l'AO. 1:Std de masse moléculaire, 2:Homogénat, 3:Surnageant centrifugé, 4:l'AO éluée (fraction pure), 5:l'AO éluée de la colonne chromatographique (fraction non-pure).



Figure 6.2 Coloration Coomassie de monomère de l'AO en comparaison avec la DiaMaze (amine oxydase commerciale). 1 :Std de masse moléculaire, 2:DiaMaze, 3: l'AO obtenue des pousses de pois tachetés, 4:BSA.

Détermination du type d'AO en fonction de son cofacteur (FAD ou ion de cuivre) par zymographie. Les amines oxydases à cuivre, sensibles au semicarbazide, sont inhibées par la complexation du Cuivre (II) avec réactifs contenant des groupements chélateurs, tels que le semicarbazide. Cette méthode distingue les CuAO des enzymes à FAD qui ne sont pas inhibées par le semicarbazide.

L'une des enzymes à FAD est la glucose oxydase. La glucose oxydase (GOD) est définie comme une oxydoréductase pouvant utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons, libérant du peroxyde d'hydrogène. La glucose oxydase est une enzyme homodimère, avec une molécule de FAD étroitement liée au site actif de chaque sous-unité. Vu qu'elle est une enzyme à FAD qui n'est pas sensible à la semicarbazide, elle a été utilisée en tant que contrôle.

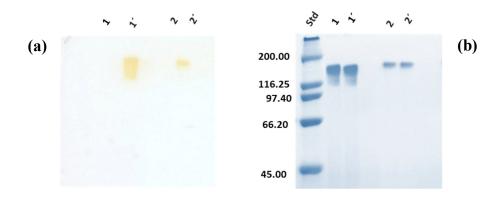


Figure 6.3 Effet du semicarbazide sur l'activité enzymatique de l'AO à cuivre, mis en évidence par zymographie sur SDS-PAGE (8%) contenant la peroxydase piégée dans le gel (a) avec les bandes protéiques dans le gel coloré par Coomassie bleu (b): des échantillons de l'AO commerciale (DiaMaze) traitée (1) ou non traité (1') et de l'AO obtenue au laboratoire à partir du pois tacheté, traitée (2) et non-traitée (2') avec de la semicarbazide. Sur le gel de zymographie (a), une perte de l'activité de l'AO traitée avec semicarbazide (1 et 2) est mise en évidence.

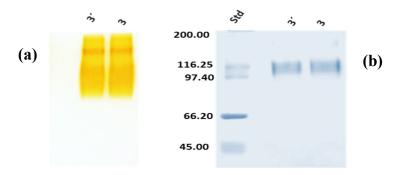


Figure 6.4 Effet du semicarbazide sur l'activité enzymatique de la GOD, mis en évidence par zymographie sur SDS-PAGE (8%) contenant la peroxydase piégée dans le gel (a) avec les bandes protéiques dans le gel coloré par Coomassie bleu (b), des échantillons de la GOD traitée (3) ou non-traitée (3') avec de la semicarbazide. Sur le gel de zymographie (a), une conservation de l'activité de la GOD traitée avec semicarbazide (3,3') est mise en évidence.

L'absence de la bande de l'AO sur le gel de zymographie et la présence de la bande correspondante de l'AO sur le gel coloré par coomassie (figure 6.3), ont confirmé que le semicarbazide inhibe l'AO végétale, tandis que l'intensité de la bande de GOD traitée par le semicarbazide n'a pas changée (figure 6.4). Afin d'évaluer l'effet du semicarbazide sur le CuAOs et sur la GOD, l'activité enzymatique des deux enzymes traitées, avec et sans semicarbazide, a été mesurée par l'essai enzymatique couplé de l'AO avec la peroxydase en utilisant la spectrophotométrie de l'UV. L'activité enzymatique de l'AO en absence de semicarbazide a été 9,1 ±0,15 U/mL, tandis qu'en sa présence, l'activité a été zéro. En comparaison, l'activité enzymatique de la GOD en absence et en présence de la semicarbazide a été de 1,08 ± 0,03 et 1,03 ± 0,03 U/mL.

6.2 Comparaison de l'activité résultante des préparations de l'AO en poudre à partir de l'AO commerciale en solution par les méthodes de nébulisation ou lyophilisation

L'AO commerciale (DiaMaze, DAO-B17F01) a été séchée par deux méthodes : séchage par nébulisation et par lyophilisation (tableau 6.4). Le tréhalose est l'agent

stabilisant le plus couramment utilisé dans les littératures pendant le séchage. Alors, il a été utilisé dans un rapport 1:3 w/w (l'AO: tréhalose) en tant qu'agent stabilisant dans les deux méthodes.

Les résultats obtenus ont montré que la méthode de séchage par nébulisation n'a pas été pratique pour sécher l'amine oxydase. En effet, l'AO séchée par nébulisation a préservée seulement 20 % de son activité initiale et on peut identifier quelques raisons à cela. Premièrement, l'enzyme a subi une température de 80 °C, ce qui a pu degrader ou dénaturer l'enzyme, et deuxièmement, en raison des caractéristiques de l'appareil utilisé, une grande quantité de la protéine a été perdue pendant le séchage, ce qui a diminué le rendement (massique) de la procédure. En comparaison, l'AO séchée par lyophilisation a préservé 55% de son activité initiale. Selon le graphique de comparaison de deux méthodes de séchage (figure 6.5), le rendement obtenu par la méthode de lyophilisation a été plus élevé. Alors, la méthode de lyophilisation a été choisie pour des expériences ultérieures.

Tableau 6.4 Comparaison de l'activité de l'AO (DiaMaze) séchée obtenue par pulvérisation et lyophilisation

Séchage	Préparation	U totales (initiale)	U totales (produit)	Rendement (%)
Pulvérisation	AO	278	53	19
Fulverisation	AO/tréhalose (w/w: 1/3)	278	58	21
Lyambilization	AO	278	150	54
Lyophilisation	AO/tréhalose (w/w: 1/3)	278	154	55

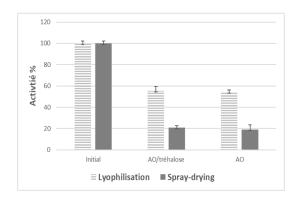


Figure 6.5 Représentation graphique des activités de l'AO obtenue par deux méthodes de séchage : nébulisation et lyophilisation

6.3 Préparation de l'AO en poudre à partir de l'AO en solution par la lyophilisation en utilisant des cryoprotecteurs

La lyophilisation est la méthode la plus couramment utilisée pour sécher les protéines. Elle implique la congélation et la déshydratation, deux étapes à risque pour l'intégrité des protéines, mais généralement plus douce que le chauffage thermique.

Afin d'éviter la perte d'activité enzymatique pendant le séchage, différents cryoprotecteurs ont été évalués. L'agent en tant qu'agent antioxydant, le pyridoxal-5'-phosphate monohydrate, une forme active de la vitamine B6, qui possède la propriété d'antioxydants et de cryoprotecteurs comme des saccharides ont été utilisés pendant la lyophilisation (Mahfouz *et al.*, 2009). Les saccharides utilisés (tableau 6.5) ont été notamment des monosaccharides (glucose, fructose), des disaccharides (sucrose, tréhalose) et des polysaccharides (dextran, CMC). Les mécanismes de protection assurée par des différents cryoprotecteurs sont variés dépendamment de la structure chimique et physique du système total. Par exemple, le mécanisme de protection utilisant des saccharides (chapitre II) dépend de différents facteurs comme les poids moléculaires des saccharides, leur flexibilité et leur solubilité dans l'eau.

Tableau 6.5 Saccharides utilisés en tant que cryoprotecteurs pendant la lyophilisation de l'AO

				masse moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (g/L)
1	Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	CH-CH IN CH-CH-CH-CH-CH-CH-CH-CH-CH-CH-CH-CH-CH-C	180,16	4000
2	Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	CH,OH OH OH OH OH OH	180,16	1200
3	Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	CH ₂ OH OH OH CH ₂ OH	342,3	2100
4	Tréhalose dihydrate	$C_{12}H_{22}O_{11}$	CKLOH OH HOHC OH	378,33	50
5	Dextran T-70				soluble
6	СМС		COONS CHE CHE COONS COONS CHE		soluble

Selon le tableau 6.5, la solubilité des saccharides utilisés en tant que cryoprotecteur est variée; Fructose et sucrose sont plus solubles dans l'eau que les autres sucres utilisés dans ce projet et le tréhalose dihydrate est le moins soluble dans l'eau. Ces différences de solubilité des sucres pourraient affecter le mécanisme de protection pendant la lyophilisation ou l'entreposage.

6.3.1 Évaluation par diffraction des rayons X de l'effet des cryoprotecteurs sur la structure de l'AO lyophilisée

L'amine oxydase a été lyophilisée en absence et en présence de cryoprotecteurs. Les poudres obtenues par lyophilisation ont été exposées aux rayons X et le degré de cristallinité de tous les produits a été rapporté au tableau 6.6.

Tableau 6.6 Degré de cristallinité relative de l'AO en présence et absence de cryoprotecteur.

Composés	Degré de cristallinité (%)
AO	77
AO/Fructose	-
AO/Glucose	-
AO/Sucrose	53
AO/Tréhalose	66
AO/Dextran T-70	18
AO/CMC	17
AO/PLP	80
AO/Agent/Tréhalose	26

Les diffractogrammes de l'AO lyophilisée en présence de cryoprotecteurs ont été comparées avec celle de l'AO en absence de stabilisants (figure 6.6 a-f)

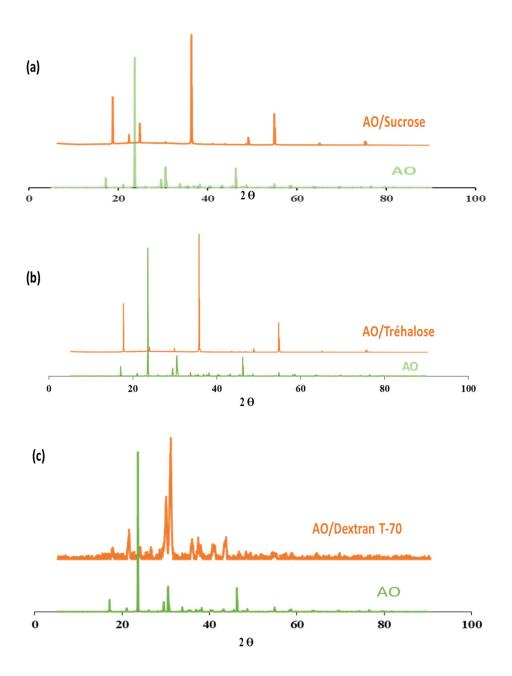


Figure 6.6 Continuation page suivante

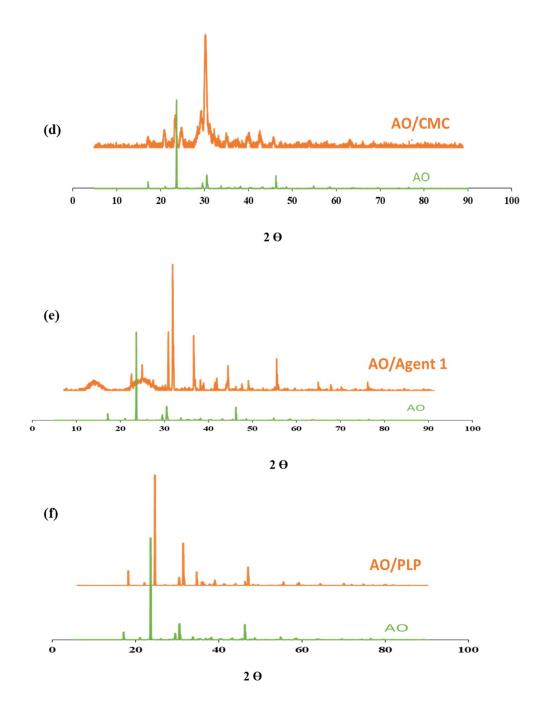


Figure 6.6 Diagrammes de diffraction des rayons X de poudre lyophilisée de l'AO avec et sans cryoprotecteur : Sucrose (a), Tréhalose (b), Dextran T-70 (c), CMC (d), Agent 1b/tréhalose (e) et PLP (f).

6.3.2 Évaluation par analyse thermogravimétrique de l'effet des cryoprotecteurs sur l'humidité de l'AO lyophilisée

Les taux d'humidité des poudres lyophilisées ont été mesurées par l'analyse thermogravimétrique (TGA). Les poudres lyophilisées ont été chauffées jusqu'à 200 °C. Le pourcentage de perte de masse des échantillons a été enregistré en fonction du temps. Leurs graphes ont atteint un plateau vers 120 °C qui a indiqué la perte de l'eau (figure 6.7). Les profils de TGA de l'AO lyophilisée ont montré l'humidité totale des poudres obtenues. Les profiles de 2° DTG de l'AO lyophilisée traitée avec les cryoprotecteurs ont été comparés avec le profil de l'AO en absence de cryoprotecteur (figure 6.8). La vitesse de perte de la masse obtenue par 2° DTG a montré différents types d'eau (absorbée ou structurale) qui n'ont pas été distingués par TGA.

Les résultats obtenus de thermogravimétrie ont montré que la poudre de l'AO lyophilisée en présence des monosaccharides a préservé 18% de l'humidité et la poudre de l'AO en présence des polysaccharides a contenu 10% d'humidité, tandis qu'en présence des disaccharides, PLP et Agent 1b, le pourcentage d'eau de la poudre contenant l'AO lyophilisée a été encore plus faible (6-8%). Les résultats obtenus des profils de dérivée seconde thermogravimétrique (2° DTG) de l'AO lyophilisée en absence et en présence des cryoprotecteurs ont été enregistrés (tableau 6.7). Ces résultats suggèrent qu'il y a eu un type d'eau absorbée à la surface qui a été perdue sous le flux d'argon. Afin d'obtenir le pourcentage d'eau absorbé à la surface, les échantillons ont été chauffés à 30 °C pendant 30 minutes. Ensuite, afin d'obtenir le pourcentage d'eau structurale, les échantillons ont été chauffés à 120 °C pendant 30 minutes. Les graphiques ont atteint un plateau vers cette température, ce qui a indiqué la perte de l'eau.

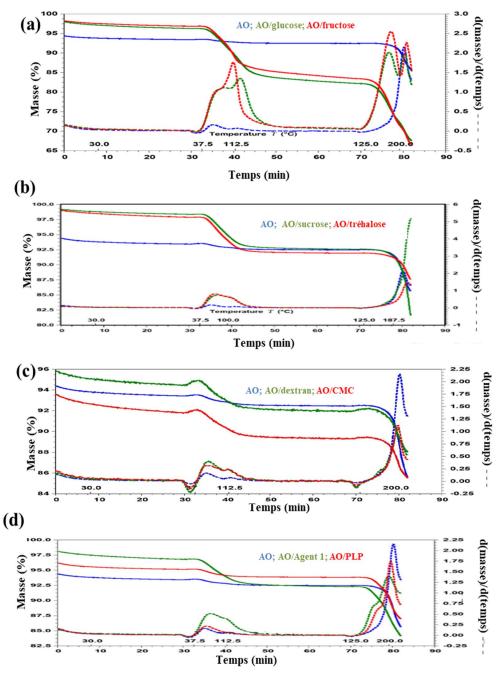


Figure 6.7 Profils de TGA de l'AO lyophilisée en présence des cryoprotecteurs comparés avec le profil de l'AO sans cryoprotecteurs: monosaccharides (a), disaccharides (b), polysaccharide (c), agent et PLP (d). Lignes pleines: le pourcentage de perte de masse et lignes pointillées : la vitesse de perte de masse.

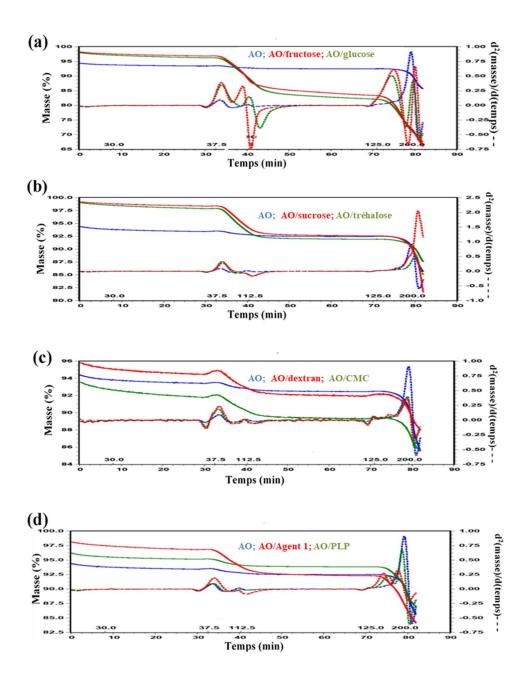


Figure 6.8 Profils de 2^e DTG de l'AO lyophilisée en présence des cryoprotecteurs comparés avec le profil de l'AO sans cryoprotecteurs: monosaccharides (a), disaccharides (b), polysaccharide (c), agent et PLP (d). Lignes pleines: le pourcentage de perte de masse et lignes pointillées : seconde dérivée de la pert de masse en fonction du temps.

Le tableau 6.7 présente les pourcentages de l'humidité de l'AO lyophilisée obtenus par les résultats de thérmogravimétrie (figure 6.7 et 6.8). L'AO lyophilisée contient différents pourcetages de l'humidité en absence et en présence des cryoprotecteurs. Le pourcentage d'eau absorbée à la surface a été obtenu par la perte de masse à la température ambiante sous le flux d'argon jusqu'à un maximum de 30 °C. La masse perdue à 120 °C présente le pourcentage de l'eau structurale.

Tableau 6.7 Humidité de l'AO lyophilisée en absence et en présence des cryoprotecteurs (%), obtenue par analyse thermogravimétrique (mesure en triplicata).

AO lyophilisée	Avec flux d'argon (%)	30 °C (isotherme) (%)	Eau de surface (%)	120 °C (isotherme) (%)	Perte totale (%)
AO	5,50	0,95	6,45	1,03	7,48
AO/Fructose	3,10	1,37	4,47	13,66	18,13
AO/Glucose	3,10	1,67	4,77	13,42	18,19
AO/Tréhalose	0,66	1,12	1,78	5,97	7,73
AO/Sucrose	0,21	0,83	1,04	6,00	7,04
AO/PLP	3,67	1,01	4,68	1,29	5,97
AO/Agent/tréhalose	1,70	1,30	3,00	4,79	7,79
AO/Dextran T-70	4,20	1,33	5,53	2,48	8,01
AO/CMC	6,50	1,76	8,26	2,45	10,71

6.3.3 Évaluation par zymographie de l'effet des cryoprotecteurs sur l'activité de l'AO lyophilisée

L'effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique a été évalué par zymographie (figure 6.9). Le pourcentage de l'intensité (donc l'activité) des bandes de l'AO a été calculé par le logiciel ImageJ (Win64, version 1.47) (figure 6.10). Les résultats obtenus par zymographie et les intensités des bandes de l'AO sur le gel ont montré que le glucose, le fructose, le sucrose et/ou tréhalose ont préservé l'activité enzymatique de l'AO pendant la lyophilisation par rapport à l'AO lyophilisée en absence de cryoprotecteurs (figure 6.10 a). L'intensité de la bande de l'AO en présence de fructose et de glucose a été 22 et 11 % plus que l'intensité de la bande de l'AO lyophilisée sans

cryoprotecteur. L'intensité de la bande de l'AO en présence de tréhalose et de sucrose a été respectivement 26 et 25% de plus que l'intensité de la bande de l'AO sans cryoprotecteur (figure 6.10 a). L'intensité de la bande de l'AO en présence de dextran, de CMC ou d'Agent 1b a diminué tandis que l'intensité de la bande de l'AO en présence de PLP a augmenté (21%) par rapport à l'AO sans cryoprotecteur (figure 10 b).

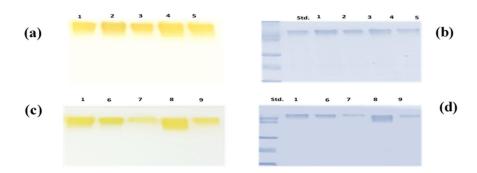


Figure 6.9 Effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique de l'AO, mis en évidence par 10 μg de l'AO dans chaque puits des gels de zymographie sur SDS-PAGE (8%) contenant la peroxydase piégée dans le gel (a et c) avec les bandes protéiques dans les gels colorés par Coomassie bleu (b et d). L'AO en absence de cryoprotecteur (1) et en présence de fructose (2), de glucose (3), de tréhalose (4), de sucrose (5), de dextran T-70 (6), de CMC (7), de PLP (8) et d'Agent 1b (9). Std. : standards de masses molaires.

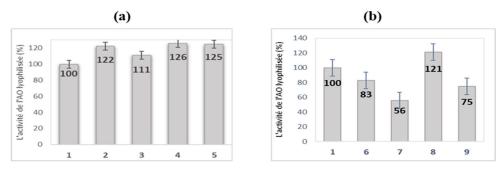


Figure 6.10 Représentation graphique de l'activité enzymatique de l'AO sur le gel de zymographie (obtenu par le logiciel ImageJ) en présence de monosaccharides et disaccharides (a) et en présence de polysaccharide, PLP et agent (b). L'AO en absence de cryoprotecteur et en présence de fructose (2), de glucose (3), de tréhalose (4), de sucrose (5), de dextran T-70 (6), de CMC (7), de PLP (8) et d'Agent 1b (9).

6.3.4 Évaluation par spectroscopie UV-Visible de l'effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique de l'AO lyophilisée

L'activité de l'AO lyophilisée en présence des saccharides a été mesurée par la méthode de dosage couplé avec la peroxydase (HRP), basée sur le peroxyde d'hydrogène généré par l'activité enzymatique (tableau 6.8) ou par la méthode couplée avec GDH basée sur le NH₃ libéré de la putrescine sous l'effet catalytique de l'AO (tableau 6.9).

Tableau 6.8 Activité enzymatique spécifique de l'AO (mesurée en triplicata) en présence et en absence des cryoprotecteurs (par dosage couplé à la HRP)

Préparation	U/mg protéine*	U/mg protéine**	Activité (%)***	Activité (%)****
AO	7,67±0,36	$5,52 \pm 0,09$	100	72
AO/Glucose	$8,57 \pm 0,31$	$6,05 \pm 0,03$	110	79
AO/Fructose	$8,70 \pm 0,26$	$6,46\pm0,12$	117	84
AO/Tréhalose	$8,41 \pm 0,24$	$6,19 \pm 0,06$	112	81
AO/Sucrose	$8,47 \pm 0,49$	$6,63 \pm 0,41$	120	86
AO/Dextran	$8,61 \pm 0,48$	$5,80 \pm 0,07$	105	75
AO/CMC	$7,73 \pm 0,19$	$5,70 \pm 0,05$	103	74

^{*} les activités enzymatiques spécifiques de l'AO en solution.

Tableau 6.9 Activité enzymatique spécifique de l'AO (mesurée en triplicata) en présence et en absence des cryoprotecteurs (par dosage couplé à la GDH)

Préparation	U/mg protéine *	U/mg protéine **	Activité (%)***	Activité (%) ****
AO	$7,66 \pm 0,15$	$5,51 \pm 0,19$	100	72
AO/PLP	$7,53 \pm 0,03$	$5,5\pm0,66$	100	72
AO/Agent/tréhalose	6,22 ±0,01	$6,96 \pm 0,48$	126	91

^{*} les activités enzymatiques spécifiques de l'AO en solution.

^{**} les activités enzymatiques spécifiques après la lyophilisation (poudre résolubilisée).

^{***} Les valeurs rapportées en comparaison avec l'AO lyophilisée sans cryoprotecteur (100%).

^{****} les valeurs rapportées en comparaison avec l'AO en solution sans cryoprotecteur (100%).

^{**}les activités enzymatiques spécifiques après la lyophilisation (poudre résolubilisée).

^{***}Les valeurs rapportées en comparaison avec l'AO lyophilisée sans cryoprotecteur (100%).

^{****}Les valeurs rapportées en comparaison avec l'AO en solution sans cryoprotecteur (100%).

Les résultats de dosage de l'activité par spectroscopie UV-Vis ont montré que les saccharides appliqués ont augmenté l'activité de l'AO en solution à 10-13 % par rapport à l'activité de l'AO sans cryoprotecteurs (tableau 6.8). Les résultats ont aussi montré qu'après la lyophilisation, l'AO en absence de cryoprotecteur a préservé 72% de son activité initiale en solution. Les monosaccharides et les disaccharides appliqués ont préservé l'activité de l'AO pendant la lyophilisation à 79-86 % par rapport à l'activité de l'AO en solution (tableau 6.8). L'Agent 1b en mélange avec du tréhalose a permis un maintient de 91% d'activité de l'AO (tableau 6.9), une valeur la plus élevée en comparaison avec l'AO traitée avec les autres cryoprotecteurs (figure 6.11).

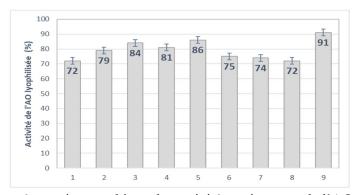


Figure 6.11 Représentation graphique des activités maintenues de l'AO (%), mesurées par la méthode de dosage couplé à HPR et/ou GDH, après la lyophilisation en présence de cryoprotecteurs par rapport à l'activité de l'AO en solution. L'AO lyophilisée sans cryoprotecteur (1), avec du Glucose (2), fructose (3), Tréhalose (4), sucrose (5), dextran T-70 (6), CMC (7), PLP (8) ou Agent 1b /tréhalose (9).

Afin d'évaluer la durabilité de l'activité enzymatique de l'AO séchée, un nouveau lot de DiaMaze (DAO-B18102) a été lyophilisé en présence et en absence des cryoprotecteurs. Le sucrose, le tréhalose, le PLP et l'Agent 1b en mélange avec tréhalose ont été les cryoprotecteurs utilisés dans cette étape. L'activité de l'AO lyophilisée obtenue en présence et en absence de ces cryoprotecteurs a été mesurée

(tableau 6.10 et 6.11) et les poudres obtenues ont été mise en entreposage à $4 \, \text{C}$. À partir de ces poudres obtenues, des comprimés contenant 5.1 mg de protéine (tableau 6.10) ont été préparés et ont été entreposés à $4 \, \text{C}$.

Tableau 6.10 La quantité et l'activité de l'AO lyophilisée (DiaMaze, DAO-B18102) dans chaque comprimé

	AO	AO/Sucrose	AO/Tréhalose	AO/Agent	AO/PLP
La quantité de l'AO (mg/chaque comprimé)	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
L'activité spécifique de l'AO lyophilisée (U/mg de protéine)	1,15	1,36	1.40	1,50	1,17
Unité enzymatique totale/ chaque comprimé	5,9	6,9	7,1	7,6	6.0

Vu que les polysaccharides (CMC et dextran) n'ont eu aucun effet sur l'activité enzymatique de l'AO pendant la lyophilisation, ils n'ont pas été utilisés pour l'étude d'entreposage. Considérant que les monosaccharides ont préservé 18% de l'humidité selon le profil du TGA et de 2^e DTG, seulement les disaccharides, le PLP et l'agent ont été retenus comme cryoprotecteurs. L'activité enzymatique de l'AO en présence de sucrose et tréhalose a été mesurée par le dosage couplé à HRP et en présence d'agent et PLP a été mesurée par la méthode de dosage couplé à GDH (tableau 6.11 a,b).

Les résultats obtenus à la lyophilisation de nouveau lot de DiaMaze (DAO-B18102) ont montré que l'AO lyophilisée en absence des cryoprotecteurs préserve environ 77% de son activité initiale de l'AO en solution. L'activité de l'AO lyophilisée en présence de sucrose et de tréhalose a été respectivement de 89% et de 92% de l'activité initiale de l'AO en solution. L'AO en présence d'Agent 1b/tréhalose a préservé 100% son activité enzymatique par rapport à son activité initiale en solution.

Tableau 6.11 Activité enzymatique spécifique de l'AO (DiaMaze, DAO-B18102) en solution et de l'AO lyophilisée mesurée par le dosage couplé à HRP (a) et par le dosage couplé à GDH (b), mesure en triplicata

(a) Préparation	U/mg*	U/mg **	Activité (%)***	Activité (%)*****
AO	$1,52 \pm 0.09$	$1,15 \pm 0,07$	100	76
AO/Sucrose	$1,68 \pm 0,05$	$1,36 \pm 0,05$	118	89
AO/Tréhalose	$1,68 \pm 0,1$	$1,40 \pm 0,04$	122	92

(b) Préparation	U/mg *	U/mg**	Activité (%)***	Activité (%)*****
AO	$1,50 \pm 0,04$	$1,17 \pm 0,04$	100	78
AO/Agent/Tréhalose	$1,43 \pm 0,06$	$1,50\pm0,05$	128	100
AO/PLP	$1,43 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,06$	100	78
AO/Tréhalose	$1,65 \pm 0,08$	$1,35 \pm 0,02$	115	90

^{*}les activités enzymatiques spécifiques de l'AO en solution.

L'Agent 1b était un mélange avec le tréhalose (50/50:w/w). Afin d'évaluer l'effet de l'agent, la même quantité de tréhalose a été ajoutée à la solution de l'AO suivie par lyophilisation dans les même conditions. L'effet de stabilisation de chaque cryoprotecteur a été évalué individuellement sur l'activité de l'AO lyophilisée. Les effets de l'Agent 1b et du tréhalose ont été mesurés par le dosage d'ammoniac en utilisant la méthode spectroscopie UV-visible (tableau 6.12).

Les résultats obtenus ont montré que l'AO en présence de tréhalose a préservé une activité enzymatique avec approximativement 10% de plus que l'AO lyophilisée sans cryoprotecteur et que l'AO en présence de l'Agent 1b/tréhalose a préservé une activité approximativement de 20% de plus que celle de l'AO lyophilisée sans les cryoprotecteurs (figure 6.12).

^{**}les activités enzymatiques spécifiques après la lyophilisation (poudre résolubilisée).

^{***}Les valeurs rapportées en comparaison avec l'AO lyophilisée sans cryoprotecteur (100%).

^{****}Les valeurs rapportées en comparaison avec l'AO en solution sans cryoprotecteur (100%).

100

		t: DAO-B1	Lot: DAC			
Préparation	U/mg protéine*	Activité (%)**	Activité (%)***	U/mg protéine*	Activité (%)**	Activité (%)****
AO	5,52	100	72	1,17	100	78
AO/Tréhalose	6 19	112	81	1.35	115	90

91

1,50

128

Tableau 6.10 Évaluation de l'effet d'Agent 1b /tréhalose en comparaison avec celui du tréhalose sur l'activité enzymatique de l'AO lyophilisée (mesure en triplicata)

126

6,96

AO/Agent/tréhalose

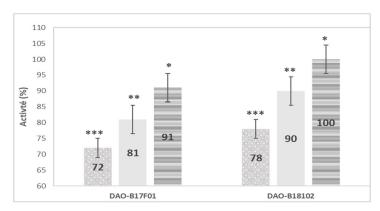


Figure 6.12 Représentation graphique de l'activité de l'AO préservée (%) après lyophilisation en présence d'Agent 1b/tréhalose (*) par rapport à l'activité de l'AO lyophilisée en présence de tréhalose (**) et par rapport à l'activité de l'AO lyophilisée sans cryoprotecteur (***).

6.3.5.1 Évaluation de la stabilité de l'AO lyophilisée en poudre pendant 3 mois.

L'activité enzymatique de l'AO lyophilisée en présence et en absence des cryoprotecteurs a été mesurée pendant 3 mois à 4 °C (tableau 6.13 a,b). Le pourcentage de l'activité préservée de l'AO pendant l'entreposage a été calculé par rapport à l'activité initiale de l'AO en solution sans cryoprotecteurs.

^{*}L'activité enzymatique de l'AO lyophilisée en absence et en présence des cryoprotecteurs. **Les pourcentages présentés par rapport à l'activité de l'AO lyophilisée sans cryoprotecteurs. *** Les pourcentages présentés par rapport à l'activité initiale de l'AO en solution sans cryoprotecteurs.

Tableau 6.11 Effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique de l'AO lyophilisée pendant l'entreposage (mesurée en triplicata) par le dosage couplé à HRP (a) et par le dosage couplé à GDH (b)

(a)	1 m	nois	2 mo	is	3 n	iois
Préparation	U/mg protéine	Activité (%)*	U/mg protéine	Activité (%)*	U/mg protéine	Activité (%)*
AO	1,05	69	0,79	52	0.8	52
AO/Sucrose	1,27	83	1,28	84	1,01	66
AO/Tréhalose	1,3	85	1,18	78	0,95	62

(b)	1 n	ıois	2 mc	ois	3 n	iois
Préparation	U/mg protéine	Activité (%)*	U/mg protéine	Activité (%)*	U/mg protéine	Activité (%)*
AO	1,05	69	0,85	56	0.85	56
AO/Agent/Tréhalose	1,50	99	1,48	97	1,16	76
AO/PLP	1,02	67	0,98	64	0,95	62

^{*} Les valeurs ont été rapportées en comparaison avec l'activité initiale de l'AO en solution sans cryoprotecteur.

Les résultats obtenus ont montré que l'activité de l'AO en absence et en présence des cryoprotecteurs a diminué chaque mois (figure 6.13). Cependant, les activités de l'AO en présence des cryoprotecteurs ont été plus élevées que l'activité de l'AO sans cryoprotecteur. Après trois mois, l'activité de l'AO en présence d'Agent 1b/tréhalose (tableau 6.13 b) a été la plus élevée (76%). Le sucrose et le tréhalose ont préservé l'activité enzymatique de l'AO de 14 % et 10% plus élevée par rapport à l'activité de l'AO sans cryoprotecteurs (tableau 6.13 a). Alors, selon le résultat d'entreposage de l'AO lyophilisée en trois mois, l'Agent 1b/tréhalose, sucrose et tréhalose ont été les cryopotrecteurs convenables pour l'entreposage de l'AO. En absence et en présence de PLP, l'AO perd 31-33% de son activité en comparaison avec l'activité initiale de l'AO en solution sans cryoprotecteurs, mais les deux mois suivants, le taux de perte de l'activité de l'AO en présence de PLP a été diminué.

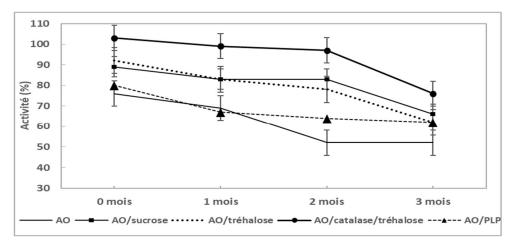


Figure 6.13 Représentation graphique de l'activité de l'AO lyophilisée en présence et en absence des cryoprotecteurs préservée pendant 3 mois de l'entreposage.

6.3.5.2 Évaluation de stabilité de l'AO lyophilisée en absence et en présence des cryoprotecteurs sous forme de comprimés pendant l'entreposage

Les comprimés de l'AO lyophilisée avec et sans cryoprotecteurs ont été préparés et leur stabilité à l'entreposage a été vérifiée pendant 3 mois à 4°C. Des comprimés sans l'AO ont été préparés en tant que contrôle. L'interférence de la matrice avec les méthodes de dosage de l'activité a été évaluée. Il n'y avait eu aucune interférence de la matrice avec les méthodes de dosage de l'activité de l'AO. chaque comprimé contient 5.1 mg de protéine de l'AO lyophilisée (tableau 6.10) et le pourcentage de l'activité préservée de l'AO pendant l'entreposage a été calculé par rapport à l'activité initiale de l'AO lyophilisée dans chaque comprimé. Les résultats obtenus ont montré que la perte de l'activité enzymatique de l'AO lyophilisée sans protecteur et en présence de PLP a été plus élevée que la perte de l'activité de l'AO en présence des autres cryoprotecteurs (figure 6.14). L'AO lyophilisée en présence de tréhalose, sucrose ou d'Agent 1b/tréhalose (formulée sous forme de comprimés) a perdu 5% de son activité pendant 3 mois, tandis que en présence de PLP et en absence de cryoprotecteurs, elle a perdu 10-14% de son activité initiale (tableau 6.14).

Tableau 6.14 Effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique de l'AO lyophilisée (formulée sous forme de comprimés) pendant l'entreposage mesuré par le dosage couplé à HRP (a) et par le dosage couplé à GDH (b)

(a)	0 mois	1mois	2 mois	3 mois
Préparation	activité (%)*	activité (%)*	activité (%)*	activité (%)*
AC	29	28	21	19
AO/tréhalose	37	35	34	33,5
AO/sucrose	36	35	34	32

(b)	0 mois	1mois	2 mois	3 mois
Préparation	activité (%)*	activité (%)*	activité (%)*	activité (%)*
AC	29	28	21	19
AO/agent/tréhalose	33	33	33	28,5
AO/PLF	28	25	20	14,5

^{*} l'activité de l'AO en forme de comprimés a été présentée en pourcentage par rapport à l'activité initiale de l'AO dans les comprimés.

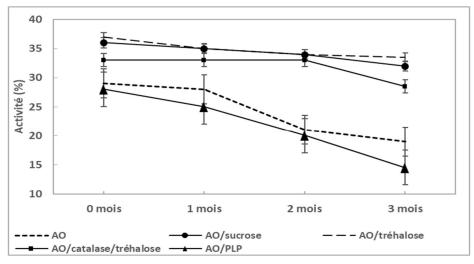


Figure 6.14 Représentation graphique de l'activité de l'AO lyophilisée (sous forme des comprimés) en absence et en présence des cryoprotecteurs pendant 3 mois entreposage.

CHAPITRE VII

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'amine oxydase (AO) est la principale enzyme qui catabolise diverses amines biogènes telles que l'histamine. Chez les personnes en bonne santé, l'histamine alimentaire peut être rapidement détoxifiée par l'amine oxydase intestinale, alors que les personnes à faible activité d'amine oxydase sont exposées à un risque de toxicité par l'histamine (Maintz et Novak, 2007). Le déséquilibre entre l'histamine accumulée et la capacité de dégradation de l'histamine provoque une intolérance à l'histamine avec de nombreux symptômes imitant une réaction allergique (Raithel *et al.*, 1999). Ainsi, l'histaminose alimentaire est souvent appelée " pseudo allergie". L'excès d'histamine a aussi un rôle important dans les maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Kennedy *et al.*, 2012).

Il fut proposé que l'amine oxydase administrée oralement pourrait être utilisée en tant que supplément alimentaire ou peut être même un agent thérapeutique pour la dégradation de l'histamine (Mondovi *et al.*, 2013).

L'AO végétale a une activité enzymatique spécifique supérieure à celle de l'AO animale. Les légumineuses contiennent des quantités élevées d'amine oxydase. Les pousses des espèces *Cicer arietinum*, *Lens esculenta*, *Lathyrus cicera*, *Lathyrus sativus et Pisum sativum* sont les sources les plus utilisées pour l'extraction de l'AO (Medda *et al.*, 1995; Vianello *et al.*, 1993). Dans le projet actuel, l'extraction de l'AO a été effectuée à partir des différentes sources de légumineuses (soja, pois vert, pois sucré,

pois jaune, pois chiche et pois tacheté). Ces sources contiennent de l'AO entre 850-1500 U par un kg de pousses germées en conditions optimales.

Différentes méthodes de purification de l'AO à partir de sources végétales rapportées auparavant sont difficiles et longues. Si la procédure de purification est longue, la stabilité de l'AO pendant les différentes étapes n'est pas garantie. L'AO peut perdre son activité enzymatique dans chaque étape et en conséquence le rendement de purification est moins élevé. Par exemple, une méthode de purification en utilisant le fractionnement au sulfate d'ammonium et la colonne de phosphate de cellulose suivis d'une deuxième colonne 6-amino-hexyl-sepharose apporte un rendement de 28% (Vianello *et al.*, 1993) qui est une évidence de perte d'activité enzymatique pendant différentes étapes de purification.

La chromatographie par échange d'ions est largement utilisée pour la purification de biomolécules en fonction de leur charges ioniques. La purification de l'AO à partir des sources végétales a été effectuée par la chromatographie échangeuse de cations (YMC-BioPro, SP75) qui est rapide et facile avec un rendement plus élevé par rapport aux méthodes utilisées auparavant. Le rendement obtenu en AO pour le pois tacheté (*Pisum sativum*) a été de 46% soit, 10-15 % plus élevé que par la méthode de Vianello et al, 1993. Les rendements obtenus pour le soja et le pois chiche ont été de 30 et 7% respectivement. Cette méthode est plus convenable pour la purification de l'AO à partir des pousses de pois tachetés, qui est une source locale canadienne.

La zymographie est une technique dans laquelle une activité enzymatique d'un enzyme est analysée après l'électrophorèse. La séparation électrophorétique se fait en fonction de la taille des protéines et leur mobilité sur le gel. La zymographie permet de caractériser de l'enzyme dans des extraits bruts ou des fractions partiellement purifiées (Scadden et Naaby-Hansen, 2001). Cette méthode avec la coloration du bleu de Coomassie peux aider pendant la purification de protéines pour vérifier l'activité enzymatique et la pureté de l'AO. L'activité enzymatique de l'amine oxydase peux être

déterminée par la zymographie sur le gel de polyacrylamide contenant la peroxydase. Cette méthode est basée sur une réaction couplée avec la peroxydase immobilisée dans le gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). La putrescine est le substrat de l'AO et l'orthophénylène diamine est un co-substrat pour la peroxydase et sont utilisés pour détecter l'activité de l'AO (Calinescu et al., 2010). Les méthodes actuelles pour déterminer l'activité enzymatique des oxydases sont basées sur la mesure du taux de consommation d'oxygène ou de production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cependant, ces méthodes ne peuvent pas être utilisées en présence d'enzymes ou de protéines interférentes, en particulier l'agent (décomposition de H₂O₂ et libération d'O₂) (Le et al., 2018). La zymographie est une méthode efficace pour déterminer l'activité enzymatique spécifique de l'AO en présence des protéines interférentes. L'activité et la pureté de l'AO obtenue à chaque étape de la purification ont été mises en évidence par la zymographie sur gel (SDS-PAGE) contenant la peroxydase et le résultat confirme l'intensité plus élevée de l'AO purifiée par rapport à l'AO de l'extrait brut. La présence d'une seule bande de l'AO purifiée sur le gel coloré par le bleu de Coomassie a été une preuve de la pureté de l'AO obtenue.

Selon McCuirl *et al.*, la masse molaire de l'AO à partir des pousses de pois est 150 ± 6 kDa (McCuirl *et al.*, 1994). La masse moléculaire de l'AO végétale obtenue au laboratoire a été mesurée à 145 kDa. Ce résultat a été obtenu suite à l'analyse par l'électrophorèse SDS-PAGE du monomère de l'AO avec une masse moléculaire de 72,7±3 kDa. Cette valeur correspond à la masse moléculaire de l'amine oxydase commerciale (DiaMaze).

Le type de l'AO en fonction de son cofacteur (FAD ou ion de cuivre) peut être déterminé en présence de semicarbazide. Les AOs à cuivre appelées amine oxydases sensibles au semicarbazide (SSAOs) sont inhibées par le semicarbazide (O'Sullivan, 2004). La méthode de zymographie et aussi le dosage d'activité enzymatique par la spectroscopie UV-Vis ont mis en évidence que l'AO obtenue à partir des pousses de

pois tacheté est une enzyme à cuivre. Également, l'AO traitée avec semicarbazide n'a eu aucune activité sur le gel de zymographie tandis que la GOD (enzyme à FAD) avait préservé son activité enzymatique.

Comme la plupart des protéines, l'AO est instable en solution et en conditions humides. L'élimination de l'eau est une méthode courante pour prolonger la stabilité de l'AO pendant l'entreposage. Les techniques les plus utilisées sont la lyophilisation et le séchage par nébulisation (Ajmera et Scherliess, 2014) qui ont été appliquées pour sécher l'amine oxydase obtenue en solution. Par la méthode de nébulisation, l'activité de l'AO en poudre était à 20 % de son activité initiale en solution, tandis que l'activité enzymatique de l'AO a été préservée jusqu'à 55% par la méthode de lyophilisation. Le séchage par pulvérisation à l'échelle du laboratoire n'a pas été une méthode efficace en raison de la perte d'activité probablement due à la température élevée (80 °C). Selon les résultats obtenus, la méthode de lyophilisation a été une méthode efficace pour préparer l'AO en poudre. Toutefois, ce processus cause des contraintes liées à la congélation et à la déshydratation des protéines, ce qui peut entraîner une altération de la structure de l'AO et une certaine perte de son activité enzymatique pendant la procédure de séchage.

Pour stabiliser l'AO pendant la lyophilisation, une molécule hydrophile peut être utilisée en tant que cryoprotecteurs pour éviter la dénaturation des protéines et préserver la stabilité pendant et après la lyophilisation. Les sucres peuvent stabiliser l'AO par trois différents mécanismes : i) la vitrification, ii) l'exclusion préférentielle et iii) le remplacement de l'eau par les molécules de sucre qui se lient à la surface de l'AO en poudre par pont hydrogène (Jain et Roy, 2009). Les deux premiers mécanismes sont impliqués dans l'étape de congélation, tandis que le dernier pourrait affecter aussi l'enzyme dans l'étape de déshydratation. Afin de vérifier les effets des cryoprotecteurs sur l'AO pendant la lyophilisation, l'AO lyophilisée en présence et en absence de

cryoprotecteurs a été caractérisée par différentes méthodes : diffraction des rayons X (DRX), TGA, le dosage d'activité par la méthode de spectroscopie et zymographie.

Tous les diffractogrammes de l'AO lyophilisée en présence des cryoproctecteurs ont été différents par rapport au diffractogramme de l'AO lyophilisée en absence des cryoprotecteurs, sauf le diffractogramme de l'AO lyophilisée en présence de PLP. Dans les diffractogrammes de l'AO lyophilisée traitée avec tréhalose ou sucrose, aucun pic typique et distinct de cryoprotecteurs n'a été observé (figures 6.6). Il a été suggéré que les molécules des saccharides, qui contiennent plusieurs groupes hydroxyle dans leur structure, forment des ponts hydrogènes avec l'enzyme. Ces nouveaux composés présentent des nouvelles caractéristiques et un diffractogramme différents de celui de l'AO. Cependant, l'AO traitée avec PLP n'a pas montré aucun changement structural.

Les effets des cryoprotecteurs sur le pourcentage d'humidité de l'AO lyophilisée ont été évalués par analyse thermogravimétrique (figure 6.7 et 6.8). Ces données ont montré que l'Agent 1b/tréhalose, les monosaccharides et disaccharides ont augmenté le pourcentage d'eau structurale autant qu'ils diminuent l'eau absorbée à la surface. En présence de monosaccharides, le pourcentage total et aussi le pourcentage de l'eau absorbée dans la structure de l'AO ont été plus élevés que le pourcentage d'eau en présence des autres cryoprotecteurs. Cet effet augmente le risque de perte d'activité enzymatique pendant l'entreposage. Ces résultats ont aussi montré que le mécanisme et la vitesse de perte de l'eau de l'AO en présence de monosaccharide étaient complètement différents du mécanisme de perte de l'eau de l'AO en présence des autres cryoprotecteurs. En plus, les monosaccharides ont fait une réaction secondaire à la présence de chaleur autour de 150 °C, ce qui n'a pas été le cas des autres saccharides. Cette réaction pourrait être liée au brunissement de Maillard. Étant donné que l'eau a un rôle important dans la structure de l'AO, le pourcentage de l'eau doit être optimisé pour préserver la structure 3D de l'enzyme.

L'activité de l'AO commerciale en solution et aussi pendant la lyophilisation a été mesurée en présence et en absence des cryoprotecteurs par la méthode de dosage couplé. L'activité de l'AO en solution a été augmentée 10-13% en présence des monosaccharides et des disaccharides utilisés (tableau 6.8 et 6.9). Il a été suggéré que les molécules des saccharides, contenant plusieurs groupes hydroxyle dans leur structure, forment des ponts hydrogènes avec l'enzyme. Il est possible que cette intéraction entre l'enzyme et les saccharides utilisés, expose le site actif de l'enzyme et le rend plus accessible pour le substrat.

Selon les résultats obtenus (tableau 6.8, 6.9 et 6.11), les monosaccharides (glucose et fructose), les disaccharides (sucrose et tréhalose) et l'Agent 1b/tréhalose ont eu des effets bénéfiques sur la stabilité de l'AO pendant la lyophilisation. Le sucrose et le tréhalose (dépendamment de lot de l'enzyme utilisé) préservent l'activité de l'AO approximativement 10%-14% de plus que l'AO sans cryoprotecteur pendant la lyophilisation. Un effet protecteur de 20 % de l'Agent 1b a été évalué sur l'activité de l'AO, mais il faut considérer que l'Agent 1b contenait 50% tréhalose. Donc, une partie de protection pourrait être liée à la présence de tréhalose (figure 6.12). À la même concentration de tréhalose, la protection obtenue était de seulement 10%. Ainsi, un effet protecteur de l'Agent 1b peut être envisagé. Dans le contexte de la stabilisation de l'AO, les sucres réducteurs (glucose) ne peuvent pas être utilisés. Le brunissement de Maillard commence par une réaction entre le groupe aldéhyde du sucre et le groupe amine de la protéine formant une base de Schiff. À la suite de cette réaction, une agrégation de protéines et de matrices se forme. La formation de cette agrégation est covalente et irréversible (Martins *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2013).

Les effets des cryoprotecteurs utilisés sur l'amine oxydase ont été vérifiés par zymographie. La présence de différents protecteurs n'a eu aucun effet sur la mobilité de l'enzyme sur le gel, mais les cryoprotecteurs pourraient engendrer une diffusion locale de l'AO provoquant un changement de l'intensité et de l'épaisseur de la bande de l'AO. Ainsi, les cryoprotecteurs peuvent affecter l'évaluation de l'activité

enzymatique spécifique sur le gel de zymographie. Étant donné que ces cryoprotecteurs ont eu des interactions différentes avec l'AO, ils ont pu affecter l'épaisseur et l'intensité de la bande de zymographie de l'AO sur SDS-PAGE par différents mécanismes. Par exemple, lorsque l'AO a été traitée avec des polysaccharides, en particulier la CMC, l'enzyme pourrait avoir une interaction avec le groupement carboxyle de la CMC, ce qui pourrait réduire l'intensité et l'épaisseur de la bande de l'AO en zymographie. Les monosaccharides et les disaccharides sont suffisamment petits pour qu'ils puissent s'approcher de l'enzyme et s'associer à la structure de l'AO par les liaisons d'hydrogène. Ces liaisons d'hydrogène n'ont pas modifié la mobilité de l'enzyme sur le gel de zymographie, mais elles ont augmenté légèrement l'intensité de la bande de l'AO sur le gel. Puisque le pk_a de PLP est de 4,11, il pourrait être sous forme ionique à pH supérieur. Alors, il est possible que le PLP établisse une paire ionique avec l'amine oxydase. Puisque le PLP est coloré, il pourrait être suivi sur le gel au cours de l'électrophorèse. Probablement, une partie de PLP se déplacerait beaucoup plus rapidement que la bande de l'enzyme sur le gel. Cependant, une certaine quantité de PLP pourrait rester associée à l'enzyme, en augmentant ainsi, de façon artificielle l'épaisseur de la bande de zymographie de l'AO sur la SDS-PAGE sans que cela change l'activité de l'AO appliquée sur gel.

Parmi tous les cryoprotecteurs utilisés pendant la lyophilisation de l'AO, les disaccharides, l'Agent 1b/tréhalose ou le PLP ont été choisis pour les évaluations plus profondes pendant l'entreposage de trois mois à 4°C. Après trois mois, l'AO sous forme de poudre en absence des cryoprotecteurs a perdu environ 50% de son activité par rapport à son point de départ avant la lyophilisation, mais la perte de l'activité enzymatique de l'AO lyophilisée en présence de sucrose et de tréhalose était de 35% et en présence d'Agent 1b/tréhalose a été de 25%. L'AO sous forme de comprimé en absence de cryoprotecteur perd 10% de son activité par rapport au point de départ, tandis qu'en présence des cryoprotecteurs, l'AO perd 4% de son activité enzymatique.

Les résultats obtenus ont confirmé les effets bénéfiques des disaccharides et l'Agent 1b pendant la lyophilisation et l'entreposage.

En conclusion, les points saillants de ce projet de maîtrise sont :

- Parmi les sources locales, le pois tacheté semble la meilleure.
- Une séparation chromatographique échangeuse de cations (YMC-BioPro, SP75) permet une purification de l'AO simple et rapide.
- L'AO traitée avec le semicarbazide a été identifiée en tant qu'une enzyme à cuivre.
- La méthode de lyophilisation en présence de sucrose, tréhalose ou Agent 1b comme protecteur permet l'obtention des poudres d'AO avec une bonne activité enzymatique.
- L'Agent 1b en mélange avec tréhalose a montré la meilleure préservation de l'activité enzymatique à la lyophilisation et durant trois mois d'entreposage.

RÉFÉRENCES

- Abdelwahed, W., Degobert, G. et Fessi, H. (2006). A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 309, 178-188.
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. et Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1688-1713.
- Abdul-Fattah, A. M., Kalonia, D. S. et Pikal, M. J. (2007). The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implications. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96, 1886-1916.
- Aboukarr, A. et Giudice, M. (2018). Interaction between Monoamine Oxidase B Inhibitors and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, 71, 196-207.
- Agostinelli, E., Tempera, G., Viceconte, N. et Saccoccio, S. (2010). Potential anticancer application of polyamine oxidation products formed by amine oxidase: a new therapeutic approach. *Amino Acids*, *38*, 353-368.
- Ahmadifar, S., Le, T. C., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M. A. (2017). Zymographic approach to determine the intrinsic enzyme specific activity of diamine oxidase in presence of interfering enzymes. *Analytica Chimica Acta*, 975, 78-85.
- Ajmera, A. et Scherliess, R. (2014). Stabilisation of proteins via mixtures of amino acids during spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 463, 98-107.

- Alkeev, N., Averin, S. et von Gratowski, S. (2015). New Method for Monitoring the Process of Freeze Drying of Biological Materials. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 16, 1474-1479.
- Allison, S. D., Chang, B., Randolph, T. W. et Carpenter, J. (1999). Hydrogen Bonding between Sugar and Protein Is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *365*, 289-298.
- Ameri, M. et Maa, Y.F. (2007). Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. *Drying Technology*, *24*, 763-768.
- Ancín-Azpilicueta, C., Jiménez-Moreno, N. et Sola-Larrañaga, C. (2019). Wine. Dans *Innovations in Traditional Foods* (p. 221-256).
- Anderson, M., Hasan, F., McCrodden, J. et Tipton, K. (1993). Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochemical Research*, *18*, 1145-1149.
- Angelini, R., Cona, A. et Tavladoraki, P. (2018). Determination of Copper Amine Oxidase Activity in Plant Tissues. *Methods in Molecular Biology*, *1694*, 129-139.
- Bachrach, U., Wang, Y.C. et Tabib, A. (2001). Polyamines: New Cues in Cellular Signal Transduction. *News in physiological sciences*, *16*, 106-109.
- Bardocz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health *Trends in Food Science & Technology*, 6, 341-346.
- Barley, J. (2018). Basic Principles of Freeze Drying. Dans *SP Scientific*. Récupéré de https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics
- Baumer, W. et Rossbach, K. (2010). Histamine as an immunomodulator. *Journal of the german society of dermatology*, 8, 495-504.

- Benedetti, M. (2011). FAD-dependent enzymes involved in the metabolic oxidation of xenobiotics. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 69, 45-52.
- Benly, P. (2015). Role of Histamine in Acute Inflammation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7, 373-376.
- Berg, J., Tymoczko, J. et Stryer, L. (2000). Protein Structure and Function. Dans *Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Bhuyan, S. et Mukherjee, S. (2019). Does Water Expand When It Freezes? Dans *science fact*. Récupéré de https://www.sciencefacts.net/why-does-water-expand-when-it-freezes.html
- Biegański, T., Osińska, Z. et Maśliński, C. (1982). Inhibition of plant and mammalian diamine oxidases by hydrazine and guanidine compounds. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 14, 949-953.
- Binda, C., J., W., Pisani, L., Caccia, C., Carotti, A., Salvati, P., Mattevi, A. (2007). Structures of human monoamine oxidase B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 5848-5852.
- Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubalek, F., Edmondson, D. E. et Mattevi, A. (2002). Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature structural biology*, *9*, 22-26.
- Bjeldanes, L., Schutz, D. et Morris, M. (1978). On the aetiology of scombroid poisoning: cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food cosmetics toxicology journal*, 16, 157-159.
- Blaschko, H. (1974). The natural history of amine oxidases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 70, 83-148.

- Blemur, L., Le, T. C., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M. A. (2016). Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63, 344-353.
- Blows, W. (2000). Neurotransmitters of the brain: serotonin, noradrenaline (norepinephrine), and dopamine. *Journal of Neuroscience Nursing*, *32*, 234-238.
- Bogdani, E. (2011). Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique (thèse de doctorat). Univérsité Claude Bernard Lyon. Récupéré de https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00838568/document.
- Bortolato, M. et Shih, J. C. (2011). Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. *International review of neurobiology*, 100, 13-42.
- Bouchereau, A., Guenot, P. et Larher, F. (2000). Analysis of amines in plant materials. *Journal of Chromatography B*, 747, 49-67.
- Brink, B. t., Damink, C., Joosten, H. M. et Veld, J. H. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73-84.
- Brummett, B. H., Krystal, A. D., Siegler, I. C., Kuhn, C. et Surwit, R. S. (2007). Associations of a regulatory polymorphism of monoamine oxidase-A gene promoter (MAOA-uVNTR) with symptoms of depression and sleep quality. *Psychosomatic Medicine*, 69, 396-401.
- Brunner, H. G., Nelen, M., Breakefield, X. et Ropers, H. (1993). Abnormal Behavior Associated with a Point Mutation in the Structural Gene for Monoamine Oxidase A. *American Association for the Advancement of Science* 262, 578-580.
- Brunner, H. G., Nelen, M. R., Zandvoort, P. v., Abeling, N. G., Gennip, A. H., Wolters, E. C. (1993). X-Linked Borderline Mental Retardation with Prominent

- Behavioral Disturbance: Phenotype, Genetic Localization, and Evidence for Disturbed Monoamine Metabolism. *American Journal of Human Genetics*, *52*, 1032–1039.
- Buffoni, F. et Ignesti, G. (2000). The copper-containing amine oxidases: biochemical aspects and functional role. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71, 559-564.
- Calinescu, C., Federico, R., Mondovi, B. et Mateescu, M. A. (2010). Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*, 1281-1290.
- Calinescu, C., Mondovi, B., Federico, R., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M. A. (2012). Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 428, 48-56.
- Campestre, M. P., Bordenave, C. D., Origone, A. C., Menendez, A. B., Ruiz, O. A., Rodriguez, A. A. et Maiale, S. J. (2011). Polyamine catabolism is involved in response to salt stress in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology*, *168*, 1234-1240.
- Carpenter, J. F. et Crowe, J. H. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Journal of Biochemistry*, 28, 3916-3922.
- Carpenter, J. F., Pikal, M. J., Chang, B. S. et Randolph, T. W. (1997). Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice. *Pharmaceutical Research*, 14, 969-975.
- Carpenter, J. F., Prestrelski, S. J., Anchordoguy, T. J. et Arakawa, T. (1994). Interactions of Stabilizers with Proteins During Freezing and Drying. Dans *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides* (p. 134-147).
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S. (1995). Aggressive Behavior and Altered Amounts of Brain Serotonin and Norepinephrine in Mice

- Lacking MAOA. American Association for the Advancement of Science, 268, 1763–1766.
- Chan, J. M. (2019). Drug Metabolism and Pharmacogenetics. Dans *Pharmacology and Physiology for Anesthesia* (p. 70-90).
- Chang, B. S., Kendrick, B. S. et Carpenter, J. F. (1996). Surface-Induced Denaturation of Proteins during Freezing and Its Inhibition by Surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1325-1330.
- Chang, J. (1997). A Two-Stage Mechanism for the Reductive Unfolding of Disulfidecontaining Proteins. *The Journal Of Biological Chemistry*, 272, 69-75.
- Cheng, C. H., Huang, S. C., Chiang, T. Y., Wong et Huang, Y. C. (2013). Higher plasma pyridoxal phosphate is associated with increased antioxidant enzyme activities in critically ill surgical patients. *BioMed Research International*, 2013, 1-7.
- Cheuk, W. L. et Finne, G. (1984). Enzymatic determination of urea and ammonia in refrigerated seafood products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 14-18.
- Chiu, P. L., Kelly, D. F. et Walz, T. (2011). The use of trehalose in the preparation of specimens for molecular electron microscopy. *Micron*, 42, 762-772.
- Cogoni, A., Piras, C., Melis, A. et Floris, G. (1990). Hordeum vulgare Seedlings Amine Oxidase Purification and Properties. *Plant Physiology*, *93*, 818-821.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. et Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends In Plant Science 11*, 80-88.

- Corpillo, D., Valetti, F., Giuffrida, M. G., Conti, A., Rossi, A., Finazzi-Agro, A. et Giunta, C. (2003). Induction and characterization of a novel amine oxidase from the yeast Kluyveromyces marxianus. *Yeast*, *20*, 369-379.
- Coruzzi, G., Morini, G., Adami, M. et Grandi, D. (2001). Role of histamine h3 receptors in the regulation of gastric functions. *Journal of Physiology And Pharmacology*, 52, 539-553.
- Costa, M. P., Rodrigues, B. L., Frasao, B. S. et Conte-Junior, C. A. (2018). Biogenic Amines as Food Quality Index and Chemical Risk for Human Consumption. Dans *Food Quality: Balancing Health and Disease* (p. 75-108).
- Costantino, H. R., Firouzabadian, L., Wu, C., Carrasquillo, K. G., Griebenow, K., Zale, S. E. et Tracy, M. A. (2002). Protein spray freeze drying. 2. Effect of formulation variables on particle size and stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *91*, 388–395.
- Craig, D. Q., Royall, P. G., Kett, V. L. et Hopton, M. L. (1999). The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 179, 179–207.
- Croom, E. (2012). Metabolism of xenobiotics of human environments. Dans *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 112, chap. 3, p. 31-88.
- Crowe, J., Leslie, S. et Crowe, L. (1994). Is Vitrification Sufficient to Preserve Liposomes during Freeze-Drying? *Cryobiology*, *31*, 355-366.
- Cui, Z., Zhang, Y., Inoue, H., Yogo, S. et Hirasawa, E. (2013). Purification and molecular analysis of a monoamine oxidase isolated from Narcissus tazetta. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 77, 1728-1733.
- Danielczyk, W., Streifler, M., Konradi, C., Riederer, P. et Moll, G. (1988). Platelet MAO-B activity and the psychopathology of Parkinson's disease, senile dementia and multi-infarct dementia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 78, 730-736.

- Daugherty, A. L. et Mrsny, R. J. (2006). Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *58*, 686-706.
- De Biase, D., Agostinelli, E., De Matteis, G., Mondovì, B. et Morpurgo, L. (1996). Half-of-the-sites reactivity of bovine serum amine oxidase. Reactivity and chemical identity of the second site. *European Journal of Biochemistry*, 237, 93-99.
- Depreter, F., Pilcer, G. et Amighi, K. (2013). Inhaled proteins: challenges and perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 447, 251-280.
- Dincer, E., Oguz, M. et Baris, Y. (2018). Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. Dans C. Proestos (dir.), *Biogenic Amines* (p. 1-19).
- Domino, E. et Khanna, S. (1976). Decreased blood platelet MAO activity in unmedicated chronic schizophrenic patients. *The American Journal of Psychiatry*, 133, 323-326.
- Domschke, K., Sheehan, K., Lowe, N., Kirley, A., Mullins, C., O'Sullivan, R., Hawi, Z. (2005). Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children. *American Journal of Medical Genetics*, 134B, 110-114.
- Elovaara, H., Huusko, T., Maksimow, M., Elima, K., Yegutkin, G., Skurnik, M., Jalkanen, S. (2015). Primary Amine Oxidase of Escherichia coli Is a Metabolic Enzyme that Can Use a Human Leukocyte Molecule as a Substrate. *Journal of PLoS One*, 10, 1-20.
- Emami, F., Vatanara, A., Park, E. J. et Na, D. H. (2018). Drying Technologies for the Stability and Bioavailability of Biopharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 10, 1-22.
- Erdag, D., Merhan, O. et Yildiz, B. (2018). Biochemical and pharmacological properties of biogenic amines. Dans *Biogenic Amines* (p.1-14).

- Fargeas, M., Fioramonti, J. et Bueno, L. (1989). Involvement of Different Receptors in the Central and Peripheral Effects of Histamine on Intestinal Motility in the Rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 41, 534-540.
- Federico, R. et Angelini, R. (1988). Distribution of polyamines and their related catabolic enzyme in etiolated and light-grown leguminosae seedlings. *Planta An International Journal of Plant Biology*, 173, 317 321.
- Federico, R. et Angelini, R. (1986). Occurrence of diamine oxidase in the apoplast of pea epicotyls. *Planta An International Journal of Plant Biology*, *167*, 300-302.
- Ferrari, R. A., Gaber, Y. et Fraaije, W. M. (2014). A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 1-8.
- Filic, V., Vladic, A., Stefulj, J., Cicin-Sain, L., Balija, M., Sucic, Z. et Jernej, B. (2005). Monoamine oxidases A and B gene polymorphisms in migraine patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 228, 149-153.
- Finney, J., Moon, H. J., Ronnebaum, T., Lantz, M. et Mure, M. (2014). Human copper-dependent amine oxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *546*, 19-32.
- Fleming, L. M., Olin-Sandoval, V., Campbel, K. et MarkusRalser. (1998). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology*, 427, 3389-3406.
- Gaweska, H. et Fitzpatrick, P. F. (2011). Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomolecular Concepts*, 2, 365-377.
- Greenawalt, J. W. et Schnaitman, C. (1970). An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 46, 173-179.

- Grimaldi, M., Karaca, M., Latini, L., Brioudes, E., Schalch, T. et Maechler, P. (2017). Identification of the molecular dysfunction caused by glutamate dehydrogenase S445L mutation responsible for hyperinsulinism/hyperammonemia. *Hum. Mol. Genet.*, 26, 3453-3465.
- Grunblatt, E., Schlosser, R., Fischer, P., Fischer, M. O., Li, J., Koutsilieri, E., Riederer, P. (2005). Oxidative stress related markers in the "VITA" and the centenarian projects. *Neurobiology of Aging*, *26*, 429-438.
- Guerrero, M., Albet, C., Palomer, A. et Guglietta, A. (2016). Drying in Pharmaceutical and Biotechnological Industries. *Food Science and Technology International*, 9, 237-243.
- Güvenilir, Y. et Deveci, N. (1996). The isolation and purification of diamine oxidase of pea seedlings and pig liver. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *56*, 235-241.
- Halász, A., Ágnes, B., Simon-Sarkadi, L. et Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5, 42-49.
- Halford, B. (2014). C&en. Dans *Cryoprotectant chemicals put the freeze on ice crystalgrowth*. Récupéré de https://cen.acs.org/articles/92/i40/Cryoprotectant-Chemicals-Put-Freeze-Ice.html
- Hames, B. D. (1998). Gel Electrophoresis of Proteins-A Practical Approach 3rd edition. Dans B. D. Hames (dir.), (chap. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, p. 1-5). Oxford University Press Inc., New York
- Handa, A. K., Fatima, T. et Mattoo, A. K. (2018). Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Frontiers in Chemistry*, 6, 1-18.
- Handa, A. K. et Mattoo, A. K. (2010). Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 540-546.

- Hatley, R. (1992). The effective use of differential scanning calorimetry in the optimisation of freeze-drying processes and formulations. *Developments in biological standardization*, 74, 105-122.
- Heljo, V. P., Harju, H., Hatanpaa, T., Yohannes, G. et Juppo, A. M. (2013). The effect of freeze-drying parameters and formulation composition on IgG stability during drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 752-755.
- Heller, M. C., Carpenter, J. F. et Randolph, T. (1999). Conformational stability of lyophilized PEGylated proteins in a phase-separating system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 58-64.
- Hua, T., Liu, B. et Zhang, H. (2010). Fundamentals of Freeze Drying. Dans *Freeze-Drying of Pharmaceutical and Food Products* (p. 18-67).
- Huang, S. H., Sheth, S., Jain, E., Jiang, X., Zustiak, S. P. et Yang, L. (2018). Whispering gallery mode resonator sensor for in situ measurements of hydrogel gelation. *Optics Express*, 26, 51-62.
- Hunter, P. (2010). The psycho gene. *European molecular biology organization (embo)*, 11, 667-669.
- Igarashi, K. et Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, 39-51.
- Izquierdo-Casas, J., Comas-Baste, O., Latorre-Moratalla, M. L., Lorente-Gascon, M., Duelo, A., Soler-Singla, L. et Vidal-Carou, M. C. (2019). Diamine oxidase (DAO) supplement reduces headache in episodic migraine patients with DAO deficiency: A randomized double-blind trial. *Clinical Nutrition*, *38*, 152-158.
- Jain, N. K. et Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein science*, 18, 24-36.

- Jiang, S. et Nail, S. L. (1998). Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45, 249–257.
- Jumarie, C., Séïde, M., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M. A. (2017). Diamine Oxidase from White Pea (Lathyrus sativus) Combined with Catalase Protects the Human Intestinal Caco-2 Cell Line from Histamine Damage. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 182, 1171-1181.
- Jutel, M., Akdis, M. et Akdis, C. A. (2009). Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical & Experimental Allergy*, *39*, 1786-1800.
- Kannan, K. et Jain, S. K. (2004). Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H2O2-treated U937 monocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*, 423-428.
- Kanojia, G., Have, R. T., Bakker, A., Wagner, K., Frijlink, H. W., Kersten, G. F. et Amorij, J. P. (2016). The Production of a Stable Infliximab Powder: The Evaluation of Spray and Freeze-Drying for Production. *PLoS One*, 11, 1-14.
- Karmakar, A., Maitra, S., Chakraborti, B., Verma, D. et Sinha, S. (2016). Monoamine oxidase B gene variants associated with attention deficit hyperactivity disorder in the Indo-Caucasoid population from West Bengal. *BMC Genetics*, *17*, 1-15.
- Kennedy, L., Hodges, K., Meng, F., Alpini, G. et Francis, H. (2012). Histamine and histamine receptor regulation of gastrointestinal cancers. *Translational Gastrointestinal Cancer*, *I*, 215-227.
- Kenten, R. H. et Mann, P. J. (1952). The Oxidation of Amines by Extracts of Pea Seedlings. *Biochemical Journal*, *50*, 360–369.
- Kim, T., Xu, C. et Amsterdam, J. D. (2019). Relative effectiveness of tricyclic antidepressant versus monoamine oxidase inhibitor monotherapy for treatment-resistant depression. *Journal of Affective Disorders*, 250, 199-203.

- Kinemuchi, H., Sunami, Y., Sudo, M., Suh, Y., Arai, C. et Kamijo, K. (1985). Membrane lipid environment of carp brain and liver mitochondrial monoamine oxidase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology*, 80, 245-252.
- Kirschner, K. M., Braun, J. F., Jacobi, C. L., Rudigier, L. J., Persson, A. B. et Scholz, H. (2014). Amine oxidase copper-containing 1 (AOC1) is a downstream target gene of the Wilms tumor protein, WT1, during kidney development. *Journal of biological chemistry*, 289, 24452-24462.
- Kishishita, S. i., Okajima, T., Kim, M., Yamaguchi, H., Hirota, S., Suzuki, S., Mure, M. (2003). Role of Copper Ion in Bacterial Copper Amine Oxidase: Spectroscopic and Crystallographic Studies of Metal-Substituted Enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 1041-1055.
- Kivirand, K. et Rinken, T. (2007). Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, *56*, 164-171.
- Kluetz, M. D., Adamsons, K. et Flynn, J. E. (1980). Optimized preparation and determination of pea seedling diamine oxidase. *Preparative biochemistry*, 10, 615-631.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Kaminsky, A., Valencia, M., Lee, L., Hermenegildo, C. et Felipo, V. (1997). Superoxide Production and Antioxidant Enzymes in Ammonia Intoxication in Rats. *Free Radical Research*, *27*, 637-644.
- Kovacova-Hanuskova, E., Buday, T., Gavliakova, S. et Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*, *43*, 498-506.
- Kriegner, D., Matej, Z., Kuzel, R. et Holy, V. (2015). Powder diffraction in Bragg-Brentano geometry with straight linear detectors. *Journal of Applied Crystallography*, 48, 613-618.

- Kumar, V., Freeman, D., Mitchell, G., Harvey, I., McGuirl, M. A., Wilce, M. C. et Zubak, V. M. (1996). Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) coppercontaining amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure*, *15*, 943-955.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C. et Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta An International Journal of Plant Biology*, 228, 367–381.
- Kwon, H. J., Jin, H. J. et Lim, M. H. (2014). Association between monoamine oxidase gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder in Korean children. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 18, 505-509.
- Ladero, V., Calles, M., Fernández, M. et Alvarez, M. A. (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 145-156.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Langford, A., Bhatnagar, B., Walters, R., Tchessalov, S. et Ohtake, S. (2017). Drying technologies for biopharmaceutical applications: Recent developments and future direction. *Drying Technology*, *36*, 677-684.
- Le, T. C., Mateescu, M. A., Ahmadifar, S., Marcocci, L. et Pietrangeli, P. (2018). Zymographic Determination of Intrinsic Specific Activity of Oxidases in the Presence of Interfering Proteins. Dans B. T. Kurien et R. H. Scofield (dir.), *Protein Gel Detection and Imaging. Methods and Protocols* (207-221). Humana Press, New York, NY.
- Lee, M. K., Kim, M. Y., Kim, S. et Lee, J. (2009). Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: effect of freezing rate. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98, 4808-4817.
- Leitner, R., Zoernpfenning, E. et Missbichler, A. (2014). Evaluation of the inhibitory effect of various drugs / active ingredients on the activity of human diamine oxidase in vitro. *Clinical and Translational Allergy*, 4.

- Leurs, R., Hough, L. B., Blandina, P. et Haas, H. L. (2012). Histamine. Dans *Basic Neurochemistry* (chap. 16, p. 323-341).
- Li, B., Wu, Y., Zhang, W., Zhang, S., Shao, N., Zhang, W. et Liu, R. (2019). Efficient synthesis of amino acid polymers for protein stabilization. *Biomaterials Science*, 7, 3675-3682.
- Li, R., Klinman, J. P. et Mathews, F. S. (1998). Copper amine oxidase from Hansenula polymorpha: the crystal structure determined at 2.4 Å resolution reveals the active conformation. *Structure*, 6, 293–307.
- Liang, X. H., Zhao, Z. A., Deng, W. B., Tian, Z., Lei, W., Xu, X. et Yang, Z. M. (2010). Estrogen regulates amiloride-binding protein 1 through CCAAT/enhancer-binding protein-beta in mouse uterus during embryo implantation and decidualization. *Endocrinology*, *151*, 5007-5016.
- Liao, Y. H., Brown, M. B. et Martin, G. P. (2004). Investigation of the stabilisation of freeze-dried lysozyme and the physical properties of the formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 15-24.
- Lim, J. Y., Kim, N. A., Lim, D. G., Kim, K. H., Choi, D. H. et Jeong, S. H. (2016). Process cycle development of freeze drying for therapeutic proteins with stability evaluation. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 46, 519-536.
- Luhova, L., Lebeda, A., Hedererova, D. et Pec, P. (2003). Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of Pisum sativum L. under different light conditions. *Plant, Soil and Environment* 49, 151-157.
- Luo, Y., Weibman, D., Halperin, J. M. et Li, X. (2019). A Review of Heterogeneity in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Frontiers in Human Neuroscience*, 13, 1-12.
- Mackie, I. M. et Fernandez-Salgdro, J. (1977). Histidine metabolism in fish. Urocanic acid in mackerel (Scomber scombrus). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10, 935-940.

- Mahfouz, M. M., Zhou, S. Q. et Kummerow, F. A. (2009). Vitamin B6 compounds are capable of reducing the superoxide radical and lipid peroxide levels induced by H2O2 in vascular endothelial cells in culture. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79, 218-229.
- Maintz, L. et Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 185-196.
- Maintz, L., Schwarzer, V., Bieber, T., van der Ven, K. et Novak, N. (2008). Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review. *Human Reproduction Update*, 14, 485-495.
- Maintz, L., Yu, C. F., Rodriguez, E., Baurecht, H., Bieber, T., Illig, T. et Novak, N. (2011). Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities. *Allergy*, *66*, 893-902.
- Maltesen, M. J. et van de Weert, M. (2008). Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*, 5, e81-88.
- Mann, P. J. G. (1955). purification and Properties of the Amine Oxidase of Pea Seedlings. *Biochemical Journal*, *59*, 609-620.
- Manzotti, G., Breda, D., Di Gioacchino, M. et Burastero, S. E. (2016). Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29, 105-111.
- Martins, S. I., Jongen, W. M. et Boekel, M. A. (2001). A review of Maillard reaction infood and implicaations to kinetic mode lling. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 364–373.
- Masini, E., Bani, D., Marzocca, C., Mateescu, M. A., Mannaioni, P. F., Federico, R. et Mondovi, B. (2007). Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. A plant histaminase in allergic asthma and ischemic shock. *Scientific World Journal*, 7, 888-902.

- McCuirl, M. A., McCahon, C. D., McKeown, K. A. et Dooley, D. M. (1994). Purification and Characterization of Pea Seedling Amine Oxidase for Crystallization Studies. *plant Physiology*, *106*, 1205-1211.
- McDermotta, R., Tingleyb, D., Cowdenc, J., Frazzettod, G. et Johnsone, D. (2009). Monoamine oxidase A gene (MAOA) predicts behavioral aggression following provocation. *The National Academy of Sciences of the USA*, 106, 2118–2123.
- McGrath, A. P., Hilmer, K. M., Collyer, C. A., Shepard, E. M., Elmore, B. O., Brown, D. E. et Guss, J. M. (2009). Structure and inhibition of human diamine oxidase. *Biochemistry*, 48, 9810-9822.
- Medda, R., Padiglia, A. et Floris, G. (1995). Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 39, 1-9.
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K. et Hinrichs, W. L. (2017). How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114, 288-295.
- Messerschmidt, A. (2010). Copper Metalloenzymes. Dans *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology* (chap. 8, p. 489-545). Elsevier.
- Meyer, J., Ginovart, N., Boovariwala, A., Sagrati, S., Hussey, D., Garcia, A. et Houle, S. (2006). Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Archives of General Psychiatry*, 63, 1209-12016.
- Missbichler, A., Mayer, I., Pongracz, C. et Gabor, F. (2010). Supplementation of enteric coated diamine oxidase improves intestinal degradation of food-borne biogenic amines in case of histamine intolerance. *Clinical Nutrition Supplements*, 5, 11.

- Molina-Hernandez, A. et Velasco, I. (2008). Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 106, 706-717.
- Mondovi, B., Fogel, W. A., Federico, R., Calinescu, C., Mateescu, M. A., Rosa, A. C. et Masin, E. (2013). Effects of Amine Oxidases in Allergic and Histamine-Mediated Conditions *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 7, 20-34.
- Morais, A. R., Alencar Edo, N., Xavier Junior, F. H., de Oliveira, C. M., Marcelino, H. R., Barratt, G. et Elaissari, A. (2016). Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, *503*, 102-114.
- Morel, F., Surla, A. et Vignais, P. V. (1992). Purification of human placenta diamine oxidase. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 187, 178-186.
- Moss, G. P. (1992). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB).
- Murase, N. et Franks, F. (1989). Salt precipitation during the freeze-concentration of phosphate buffer solutions. *Biophysical Chemistry*, *34*, 293-300.
- Mure, M., Mills, S. A. et Klinman, J. P. (2002). Catalytic Mechanism of the Topa Quinone Containing Copper Amine Oxidases. *Journal of Biochemistry*, 41, 9269-9278.
- Murphy, D. L., Belmaker, R. et Wyatt, R. J. (1974). Monoamine oxidase in schizophrenia and other behavioral disorders. *Journal of Psychiatric Research*, 11, 221-247.
- Neptune. (2016). La dépression dopamino-dépendante (DDD): un tabou pharmacologique. Récupéré de https://www.forumpsy.net/t1178-depression-dopamino-dependante-et-l-tyrosine
- Nguyen, D. G. (2014). Étude comparative experimentale des operations d'atomisation et d'autovaporisation : application a la gomme arabique et au soja (thèse de

- doctorat). L'université de la rochelle. Récupéré de https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01174999.
- Niederhoffer, N., Etienne-Selloum, N. et Faure, S. (2016). Les différentes familles d'antidépresseurs. *Actualités Pharmaceutiques*, 55, 1-10.
- O'Sullivan, J. (2004). Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidases: Enzymes with Quite a Lot to Do. *NeuroToxicology*, *25*, 303-315.
- Obzansky, D. M., Rabin, B. R., Simons, D. M., Tseng, S. Y., Severino, D. M. et Eggelte, H. (1991). Sensitive, Colorimetric Enzyme AmplificationCascade for Determination of Alkaline Phosphatase and Application of the Method to an Immunoassay of Thyrotropin. *Clinical Chemistry*, *37*, 1513-1518.
- Ordóñez, A., Ibáñez, F., Torre, P. et Barcina, Y. (1997). Formation of Biogenic Amines in Idiazabal Ewe's-Milk Cheese: Effect of Ripening, Pasteurization, and Starter. *Journal of Food Protection*, 60, 1371-1375.
- Özogul, Y. et Özogul, F. (2019). Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food. Dans *Biogenic Amines in Food* (chap. 1, p. 1-17).
- Passani, M. B., Giannoni, P., Bucherelli, C., Baldi, E. et Blandina, P. (2007). Histamine in the brain: beyond sleep and memory. *Biochemical Pharmacology*, 73, 1113-1122.
- Pegg, A. E. (1998). Polyamine Metabolism and Its Importance in Neoplastic Growth and as a Target for Chemotherapy. *Cancer Research*, 48, 759-774.
- Pepsia. (2013). Qu'est ce que la maladie de Crohn. Dans *les maladies*. Récupéré de http://www.maladiede.com/quest-ce-que-la-maladie-de-crohn
- Pfundstein, B., Tricker, A., Theobald, E., Spiegelhalder, B. et Preussmann, R. (1991). Mean daily intake of primary and secondary amines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. *Food and Chemical Toxicology*, 11, 733-739.
- Pieters, S., De Beer, T., Kasper, J. C., Boulpaep, D., Waszkiewicz, O., Goodarzi, M. et Vander Heyden, Y. (2012). Near-infrared spectroscopy for in-line monitoring

- of protein unfolding and its interactions with lyoprotectants during freezedrying. *Analytical Chemistry*, 84, 947-955.
- Pietrangeli, P., Federico, R., Mondovi, B. et Morpurgo, L. (2007). Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*., 101, 997-1004.
- Pietrangeli, P., Nocera, S., Federico, R., Mondovi, B. et Morpurgo, L. (2004). Inactivation of copper-containing amine oxidases by turnover products. *European Journal of Biochemistry*, 271, 146-152.
- Pikal, M. J. (1990). The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *International Journal of Pharmaceutics*, *3*, 26-30.
- Polge, C., Smith, A. U. et Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, *164*, 666.
- Premont, R. T., Gainetdinov, R. R. et Caron, M. G. (2001). Following the trace of elusive amines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 9474–9475.
- Raithel, M., Küfner, M., Ulrich, P. et Hahn, E. G. (1999). The involvement of the histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal allergies. *Inflammation Research Journal*, 48, 75-76.
- Rangachari, P. K. (1992). Histamine: mercurial messenger in the gut. *American Physiological Society*, 1-13.
- Rice, S. L. et Koehler, P. E. (1976). Tyrosine and Histidine Decarboxylase Activities of Pediococcus cerevisiae and Lactobacillus Species and the Production of Tyramine in Fermented Sausages. *Journal of Milk and Food Technology*, 39, 166-169.

- Riederer, P. et Laux, G. (2011). MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Experimental Neurology*, 20, 1-17.
- Righetti, P. G., Stoyanov, A. V. et Zhukov, M. Y. (2001). Chapter 13 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Dans *The Proteome Revisited Theory and Practice of all Relevant Electrophoretic Steps* (vol. 63, p. 217-274). Elsevier.
- Rossi, A., Petruzzelli, R. et FinazziAgrò, A. (1992). cDNA-derived amino-acid sequence of lentil seedlings' amine oxidase. *FEBS Letters*, *301*, 253-257.
- Roy, I. et Gupta, M. N. (2004). Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *39*, 165–177.
- Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.
- Scadden, A. D. et Naaby-Hansen, S. (2001). Analysis of Ribonucleases following Gel Electrophoresis. Dans *Methods Enzymology*. (vol. 341, p. 126-141). Elsevier.
- Schirone, M., Tofalo, R., Mazzone, G., Corsetti, A. et Suzzi, G. (2011). Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. *Journal of Food Microbiology*, 28, 128-136.
- Schmid, W., Sattler, J., Hesterberg, R., Röher, H., Zoedler, T., Sitter, H. et Lorenz, W. (1990). Human intestinal diamine oxidase (DAO) activity in Crohn's disease: a new marker for disease assessment? *Agents and Actions*, *30*, 267-270.
- Schnedl, W. J., Schenk, M., Lackner, S., Enko, D., Mangge, H. et Forster, F. (2019). Diamine oxidase supplementation improves symptoms in patients with histamine intolerance. *Food Science and Biotechnology*, 28, 1779–1784.
- Schwartz, J. C. (1975). Histamine as a transmitter in brain. *Life Sciences*, 17, 503-517.

- Schwelberger. (2007). The origin of mammalian plasma amine oxidases. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 114, 757-762.
- Schwelberger et Bodner, E. (1998). Identity of the diamine oxidase proteins in porcine kidney and intestine. *Inflammation Research*, 47, 58-59.
- Scrutton, N. S. (2004). Chemical aspects of amine oxidation by flavoprotein enzymes. *Natural Product Reports*, *21*, 722-730.
- Šebela, M., Luhová, L., Frébort, I., Hirota, S., Faulhammer, H. G., Stužka, V. et Peč, P. (1997). Confirmation of the presence of a Cu(II)/topa quinone active site in the amine oxidase from fenugreek seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1897–1907.
- Singh, V. P., Poon, J. F. et Engman, L. (2013). Turning pyridoxine into a catalytic chain-breaking and hydroperoxide-decomposing antioxidant. *Journal of Organic Chemistry*, 78, 1478-1487.
- Slade, L. et Levine, H. (1991). Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30, 115-360.
- Smith, T. (1985). The di- and poly-amine oxidases of higher plants. *Biochemical Society Transactions*, 13, 319-322.
- Smolinska, S., Jutel, M., Crameri, R. et O'Mahony, L. (2014). Histamine and gut mucosal immune regulation. *European Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 69, 273-281.
- Sola-Penna, M., Ferreira-Pereira, A., Lemos, A. P. et Meyer-Ferwandes, J. R. (1997). Carbohydrate protection of enzyme structure and function against guanidinium chloride treatment depends on the nature of carbohydrate and enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 248, 24-29.

- Sosnik, A. et Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40-54.
- Stoner, P. (1985). An improved spectrophotometric assay for histamine and diamine oxidase (DAO) activity. *Agents and Actions*, 17, 5-9.
- Strambini, G. B. et Gabellieri, E. (1996). Proteins in Frozen Solutions: Evidence of Ice-induced Partial Unfolding. *Biophysical Journal*, 70, 971-976.
- Sussich, F., Skopec, C., Brady, J. et Cesa`roa, A. (2001). Reversible dehydration of trehalose and anhydrobiosis: from solution state to an exotic crystal? *Carbohydrate Research*, *334*, 165–176.
- Tang, X. et Pikal, M. J. (2004). Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research*, 21, 191-200.
- Tavladoraki, P., Cona, A. et Angelini, R. (2016). Copper-Containing Amine Oxidases and FAD-Dependent Polyamine Oxidases Are Key Players in Plant Tissue Differentiation and Organ Development. *Front Plant Sci*, 7, 1-11.
- Taylor, S. L., Stratton, J. E. et Nordlee, J. A. (1989). Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 27, 225-240.
- Thomas, T. (2000). Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *21*, 343-348.
- Tipton, K. F. (1986). Enzymology of Monoamine Oxidase. *Cell Biochemistry and Function*, 4, 79-87.
- Tisi, A., Angelini, R. et Conacorresponding, A. (2008). Wound healing in plants, Cooperation of copper amine oxidase and flavin-containing polyamine oxidase. *plant signaling and behavior*, *3*, 204-206.

- Tobias, K. E. et Kahana, C. (1995). Exposure to Ornithine Results in Excessive Accumulation of Putrescine and Apoptotic Cell Death in Ornithine Decarboxylase Overproducing Mouse Myeloma Cells. *Cell Growth & Differentiation*, 6, 1279-1285.
- Tompa, K., Bokor, M., Verebélyi, T. et Tompa, P. (2015). Water rotation barriers on protein molecular surfaces. *Chemical Physics*, 448, 15-25.
- Tonnis, W. F., Mensink, M. A., Jager, A., Frijlink, H. W. et Hinrichs, W. L. (2015). Size and molecular flexibility of sugars determine the storage stability of freeze-dried proteins. *Molecular Pharmaceutics*, 12, 684-694.
- Valen, G., Kaszaki, J., Szabo, I. et Vaage, S. N. (1996). Activity of histamine metabolizing and catabolizing enzymes during reperfusion of isolated, globally ischemic rat hearts. *Inflammation Research Journal*, 45, 145-149.
- Vianello, F., Di Paolo, M. L., Stevanato, R., Gasparini, R. et Rigo, A. (1993). Purification and characterization of amine oxidase from soybean seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 30, 35-39.
- Vianello, F., Malek-Mirzayans, A., Di Paolo, M. L., Stevanato, R. et Rigo, A. (1999). Purification and Characterization of Amine Oxidase from Pea Seedlings. *Protein Expression and Purification*, 15, 196–201.
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics 203*, 1-60.
- Wang, Y., Zheng, Q., Li, W., Ma, Y., Zhao, X. et Zhang, C. (2018). Measurement of free water in foods by secondary derivative thermogravimetry. *CyTA Journal of Food*, *16*, 438-443.
- White, M. (1990). The role of histamine in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86, 599-605.

- Wimalasekera, R., Villar, C., Begum, T. et Scherer, G. F. (2011). Copper amine oxidase1 (cuao1) of arabidopsis thaliana contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Molecular plant*, 4, 663-678.
- Yacoub, M. R., Ramirez, G. A., Berti, A., Mercurio, G., Breda, D., Saporiti, N., Colombo, G. (2018). Diamine Oxidase Supplementation in Chronic Spontaneous Urticaria: A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Study. *International Archives of Allergy and Immunology*, 176, 268-271.
- Yamada, H. et Yasunobu, K. T. (1962). Monoamine oxidase. I. Purification, crystallization, and properties of plasma monoamine oxidase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 23, 1511-1516.
- Zeng, J. et Spiro, S. (2013). Finely tuned regulation of the aromatic amine degradation pathway in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 195, 5141-5150.
- Zhang, L., Liu, L., Qian, Y. et Chen, Y. (2008). The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 750-759.
- Zhang, M., Oldenhof, H., Sydykov, B., Bigalk, J., Sieme, H. et Wolkers, W. F. (2017). Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: preservation of DNA integrity. *Scientific Reports*, 7, 1-10.
- Zhou, P., Guo, M., Liu, D., Liu, X. et Labuza, T. P. (2013). Maillard-reaction-induced modification and aggregation of proteins and hardening of texture in protein bar model systems. *Journal of Food Science*, 78, 437-444.