

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA DIAMINE OXYDASE COMME ENZYME THÉRAPEUTIQUE : ÉTUDE DE GERMINATION À PARTIR DE DIVERSES SOURCES VÉGÉTALES, DE PRÉSENCE OU L'ABSENCE DE L'ACIDE β -N-OXALYL-L- α , β -DIAMINOPROPIONIQUE (β -ODAP) ET PROPRIÉTÉS CATALYTIQUES.

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

RYM BOULFEKHAR

AVRIL 2023

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.04-2020). 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

Ce mémoire est le fruit d'une recherche qui a duré près de deux ans. En guise de reconnaissance, je tiens à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide précieuse et l'encadrement de mon directeur de recherche, le Professeur Mircea Alexandru Mateescu. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour sa patience, ses conseils pertinents et son soutien inconditionnel tout au long de ma maîtrise. Il restera à jamais mon modèle de compétence, de bonté et de dévouement.

Je tiens à témoigner mes sincères gratitude envers la Dre Pompilia Ispas-Szabo pour sa gentillesse, sa généreuse disponibilité et ses précieux conseils et orientations.

Je souhaite remercier chaleureusement la Professeure Lekha Sleno, et sa collaboratrice Leanne Ohlund pour leur grande contribution dans l'aboutissement de ce travail.

Je remercie très profondément les membres du comité d'évaluation, Pr Steve Bourgault et Pr Borhane Annabi pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Je suis également reconnaissante à mes collègues et mon équipe de laboratoire avec qui j'ai partagé de bons moments de joie et de bonne humeur, cette aventure ne serait pas aussi enrichissante sans votre collaboration et votre soutien. Un grand merci à Paul et Armelle, qui m'ont beaucoup aidé avec leurs conseils et leur expérience à mes débuts. Merci à mes amis et mes collègues Marc-André, Meriem, Salma, Mariela, Aly et Rimaz.

Un chaleureux remerciement à la Fondation Courtois pour l'appui financier qui a permis la progression de ce projet jusqu'à maintenant.

Mes remerciements s'étendent également à tous les enseignants que j'ai eus dans mes cours de mon programme de biochimie ainsi qu'à tous les responsables et personnels de l'Université du Québec à Montréal.

Je tiens à remercier mes très chers parents et mes beaux-parents qui ont été toujours à mes côtés pour m'encourager et me soutenir malgré la distance, un grand merci également à mes frères Adel et Youcef ma très chère sœur Meriem et mon neveu Rayan qui me soutiennent et me poussent à aller de l'avant.

J'aimerais remercier également mon très cher époux et mon partenaire de vie que je considère comme modèle de patience et de ténacité, son soutien moral et sa constante présence m'ont beaucoup aidé dans mon parcours universitaire.

DÉDICACE

À ma très chère mère :

Quoique je fasse, quoique je dise je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence a toujours été une source de force qui me permet d'avancer et d'affronter les obstacles.

À mon très cher père :

Tu as été toujours le père exemplaire qui m'a doté d'une éducation digne, tu as été toujours à mes côtés pour m'encourager et me motiver. Sans ton soutien je ne serai certainement pas là où je suis aujourd'hui.

À mes grands-parents :

Vous resterez à jamais dans mon cœur et dans mes prières.

À toute ma famille, mes amis et voisins ici au Canada et en Algérie.

À vous cher lecteur.

TABLE DE MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE.....	iv
TABLE DE MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION.....	1
1.1 Quelques généralités sur l’histamine.....	1
1.1.1 Définition de l’histamine et son implication dans les processus physiologiques	1
1.1.2 Implication de l’histamine dans la réponse immunitaire et inflammatoire	7
1.1.3 Rôle de l’histamine dans le tractus gastro-intestinal (GI).....	7
1.1.4 Métabolisme de l’histamine	9
1.1.5 Sources d’histamine et les dysfonctions liées à l’intolérance à l’histamine.....	11
1.1.6 Approches thérapeutiques des dysfonctions générées par l’histamine.....	13
1.2 Amines oxydases et leurs rôles physiologiques.....	15
1.2.1 Classification des amines oxydases	15
1.2.2 Amine oxydase à cuivre (Cu-AO).....	16
1.2.3 Diamine oxydase (DAO).....	18
1.2.4 Diamine oxydase végétale (DAOv)	20
1.2.5 Aspects préparatifs et paramètres de germination liés à l’activité enzymatique de la DAOv	22
1.3 Métabolites de type acide-oxalyl-diaminopropionique et leurs déterminations par chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse dans certaines sources végétales	23
1.3.1 β -ODAP dans certaines légumineuses et ses potentiels effets neurotoxiques	23
1.3.2 Détection et quantification de β -ODAP par UHPLC-MS/MS dans des légumineuses... ..	27
CHAPITRE 2 - PRÉSENTATION DU PROJET	29
CHAPITRE 3 - ARTICLE SCIENTIFIQUE	33
3.1 Résumé	35
3.2 Abstract.....	36
3.3 Introduction.....	37

3.4 Results.....	39
3.4.1 vDAO Activity in different seed varieties.....	39
3.4.2 vDAO activity during germination of CDC Amarillo seedlings.....	40
3.4.3 vDAO activity in seedlings organs.....	41
3.5 LC-MRM method development and β -ODAP in seedling extracts.....	41
3.5.1 β -ODAP content quantitation in DAO extracts	43
3.6 Discussion.....	46
3.7 Materials and Methods	48
3.7.1 Materials.....	48
3.7.2 Germination of seeds.....	49
3.7.3 vDAO extraction	49
3.7.4 Spectrometric assay of vDAO activity.....	49
3.7.5 Dialysis of raw extracts	50
3.7.6 Protein content	50
3.7.7 Preparation of standards.....	50
3.7.8 Sample preparation for β -ODAP analysis.....	50
3.7.9 LC-MRM analysis.....	51
3.7.10 Data analysis	51
3.8 Conclusions.....	52
CHAPITRE 4 - DISCUSSION GÉNÉRALE	53
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	58
ANNEXE A Effets des nutriments sur le pouvoir germinatif et sur l'activité enzymatique de la DAO chez CDC Amarillo	59
ANNEXE B Photos de germination des différents cultivars de <i>Pisum sativum</i> et de <i>Lathyrus sativus</i>	62
BIBLIOGRAPHIE	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Biosynthèse de l’histamine	2
Figure 1.2 Rôles physiologiques principaux de l’histamine	3
Figure 1.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans les réponses allergiques et inflammatoires. .	8
Figure 1.4 Divers mécanismes paracrines, hormonaux, neuroendocrines impliqués dans la régulation et la sécrétion de l’acide gastrique	9
Figure 1.5 Synthèse et voies de métabolisme de l’histamine	10
Figure 1.6 Les symptômes reliés à l’histamine	13
Figure 1.7 Structure cristalline de CuAO homodimérique à partir d’ <i>Escherichia coli</i> obtenue par les techniques cristallographiques aux rayons-X.	17
Figure 1.8 Fonction de la DAO dans les entérocytes.	20
Figure 1.9 Valeur nutritive de <i>Lathyrus sativus</i>	25
Figure 1.10 Structure de β -ODAP, de L-glutamate et de α -ODAP.....	26
Figure 1.11 Chromatogramme des deux pics α -ODAP et β -ODAP à partir de MRM.....	28
Figure 2.1 Présentation schématique générale des différentes étapes du projet de maîtrise.....	30
Figure 2.2 Conditions de germination et processus d’extraction de la DAOv à partir des cultivars de <i>P. sativum</i> et de <i>L. sativus</i>	31
Figure 2.3 Dosage de l’activité enzymatique et la concentration protéique dans l’extrait de la DAOv.	32
Figure 2.4 Préparation des extraits bruts de DAO avant de les injecter dans le spectromètre de masse (QTRAP).	32
Figure 3.1 LC-MRM chromatograms of β -ODAP	42
Figure 3.2 β -ODAP calibration curve.....	43
Figure 3.3 Representative LC-MRM chromatograms of β -ODAP	44
Figure A.1 Effet de l’urée (A) et de CuCl_2 (B) sur l’activité enzymatique de la DAO dans CDC Amarillo.	59
Figure A.2 Comparaison de l’effet des nutriments avec l’eau comme témoin sur le pouvoirgerminatif des pousses de CDC Amarillo.....	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Caractérisations des récepteurs d'histamine (HR).....	6
Tableau 1.2 Activité spécifique de la DAO (U/mg protéine) dans les organes de Fava Bean.....	23
Tableau 3.1 DAO activity in seedlings extracts of pea and grass pea.....	40
Tableau 3.2 Effect of germination time on DAO activity in CDC Amarillo seedlings.	40
Tableau 3.3 vDAO activity in different organs of pea variety CDC Amarillo after 5 days of germination.....	41
Tableau 3.4 β -ODAP concentrations found in <i>L. sativus</i> , CDC Amarillo and Yellow pea crude extracts, before and after dialysis.....	45
Tableau A.1 Tableau comparatif de l'activité enzymatique (U/mL) et activité spécifique de la DAO(U/mg protéine) des pousses de CDC Amarillo	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAP	4-Aminoantipyrine
ACN	Acetonitrile
AO	Amine Oxydase
BSA	Albumine de Sérum Bovin
β -ODAP	β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionique
CDC	<i>Crop Development Centre</i>
Cu-AO	Amine Oxydase à Cuivre
DAO	Diamine Oxydase
vDAO	Diamine Oxydase Végétale
DCHBS	Acide 3,5-Dichloro-2-Hydroxybenzenesulfonique
ECI	<i>Enzyme Commission of IUBMB</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAD-AO	Amine Oxydase à Flavine Adénine Dinucléotide
FA	<i>Formic Acid</i>
Gly-Asp	Glycyl-Aspartate

H	Récepteur Histaminique
HDC	Histidine Decarboxylase
HIT	<i>Histamine Intolerance</i>
HNMT	Histamine N-Méthyltransférase
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
IS	<i>Standard Internal</i>
LC/MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
<i>L. sativus</i>	<i>Lathyrus sativus</i>
MAO	Monoamine Oxydase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MAX	<i>Mixed-Mode Anion-Exchange</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
OVA	Ovalbumine
<i>P. sativum</i>	<i>Pisum sativum</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>

RÉSUMÉ

Grâce aux avancées récentes mettant en évidence l'efficacité de la diamine oxydase végétale (DAOv) dans l'atténuation des effets néfastes causés par l'excès d'histamine, notamment les dysfonctionnements entériques, la DAOv est désormais considérée comme molécule biopharmaceutique prometteuse. Différente des thérapies existantes telles que les antihistaminiques et la DAO d'origine animale, une formulation à base de DAOv en comprimé monolithique pourrait représenter une alternative sûre et non toxique pouvant complètement remplacer ou agir en complément avec les autres traitements existants. Plus particulièrement, la DAOv possède une meilleure réactivité avec l'histamine et les diamines aliphatiques ainsi qu'une activité spécifique enzymatique plus élevée que celle d'origine animale. La DAOv est retrouvée en grande quantité dans certaines pousses de légumineuses en particulier : *Lathyrus sativus* (*L. sativus*) et *Pisum sativum* (*P. sativum*). Un aspect qui peut être problématique dans ce projet est que l'extrait de la DAO à partir de *L. sativus* contient une neurotoxine appelée β -N-oxalyl-L- α,β -diaminopropionique (β -ODAP). Cette dernière pourrait être à l'origine de graves maladies neurologiques notamment le neuropathisme. Tenant compte de ce fait, ce projet visait à explorer l'activité de la DAO dans différents cultivars de *P. sativum* développés au Canada et dans *L. sativus* tout en prenant en considération l'éventuelle présence de β -ODAP dans l'extrait de DAOv. Pour ce faire, la technique HPLC-MS (chromatographie liquide-spectrométrie de masse) a été utilisée afin de détecter et de quantifier le contenu en neurotoxine dans les extraits de DAOv. Le premier objectif de cette étude était d'établir les conditions de germination favorisant le bon développement des pousses de *L. sativus* et des cultivars de *P. sativum* pour obtenir le maximum d'activité de DAO possible. Une hypothèse a été émise dans ce volet du projet, qui était la possibilité de stimuler davantage l'activité de la DAOv lors de la germination avec des solutions d'arrosage contenant des nutriments (CuCl_2 et Urée). Les résultats obtenus ont montré que l'activité enzymatique de la DAO est plus élevée dans *L. sativus* et dans CDC Amarillo le cultivar de *P. sativum*. De plus, la quantification de β -ODAP dans l'extrait brut de ces deux variétés a montré que la teneur de cette neurotoxine est en dessous du seuil de toxicité. En revanche, les résultats d'arrosage avec les nutriments n'ont pas été concluants. Ce projet a permis de considérer *L. sativus* et *P. sativum* comme deux sources de DAOv et qui sont sans danger pour l'homme lorsqu'elles sont administrées comme des formulations orales pour traiter l'histaminose alimentaire et prévenir les dysfonctionnements entériques liés à l'histamine.

Mots clés : Diamine oxydase végétale, Histaminose, Histamine, *L. sativus*, *P. sativum*, β -ODAP, LC-MS.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Quelques généralités sur l’histamine

1.1.1 Définition de l’histamine et son implication dans les processus physiologiques

L’histamine est une amine biogène naturelle comme la putrescine, la cadavérine et la tyramine, entre autres, produites par fermentation bactérienne (Doeun *et al.*, 2017).

Elle a été découverte en 1910 par Dale et Laidlaw comme substance capable de produire une contraction des muscles lisses dans des préparations d’iléon isolé de cobaye (Dale et Laidlaw, 1910).

Plus tard, en 1924, Lewis et Grant ont démontré que cette substance, nommée la substance H, pouvait être libérée par la peau par des interactions antigène-anticorps et que cette substance était de l’aminoéthylimidazole (également connue sous le nom de 2-[4-imidazolyl] -éthylamine) (Demoly *et al.*, 1997).

En 1932, l’histamine a été identifiée comme médiateur des réactions anaphylactiques (Steinhoff *et al.*, 2004) qui s’est depuis avérée être le médiateur de nombreux processus biologiques, à la fois physiologiques et pathologiques, dont certains sont liés à la rhinite allergique.

L’histamine endogène est synthétisée par la décarboxylation de l’acide aminé histidine par L-histidine décarboxylase (HDC) (EC 4.1.1.22) une enzyme dépendante du pyridoxal 5'-phosphate (Figure 1.1).

Cette synthèse a lieu dans l’appareil de Golgi des cellules telles que les mastocytes (Leoutsakos et Pearce, 1986), les plaquettes (Masini *et al.*, 1994), les cellules entérochromaffines (Andersson *et al.*, 1998) et les neurones histaminergiques (Takahashi *et al.*, 2006).

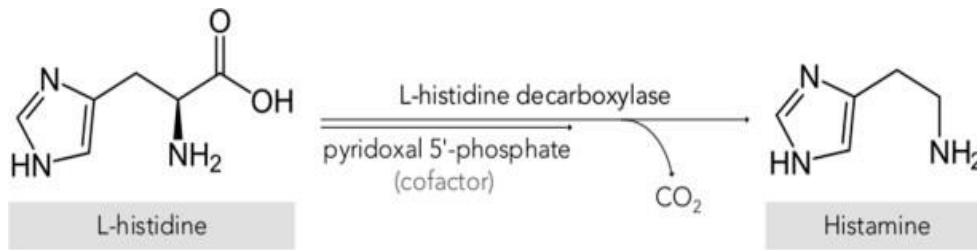


Figure 1.1 Biosynthèse de l’histamine. L’histidine est décarboxylée en histamine par l’intermédiaire d’histidine décarboxylase couplée au pyridoxal phosphate (PLP) comme cofacteur. D’après (Comas-Basté et al., 2020).

Une fois synthétisée, l’histamine est stockée dans des vésicules intracellulaires et libérée lors de la stimulation (Maintz et Novak, 2007). Elle est largement détectée dans les tissus périphériques et centraux, notamment le derme, l’intestin grêle, l’estomac, les poumons et le cerveau (Jones et Kearns, 2011). Elle est également abondante dans tout le tractus gastro-intestinal (GI), où elle est principalement située dans les mastocytes de la muqueuse intestinale. De plus, une certaine quantité d’histamine se trouve dans les cellules entérochromaffine-like de l’estomac et dans les neurones (Figure 1.2).

L’histamine est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques, notamment la prolifération et la différenciation cellulaire, l’hématopoïèse, la régénération et la régulation des systèmes immunitaires innés et adaptatifs (Smolinska *et al.*, 2014). Elle exerce ses actions biologiques en se liant à l’un des 4 sous-types du Récepteur H de l’histamine qui sont nommés chronologiquement dans l’ordre de leur découverte : H1-H4 (Fabisiak *et al.*, 2017). Tous ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils sont des molécules transmembranaires hepta-hélicales qui transduisent le signal extracellulaire en utilisant la protéine G et les systèmes de seconds messagers intracellulaires (Oda *et al.*, 2000) (Gantz *et al.*, 1991) (Nakamura *et al.*, 2000). Dans le cas normal, les états actifs et inactifs des récepteurs de l’histamine (H) sont en équilibre. Cependant, il a été démontré dans la recombinaison des systèmes que les H peuvent déclencher des événements en aval dans l’absence d’occupation du récepteur par un agoniste, ce qui explique l’activité constitutive des récepteurs spontanés (Milligan *et al.*, 1995). Chaque récepteur a une affinité de liaison différente (Kd); les valeurs de Kd pour les récepteurs H1 et H2 vont de 2 à 10 $\mu\text{mol/L}$, tandis que celles des récepteurs H3 et H4 vont de 5 à 10 nmol/L (Akdis et Simons, 2006).

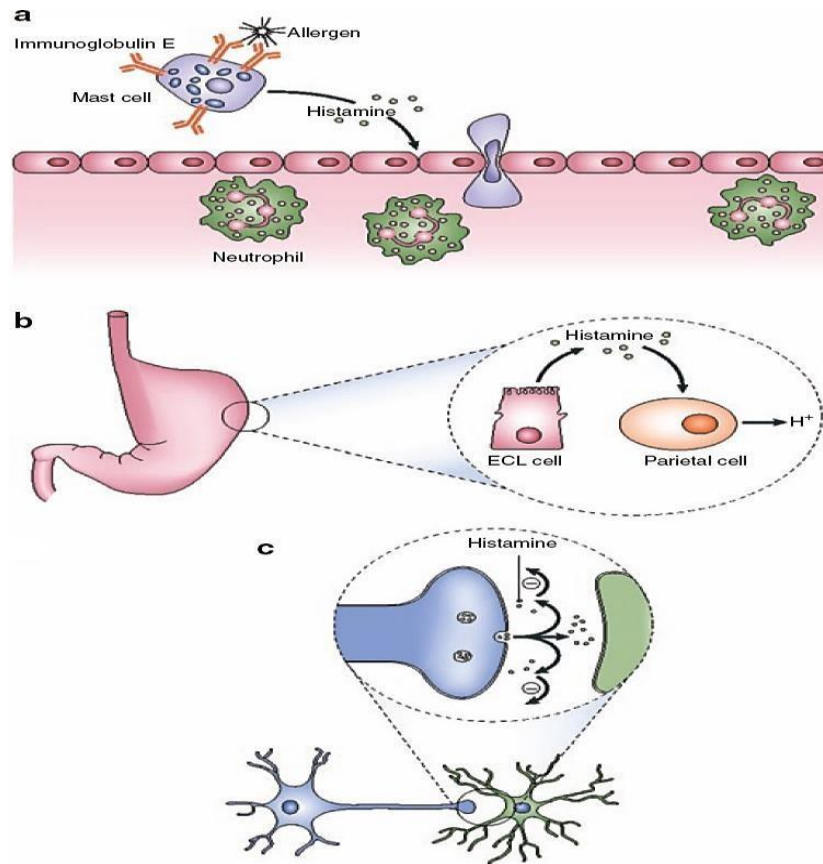


Figure 1.2 Rôles physiologiques principaux de l’histamine. (a) Médiateur de l'inflammation ; (b) médiateur de la sécrétion d'acide gastrique; et (c) médiateur dans les neurones histaminergiques. D’après (Thurmond *et al.*, 2008).

Les récepteurs de l’histamine sont largement distribués sur divers types de cellules et l'expression de l'histamine varie selon sur le type de récepteur impliqué (MacGlashan, 2003) (Jutel *et al.*, 2005) (Lippert *et al.*, 2004). À travers les quatre types de récepteurs H, l'histamine arrive à exercer ses fonctions notamment en régulant la dilatation et de la perméabilité microvasculaires (H1, H2) (Moguilevsky *et al.*, 1995). L’activation de H1 intervient dans de nombreux symptômes de réactions allergiques de type I, y compris le prurit, l’érythème et l’œdème. En effet, les antagonistes de H1 sont utilisés pour le traitement local et systémique de ces symptômes (bien que H2 soit également impliqué dans la physiopathologie de l'anaphylaxie systémique médiée par les IgE) (O’Mahony *et al.*, 2011) (Wechsler *et al.*, 2013). Le knock-out de H1 chez des souris a montré une déficience de la réponse immunitaire puisque plusieurs sous-ensembles de cellules immunitaires expriment le H1.

La suppression entraîne des pourcentages inférieurs de cellules T productrices d'IFN- γ et davantage d'IgG1 et d'IgE spécifiques à l'ovalbumine (OVA) par rapport au type sauvage (Jutel *et al.*, 2001). L'histamine est impliquée dans la libération de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires tels que : β -glucuronidase, IL-8 et IL-6 par les macrophages dérivés des monocytes et les macrophages pulmonaires humains via l'activation de H1 (Triggiani *et al.*, 2001) (Marone *et al.*, 2001). Parmi les antagonistes de H1 les plus connus : Desloratadine, Mepyramine, Loratadine, Chlorpheniramine, Prométhazine, Temelastine, Diphenhydramine, Tripéennamine, Chlorpromazine. Excluant l'histamine, les agonistes de H1 sont : Diméthylhistaprodifen, 2-(3-trifluoro-méthyl-phényl)histamine et Histamine Trifluorométhyl Toluidine. Le H2 est couplé à la fois à l'adénylate cyclase et aux systèmes de seconds messagers de l'adénylate cyclase et des phosphoinositides via des mécanismes distincts dépendants du GTP incluant G α s et d'autres (Del Valle et Gantz, 1997). Similairement au H1, le H2 est exprimé dans différents types cellulaires tels que les cellules immunitaires et les cellules pariétales de l'estomac où son activation induit la sécrétion d'acide chlorhydrique (Borriello *et al.*, 2017).

Le H2 est principalement impliqué dans les activités suppressives de l'histamine, tandis que les effets stimulants sont médiés par H1. Via la régulation positive de H2, plusieurs fonctions au sein du système immunitaire sont inhibées. En effet, l'activation de H2 inhibe la libération de l'histamine par les mastocytes et les basophiles (Lichtenstein et Gillespie, 1975 ; Masini *et al.*, 1982), la chimiotaxie des éosinophiles (Clark *et al.*, 1975), l'activation des neutrophiles (Burde *et al.*, 1989) ainsi que la dégranulation (Ezeamuzie et Philips, 2000). H2 est responsable également de l'inhibition de la synthèse des anticorps, la cytolysse à médiation cellulaire, la prolifération des lymphocytes T et la production des cytokines (Jutel *et al.*, 2002). Les antagonistes les plus courants de H2 sont : Mifentidine, Cimetidine, Tiotidine, Ranitidine, Nizatidine. Les antagonistes de H2 comme la Nizatidine sont efficaces dans le traitement des ulcères duodénaux; leur puissance clinique consiste dans l'effet supprimeur de ces médicaments sur la sécrétion d'acides gastriques (Dy et Schneider, 2004) (Shahid *et al.*, 2009). La Cimétidine a également été utilisée avec succès pour restaurer les fonctions immunitaires chez les patients atteints des affections malignes, d'hypogammaglobulinémie et de complications liées au SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Excluant l'histamine, les agonistes de H2 sont : Dimaprit, Arpromidine, Impromidine, Sopromidine, 4-méthylhistamine et amthamine (Emerson *et al.*, 2002).

Le récepteur H3 est exprimé principalement au niveau du système nerveux central et périphérique en tant que récepteur pré-synaptique qui contrôle la libération d'histamine et d'autres neurotransmetteurs (dopamine, sérotonine, noradrénaline, GABA et acétylcholine). L'activation du récepteur H3 permet la régulation de nombreux processus physiologiques cérébraux notamment la régulation homéostatique énergétique, la cognition, l'état veille-sommeil et l'inflammation (Leurs *et al.*, 2005). Des expériences *in vivo* sur des souris ont montré l'implication du récepteur H3 dans l'activité locomotrice et la température corporelle (Toyota *et al.*, 2002). La transduction du signal de H3 implique la Gi/o des protéines G induisant l'inhibition de l'AMPc et l'accumulation de Ca²⁺ ainsi que l'activation de la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) (Dimitriadou *et al.*, 1994). Pour traiter l'obésité, les troubles cognitifs, l'ischémie cardiaque, et l'insomnie, les antagonistes de H3 sont privilégiés. Les antagonistes de H3 les plus connus sont : Thiopéramide, Clobenpropit et Ciproxyfan, tandis que les agonistes sont : La R- α -méthylhistamine et l'Imetit (Celanire *et al.*, 2005).

Le récepteur H4 est fonctionnellement couplé à la protéine G Gi/o, inhibant la formation d'AMPc induite par la forskoline comme le H3. Son activation conduit à une inhibition de l'adénylyl cyclase et en aval de l'AMPc ainsi que l'activation de MAPK et de la phospholipase C avec mobilisation de Ca²⁺. Le H4 est fortement exprimé dans la moelle osseuse et les cellules hématopoïétiques périphériques, les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules T, et expression modérée dans la rate, le thymus, les poumons, l'intestin grêle, le côlon et le cœur (Nakamura *et al.*, 2000). Le récepteur H4 joue un rôle important dans les réponses inflammatoires et immunitaires ; il intervient dans le recrutement et l'activation des cellules impliquées dans les réponses inflammatoires telles que les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les lymphocytes T et les cellules dendritiques (Dunford *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2004), ainsi que dans la régulation immunitaire y compris la chimiotaxie et la sécrétion de cytokines (Buckland *et al.*, 2003) (Gantner *et al.*, 2002). Les antagonistes de H4 sont JNJ7777120 et Thioperamide. Les agonistes de H4 sont : le Clobenpropit, qui est un antagoniste de récepteurs H3 exerçant une activité agoniste sur H4, Imepip et Imetit

Tableau 1.1

Tableau 1.1 Caractérisations des récepteurs d'histamine (HR). Leur expression cellulaire et tissulaire, leur activation des signaux intracellulaires, leur protéine G couplée, leur fonction physiologique et physiopathologique associée et leurs antagonistes. Adapté de (Criado et al., 2010).

Histamine receptor	Cell and tissue expression	Activated intracellular signals	G Proteins	Involved in:	Antihistamines
HR1	Nerve cells, airway and vascular smooth muscles, endothelial cells, hepatocytes, epithelial cells, neutrophils, eosinophils, monocytes, DC, T and B cells.	Main signaling: enhanced Ca ²⁺ Others: PhLC, PhLD, cGMP, PhLA, NFκ B	G _{q/11}	Circadian rhythm, appetite, endocrine homeostasis, hives, vasodilatation, smooth muscle contraction, itch perception, bronchoconstriction	Desloratadine, Diphenhydramine, Promethazine, Chlorpheniramine
HR2	Nerve cells, airway and vascular smooth muscles, hepatocytes, chondrocytes, endothelial cells, epithelial cells, neutrophils, eosinophils, monocytes DC, T and B cells.	Main signaling: enhanced AMPc Others: Adenylate cyclase, c-Fos, c-Jun, PKC, p70S6K	G _{±s}	Vasodilatation, gastric acid secretion	Cimetidine, Ranitidine, Famotidine, Nizatidine
HR3	Histaminergic neurons, eosinophils, DC, monocytes low expression in peripheral tissues. It inhibits histamine release and synthesis.	Main signaling: inhibition of cAMP Others: enhanced Ca ²⁺ , MAP kinase.	G _{i/o}	Nociception, gastric acid secretion	Thioperamide, Clobenpropit, Ciproxifan
HR4	high expression on bone marrow and peripheral hematopoietic cells, eosinophils, neutrophils, DC, T cells, basophils, mast cells, low expression in nerve cells, hepatocytes peripheral tissues, spleen, thymus, lung, small intestine, colon and heart. It stimulates chemotaxis of eosinophils and mast cells.	Enhanced Ca ²⁺ , inhibition of cAMP	G _{i/o}	Mast cell chemotaxis, itch perception, cytokine production and secretion	JNJ7777120, Thioperamide

1.1.2 Implication de l’histamine dans la réponse immunitaire et inflammatoire

Bien que l’histamine joue un rôle clé dans plusieurs fonctions physiologiques, elle est néanmoins principalement reconnue pour son effet dans les réactions inflammatoires allergiques. Au cours de la saison pollinique, il peut même y avoir une augmentation de 10 fois du nombre de mastocytes sous-muqueux épithéliaux nasaux (Akdis et Blaser, 2003). L’histamine libérée de ces cellules pourrait non seulement induire des symptômes allergiques aigus comme l’éternuement, l’écoulement nasal, les démangeaisons ou encore l’anaphylaxie ; mais également être cruciale pour maintenir cette réponse dans une situation de phase chronique (Banu et Watanabe, 1999; Jutel *et al.*, 2002). Au cours d’une inflammation, lorsque le processus est initié par un allergène, une molécule spécifique : d’immunoglobuline E (IgE) est produite par les plasmocytes contre l’antigène particulier. Ce dernier va se fixer sur les mastocytes via les récepteurs Fcε. Par conséquent, lorsque l’histamine est libérée par les mastocytes activés en tant que molécule effectrice, elle induit des réactions allergiques ou inflammatoires ou module la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces réactions impliquent différents intermédiaires inflammatoires et pro-inflammatoires comme les cytokines, les interleukines IL-1-α, IL-1-β, IL-4, IL-13 ainsi que des chimiokines comme RANTES ou IL-8, à la fois dans plusieurs types de cellules et dans les tissus locaux (Nagai *et al.*, 2006)

Figure 1.3.

1.1.3 Rôle de l’histamine dans le tractus gastro-intestinal (GI)

L’histamine est abondante dans tout le tractus gastro-intestinal (GI), où elle est principalement située dans les mastocytes de la muqueuse intestinale; elle est également produite par les cellules neuroendocrines telles que les cellules entérochromaffine-like (ECL) avec les somatostatines (cellules D) sont nécessaires à la régulation de la sécrétion d’acide gastrique (Bessaguet *et al.*, 2021; Van Nassauw *et al.*, 2007). L’implication de l’histamine dans la régulation de la sécrétion acide par les cellules oxyntiques (pariétales) de l’estomac se fait via un processus complexe. Les facteurs neurocrines, endocrines et paracrines agissent ensemble de manière interdépendante; en particulier, l’acétylcholine, la gastrine et l’histamine qui modulent le processus de libération. Les cellules pariétales expriment les récepteurs de l’acétylcholine, de la gastrine et de l’histamine (H2) à leur surface; néanmoins, les effets de l’acétylcholine et de la gastrine n’étant pleinement exprimés que si les récepteurs de l’histamine sont occupés. C’est-à-dire que l’histamine joue clairement un rôle clé dans le processus. Par ailleurs, les antihistaminiques H2 sont de puissants inhibiteurs de la

sécrétion acide induite par tous ces mécanismes physiologiques (Delves et Roitt, 1998) Figure 1.4. Au niveau intestinal, l'histamine joue un rôle dans l'absorption des graisses. Néanmoins, son rôle physiologique n'est pas très clair. Dans le cas d'une inflammation, l'histamine libérée par les mastocytes de la muqueuse intestinale est associée à une série de réactions physiologiques, notamment une dilatation microvasculaire, une augmentation de la perméabilité vasculaire et muqueuse, une altération de la motilité intestinale et une augmentation marquée de la production de protéines dans la lymphe. Cette augmentation peut être prévenue par les antagonistes H1 et H2 (Ji *et al.*, 2013).

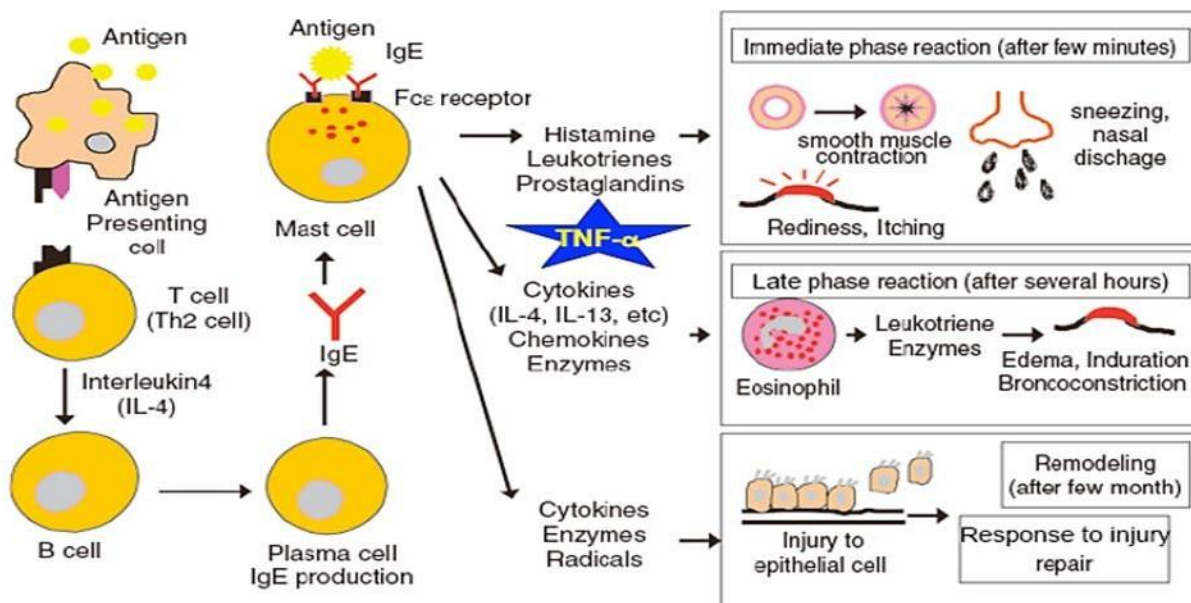


Figure 1.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans les réponses allergiques et inflammatoires. À l'entrée d'un antigène dans l'organisme, il est capté puis phagocyté et présenté sur la surface des cellules présentatrices d'antigène. Rapprochement des cellules T ou Th2 (cellules helper 2) qui produisent les interleukines entraînant la différenciation des cellules B qui vont se transformer en plasmocytes producteurs des anticorps de type IgE. Ces derniers, se fixent sur les récepteurs Fcε des mastocytes qui produisent les médiateurs inflammatoires comme l'histamine, les cytokines, TNFα (facteur de nécrose tumoral), les prostaglandines., etc. pour neutraliser l'antigène. D'après (Nagai *et al.*, 2006).

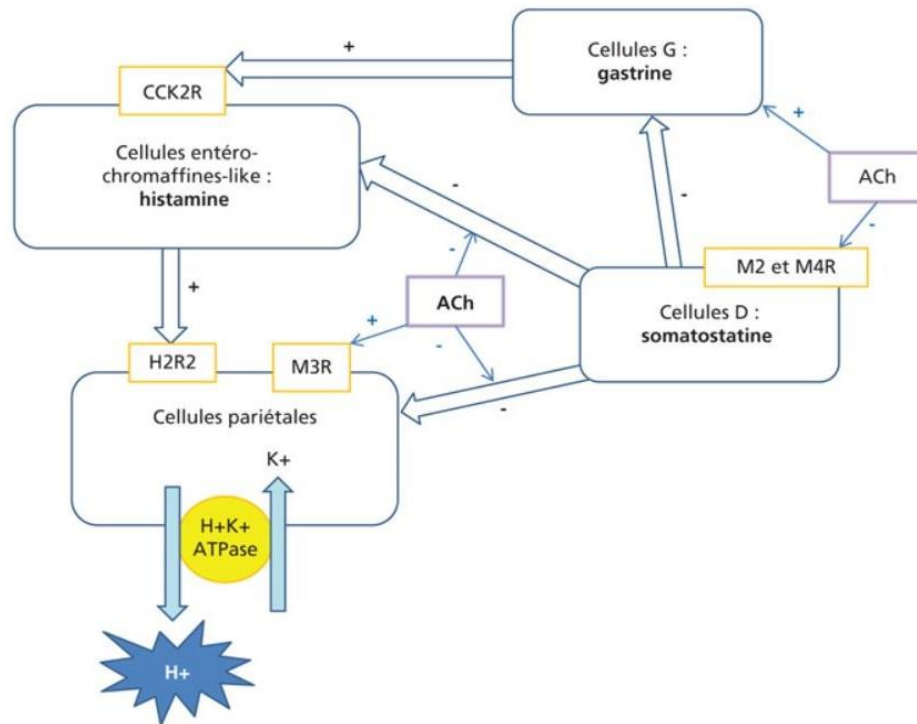


Figure 1.4 Divers mécanismes paracrines, hormonaux, neuroendocrines impliqués dans la régulation et la sécrétion de l'acide gastrique. Les stimulants de la sécrétion de l'acide gastrique sont : l'histamine, la gastrine et l'acétylcholine. Le principal inhibiteur est la somatostatine. Ces effets sont produits via leurs récepteurs appropriés respectivement : H2R2, CCK2R, M3R, M2 et M4R. D'après (Bazin et Lamarque, 2018).

1.1.4 Métabolisme de l'histamine

Selon sa localisation, l'histamine peut être métabolisée par deux principales enzymes qui sont la DAO (diamine oxydase EC 1.4.3.22) également appelée histaminase et la HNMT (Histamine-N-méthyl-Transférase), (EC 2.1.1.8) (Maśliński, 1975). Les deux enzymes transforment l'histamine en produits inactifs aux récepteurs de l'histamine par deux mécanismes différents. La DAO transforme l'histamine en imidazolacétaldéhyde par la désamination oxydative de son groupement amine, tandis que la HNMT la transforme en N4-méthylhistamine par la méthylation de son noyau imidazole (Lefèvre *et al.*, 2017). Dans le cerveau, dépourvu de la DAO, c'est la N-méthylation qui est le principal mécanisme régulant la fonction et le métabolisme de l'histamine, de même dans les voies respiratoires et l'estomac (Schwartz *et al.*, 1991; Yamauchi *et al.*, 1994). La HNMT est exprimée également au niveau des : reins, foie, rate, prostate, bronches et trachée (Maintz et Novak, 2007).

De son côté, la DAO est exprimée principalement dans le tractus intestinal, où elle a pour fonction d'éliminer l'excès d'histamine ingérée et l'histamine qui est formée de manière physiologique par la flore intestinale protégeant ainsi contre l'intolérance à l'histamine ou l'histaminose (Kovacova-Hanusikova *et al.*, 2015). La DAO est considérée comme une protéine sécrétoire qui agit au niveau de l'endothélium microvasculaire et qui est responsable du catabolisme de l'histamine au niveau extracellulaire (Aschenbach *et al.*, 2006; Baylin *et al.*, 1978; Masini *et al.*, 2004) alors que la HNMT se présente comme une enzyme cytosolique, métabolisant l'histamine dans l'espace intracellulaire (Heap et Kiernan, 1973) Figure 1.5.

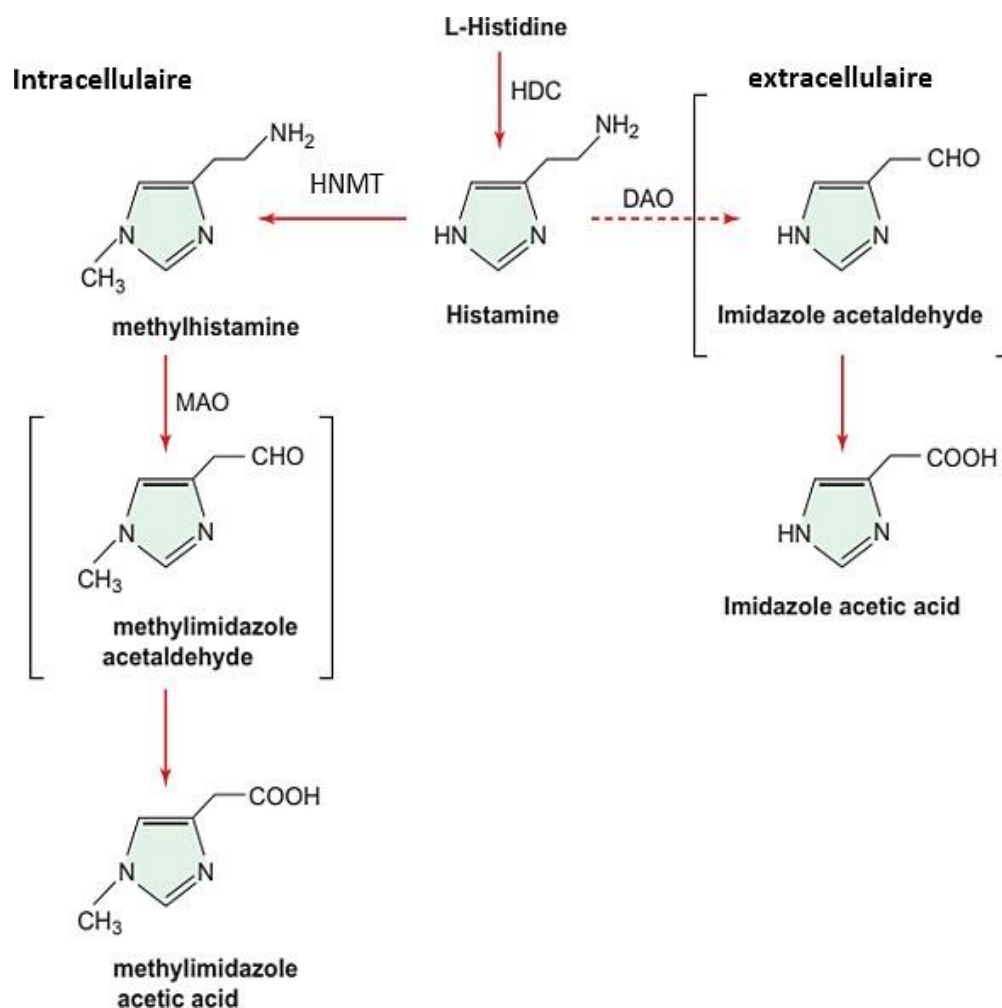


Figure 1.5 Synthèse et voies de métabolisme de l'histamine. DAO : Diamine oxydase, MAO : monoamine oxydase, HNMT: Histamine N-méthyltransférase. D'après (Leurs *et al.*, 2012).

1.1.5 Sources d'histamine et les dysfonctions liées à l'intolérance à l'histamine (histaminose)

L'histamine est considérée comme une molécule ubiquitaire, étant donné qu'elle participe dans la plupart des processus physiologiques du corps humain notamment la réponse immunitaire. En effet, en réponse à divers stimuli immunologiques et non immunologiques l'histamine d'origine endogène est libérée suite à la dégranulation des cellules telles que les mastocytes, les basophiles, les cellules gastriques entérochromaffine-like, les cellules hématopoïétiques, les neurones histaminergiques, les plaquettes, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les neutrophiles (Dy *et al.*, 1981), (Dy et Lebel, 1983) (Wu *et al.*, 2004), (László *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 1989) . En revanche, les mastocytes et les basophiles sont considérés comme les principales sources d'histamine et peuvent eux-mêmes être modulés par l'histamine de manière autocrine car ils expriment les 3 récepteurs H1, H2 et H4 (Kuramasu *et al.*, 1998).

En dépit de ses fonctions régulatrices dans les processus physiologiques humains, l'histamine est considérée comme une amine biogène "Amie et Ennemie" en même temps. Certaines concentrations d'histamine pourraient se trouver naturellement dans les aliments et les boissons, en particulier les fruits de mer, certains fruits et légumes, le fromage affiné, les aliments fermentés tels que la choucroute, certains vins et bières (Papageorgiou *et al.*, 2018). Ces aliments ne représentent aucun danger pour la santé. Néanmoins, lorsqu'ils sont avariés, la quantité d'histamine augmente jusqu'à un niveau de toxicité (50 mg/100 g d'aliments) ainsi que d'autres amines biogènes comme la putrescine et la cadavérine (des concentrations 5 fois supérieures à l'histamine) ce qui entraîne une intoxication alimentaire (Emborg et Dalgaard, 2006; Halász *et al.*, 1994; Stratton *et al.*, 1991). L'histamine peut rapidement s'accumuler dans les tissus des poissons pourris notamment les scombéroïdes qui présentent les espèces bactériennes productrices de l'histidine décarboxylase : *Morganella psychrotolerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* et *Proteus vulgaris* où une production élevée d'histamine a été mise en évidence sous l'action de ces bactéries (Visciano *et al.*, 2012).

Ces bactéries prolifèrent à des températures de 7 °C à 10 °C, mais cette prolifération est réduite ou inhibée à des températures inférieures à 5 °C par la réfrigération et la congélation (Serrano *et al.*, 2020).

D'autres approches pourraient être utilisées afin de prévenir la formation des amines biogènes ou leur réduction telles que les pressions hydrostatiques, l'irradiation, l'emballage sous atmosphère contrôlée, les épices et les additifs alimentaires. L'histamine peut également être dégradée par des amines oxydases bactériennes ou des bactéries amine-négatives qui sont ajoutées aux cultures bactériennes avant la fermentation (Naila *et al.*, 2010).

La consommation des poissons scombéroïdes contaminés ou contenant des quantités importantes d'histamine (supérieur à 500 ppm) induit ce qu'on appelle "*Scombroid fish poisoning*", l'empoisonnement scombéroïde, ou l'empoisonnement à l'histamine (Gonzaga *et al.*, 2009). L'empoisonnement à l'histamine se manifeste par des réactions allergiques caractérisées par des difficultés respiratoires, des éruptions cutanées, des vomissements, de la fièvre et de l'hypertension. Les personnes ayant une déficience dans les mécanismes naturels pour se détoxifier des amines biogènes pour des raisons génétiques ou par une inhibition due à la prise des médicaments inhibiteurs compétitifs de la monoamine oxydase (IMAO) sont plus sensibles à l'empoisonnement à l'histamine (Hernández-Jover *et al.*, 1997; Yongmei *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'excès de l'histamine dans le sang en raison de la diminution de l'activité de la DAO et/ou une augmentation de la perméabilité intestinale a été suggéré comme étant la principale cause de l'intolérance à l'histamine appelée également histaminose (Maintz *et al.*, 2006; Smith et Garrett, 2005; Wöhrle *et al.*, 2004). Bien que l'intolérance à l'histamine n'implique pas le système immunitaire (fausse allergie), les symptômes qu'elle provoque sont similaires à ceux des allergies classiques IgE-médiées (Sampson, 2003). L'histaminose peut être provoquée par une réaction indésirable à des irritants, des causes enzymatiques ou pharmacologiques : la présence simultanée de plusieurs facteurs peut augmenter la gravité de l'intoxication à l'histamine (Sattler *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1990; Wantke *et al.*, 1994). Les symptômes typiques de l'histaminose sont les troubles gastro-intestinaux, les arythmies, la rhinorrhée et la congestion nasale, les éternuements, les maux de tête, la dysménorrhée, les flushs cutanés, l'urticaire, l'asthme et l'hypotonie (Jarisch et Wantke, 1996; Maintz et Novak, 2007). De plus, la déficience de la DAO a été liée à de graves maladies de l'intestin notamment la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn (Mennigen *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1990).

Une capacité réduite de dégradation de l'histamine, et des niveaux élevés d'histamine a également été révélée dans un sous-groupe de patients atteints d'eczéma atopique et présentant des syndromes caractérisés par une éosinophilie avec myalgie (Maintz *et al.*, 2006) Figure 1.6.

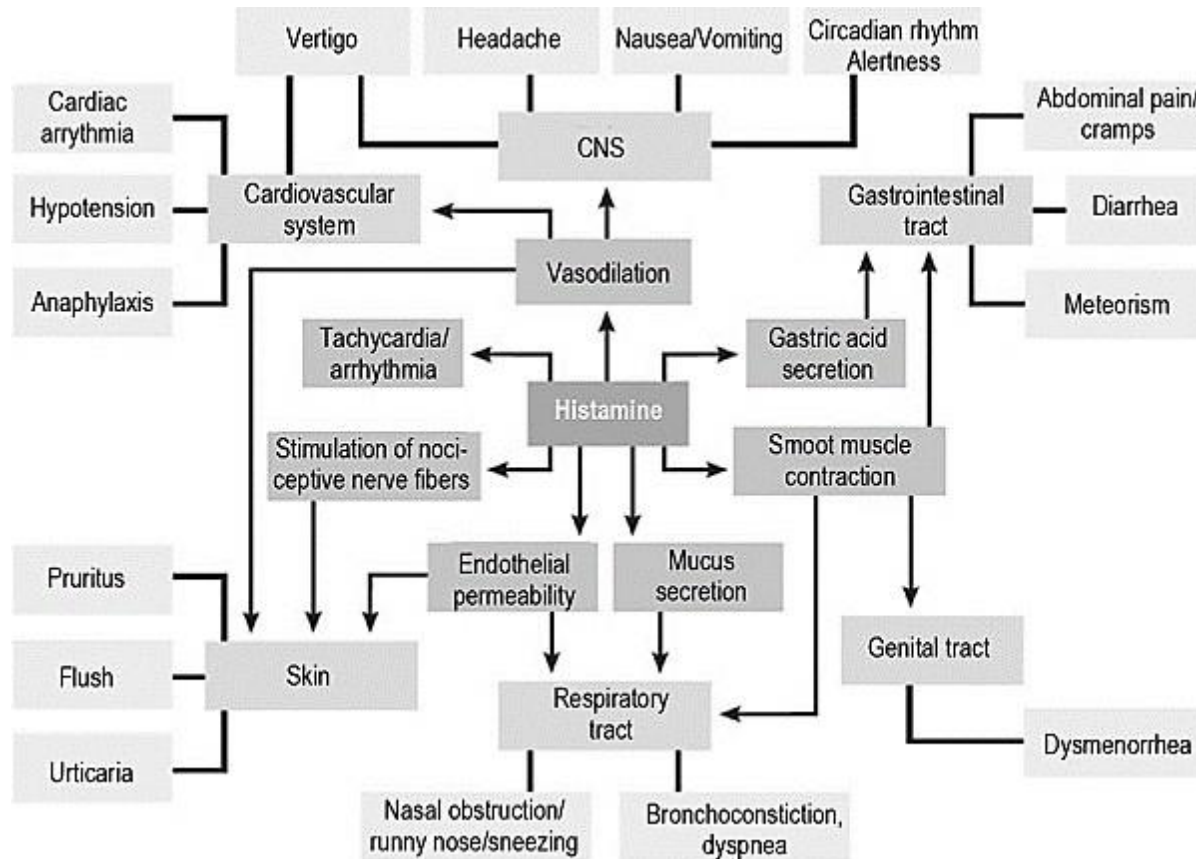


Figure 1.6 Les symptômes liés à l'histamine. D'après (Maintz et Novak, 2007).

1.1.6 Approches thérapeutiques des dysfonctions générées par l'histamine

Dans le but de soulager les symptômes néfastes liés à l'excès d'histamine, plusieurs approches thérapeutiques sont proposées :

- I) Les antihistaminiques : les antihistaminiques ont été longtemps préconisés comme première approche pour soulager les premiers symptômes indésirables suite à l'excès d'histamine notamment la congestion nasale, les éternuements, les maux de tête et les démangeaisons cutanées.

Ils agissent comme des antagonistes des récepteurs de l'histamine ciblant les quatre sous-types de récepteurs H1-H4. Ces récepteurs existent dans un équilibre entre un état inactif et actif où l'histamine se lie préférentiellement à la forme active du récepteur et stabilise cet état actif, déplaçant ainsi l'équilibre vers un état actif. Quant aux antihistaminiques, ils exercent leurs effets comme des agonistes inverses où ils se lient préférentiellement à la forme inactive du récepteur, stabilisant le récepteur à l'état inactif et inclinant l'équilibre vers l'état inactif (Jones et Kearns, 2011). Cependant, certains antihistaminiques peuvent provoquer des effets secondaires tels que : la bouche sèche, l'éruption cutanée, la somnolence et la rétention urinaire (Mann *et al.*, 2000; Springuel et Vu, 2002). À titre d'exemple, la prise accrue de tryptophane provoque entre autres une formation accrue des métabolites de formate et d'indolyle, dont plusieurs inhibent la dégradation de l'histamine (Smith et Garrett, 2005). Par ailleurs, une autre approche thérapeutique visant à traiter les maladies inflammatoires et les développements des carcinomes liés à l'histamine par l'inhibition de l'HDC (histidine décarboxylase) ; néanmoins, les recherches sur cette alternative sont juste à leurs débuts. Des expériences *in vivo* ont montré que le knock-out de HDC chez les animaux a entraîné un développement altéré des mastocytes et une augmentation du rapport osseux formation /perte ainsi que d'autres symptômes indésirables (Moya - Garcia *et al.*, 2005).

- II) Régime pauvre en histamine : il existe plusieurs études démontrant l'effet d'un régime pauvre en histamine dans le soulagement des symptômes liés à l'intolérance alimentaire /histamine. Un régime pauvre en poisson, fromage, boissons alcooliques, tomates, épinard durant 4 semaines a permis de soulager les symptômes de l'intolérance à l'histamine, notamment les maux de tête sévères et l'urticaire. Néanmoins tous ces symptômes sont réapparus 10 à 30 minutes après la réingestion de ces aliments (Wagner *et al.*, 2017; Wantke *et al.*, 1993). Ces types de régimes nécessitent la rigueur et l'endurance et ils ne sont recommandés que pour une courte période, car de telles thérapies peuvent réduire la qualité de vie des patients en les privant des vitamines et d'autres nutriments essentiels à l'organisme.

- III) Diamine oxydase d'origine végétale : considérant que la DAO intestinale est la principale enzyme catalysant la dégradation de l'histamine ingérée (Missbichler *et al.*, 2012).

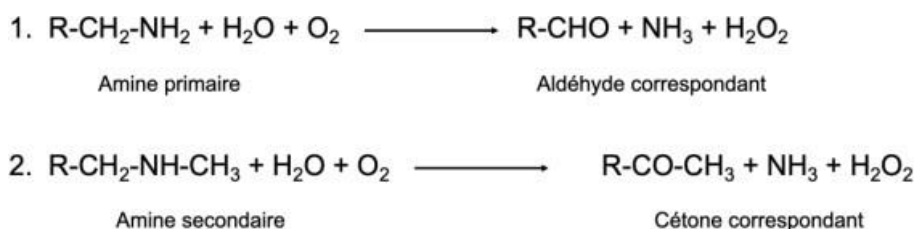
La diamine oxydase végétale (DAOv) extraite à partir des légumineuses est suggérée comme étant une nouvelle approche thérapeutique pertinente due à son activité histaminase afin de traiter certains dysfonctionnements gastro-intestinaux induits par l'histamine et ses effets toxiques. Plusieurs études cliniques (Schnedl *et al.*, 2019; Yacoub *et al.*, 2018) ont démontré des réductions significatives des symptômes médiés par l'histamine après la prise de suppléments oraux de DAO. Par ailleurs, il existe actuellement des compléments alimentaires à base de DAO d'origine animale tels que : Daosin® provenant des reins de porc, indiqués comme enzyme pour traiter les allergies et les dysfonctions entériques. Cependant, la DAOv a une meilleure acceptabilité et elle est plus sûre en termes d'effets secondaires, tout en ayant une activité spécifique plus élevée que le DAO d'origine animale disponible sur le marché (Comas-Basté *et al.*, 2019).

1.2 Amines oxydases et leurs rôles physiologiques

1.2.1 Classification des amines oxydases

Les amines oxydases (AOs) sont des enzymes régulatrices clés qui catalysent l'oxydation de diverses amines biogènes exogènes et endogènes y compris l'histamine, de nombreux neurotransmetteurs et les amines xénobiotiques. Elles sont exprimées chez les eucaryotes et les procaryotes où elles ont pour rôle de catalyser la désamination oxydative de divers mono, di- et polyamines. La sélectivité caractéristique de substrat est en fonction de la source d'enzyme. Les produits de cette réaction oxydo-réductase (Équation ci-dessous) sont : les aldéhydes correspondants, l'ammoniac NH₃ et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit avec une réduction concomitante des molécules d'oxygène (Agostinelli *et al.*, 2010).

Équation 1 Désamination oxydative des amines oxydases. (1) l'amine primaire est oxydée en aldéhyde correspondant. (2) l'amine secondaire est oxydée en cétone correspondant avec une production simultanée de l'ammoniac (NH₃) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), d'après (Mander et Liu, 2010).



Selon le groupement prosthétique ou le cofacteur, les AOs sont divisées en deux classes : les amines oxydases contenant des flavine adénine dinucléotide (FAD-AO) et les amines oxydases contenant du cuivre (Cu-AO).

1.2.2 Amine oxydase à cuivre (Cu-AO)

Les amines oxydases à cuivre (Cu-AO) sont exprimées dans de nombreux organismes différents allant des bactéries aux mammifères. Chez les procaryotes et les eucaryotes inférieurs, les Cu-AOs sont des facteurs clés dans le métabolisme des substrats car ils permettent de produire des éléments essentiels à la survie de ces organismes tels que l'azote et le carbone (Parsons *et al.*, 1995).

Chez les animaux, les Cu-AOs sont impliquées dans le développement, la signalisation et la détoxification. Chez les plantes, elles jouent un rôle dans le développement, les réponses immunitaires et dans le métabolisme secondaire.

L'amine oxydase est composée de 642 acides aminés et elle possède une masse moléculaire de 140 à 200 kDa, contenant deux sous-unités identiques de 70 à 95 kDa; chaque sous-unité contient deux liaisons disulfure, une cystéine libre et un seul ion cuivre. Les Cu-AOs sont dépendantes de cuivre (II) pour leurs activités enzymatiques. Il s'est avéré qu'il joue un rôle redox dans le renouvellement du substrat (Dooley *et al.*, 1991; Turowski *et al.*, 1993).

L'ion cuivrique Cu (II) est considéré comme un élément inorganique ; aligné en pyramide carrée déformée par trois ligands d'histidine N en positions équatoriales et un ligand d'eau axial (Wa) ainsi qu'un ligand labile d'eau équatoriale (We).

Il contient également un cofacteur organique redox lié par covalence formé par la modification post-traductionnelle d'une chaîne latérale de tyrosine en 2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (TPQ) qui est aussi importante pour l'activité des AOs à cuivre (Matsuzaki *et al.*, 1994; Mu *et al.*, 1992)

Figure 1.7 A et B.

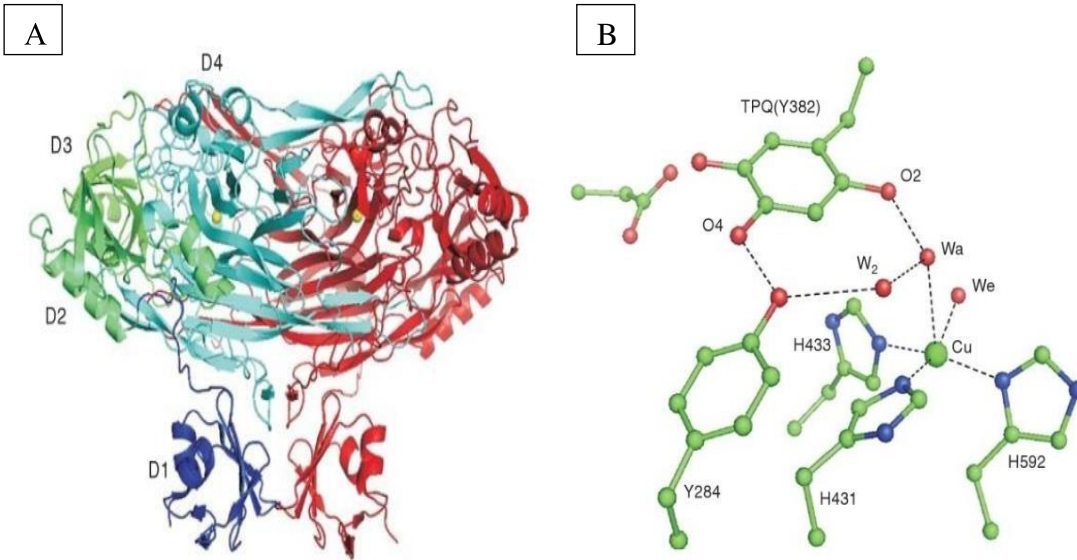


Figure 1.7 Structure cristalline de CuAO homodimérique à partir d'Escherichia coli obtenue par les techniques cristallographiques aux rayons-X. A : le monomère sur la droite est représenté en rouge et le monomère sur la gauche est représenté par domaine comme suit (D1 : bleu, D2 : vert lime, D3 : vert, D4 : cyan) et les ions de cuivres sont représentés sous forme de sphères en jaune. Le rôle biologique du domaine D1 reste inconnu, le domaine C-terminal (D4) se replie en un grand β -sandwich composé de 8 à 10 feuillets tordus collés. Ce domaine forme une grande partie de l'interface intime du dimer, avec deux longs β -hairpin arms qui se croisent d'un monomère à l'autre, le site actif de chaque monomère est localisé dans ce domaine. Les ligands d'ion cuivrique et la séquence conservée qui inclut la tyrosine modifiée sont tous fournis par les β -feuillets adjacents dans ce domaine. B : la structure native de CuAO montre que chaque site composé de Cu (II) est coordonné en disposition pyramidale carrée désordonnée par trois ligands N équatoriaux fournis par un ligand d'histidine et par un ligand l'eau axiale (Wa) et un ligand labile équatorial de l'eau (We). Le cofacteur redox TPQ se trouve à proximité de l'ion cuivrique, mais n'est pas directement coordonné à lui. La position d'O2 du cofacteur est liée à Wa par une liaison d'hydrogène, tandis que l'atome O4 est lié à l'hydroxyle du résidu tyrosine conservé. La position d'O5 de TPQ pointe vers la poche de liaison au substrat amine qui contient un acide aspartique conservé, qui fonctionne comme une base catalytique pendant le turnover. D'après (Mander et Liu, 2010).

La classification des CuAos est établie selon la commission des enzymes EC, qui sont apparues sur la liste de la comité de nomenclature de "International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)". Cette classification est basée sur les réactions que les enzymes catalysent, leurs substrats physiologiques ou le groupe de substrats, et les types de réactions impliquées (Tipton et Boyce, 2000). Le numéro EC est composé de 4 composants. EC 1 inclut toutes les enzymes oxydoréductases.

Le groupe 1.4.x.y inclut les enzymes oxydant le groupe CH-NH₂. EC 1.4.3.y inclut celles qui utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons. Le dernier numéro (y) spécifie l'enzyme individuelle au sein du groupe. Toutes les amines oxydases à cuivre et quinone sont sensibles au semicarbazide SSAO : (semicarbazide-sensitive amine oxydase) et actives envers les monoamines primaires ; nous distinguons : (SSAO/VAP-1 (vascular adhesion protein-1) EC 1.4.3.6), la lysyl oxydase (EC 1.4.3.13), la sérum amine oxydase (EC 1.4.3.21) et la diamine oxydase (EC 1.4.3.22). Cette classification les distingue des flavoprotéines monoamine oxydasses (MAOs) qui ne sont pas inhibées par les semicarbazides. Inversement, SSAO ou du moins dans chez certaines espèces, est insensible à l'inhibition par les inhibiteurs des monoaminesoxydases telles que : la clorgyline. Pour cela, SSAO est référé parfois comme amine oxydase clorgyline-résistante (CRAO) (Floris et Mondovi, 2009).

1.2.3 Diamine oxydase (DAO)

La diamine oxydase (EC 1.4.3.22) est une enzyme ubiquitaire intracellulaire codée par le gène AOC1 ou ABP1 situé sur le chromosome 7q34-q36 dans le génome humain (Schwelberger, 2007). Elle est exprimée chez les eucaryotes et les procaryotes ; et a pour rôle de dégrader les amines biogènes notamment l'histamine. Elle a été découverte en 1929 par Charles H. Best dans l'autolyse des tissus pulmonaires et elle s'appelait à l'origine histaminase (Best, 1929). Après que des études ultérieures ont démontré sa capacité à désaminer d'autres diamines aliphatiques à chaînes courtes telles que 1,4-diaminobutane (la putrescine) et 1,5-diaminopentane (la cadavérine), l'enzyme a été renommée diamine oxydase (DAO) (Mondovi *et al.*, 1964). Chez les mammifères, la DAO est principalement exprimée au niveau de l'intestin, du côlon ascendant, des reins et du placenta (Schwelberger et Bodner, 1997). Les niveaux de la DAO sont les plus élevés durant une grossesse en bonne santé (1000 fois plus élevés que les autres organes). Une faible activité de la DAO est associée à une grossesse à risque (Maintz *et al.*, 2008). Au niveau intestinal, grâce à la forte affinité de la DAO pour l'histamine, la DAO agit comme une barrière protectrice contre l'excès d'histamine exogène (ex : aliments fermentés, vin, fromage) assurant ainsi l'homéostasie. Un déficit ou absence dans le dysfonctionnement de la DAO peut entraîner un excès des taux plasmatiques normaux d'histamine (0,3–1,0 ng/mL) et l'apparition ultérieure de symptômes d'intolérance à l'histamine (Comas-Basté *et al.*, 2019). Chez des individus sains, les niveaux élevés d'activité de DAO sont présents dans le tractus intestinal (Kusche *et al.*, 1980).

Elle est localisée précisément au niveau des villosités des entérocytes, principalement celles du milieu et de l'apex où elle est stockée dans ses vésicules. Cela signifie que tout événement entraînant un dommage ou une perte de la structure des villosités aura un grand impact sur les niveaux d'enzymes dans la muqueuse intestinale. Les entérocytes acquièrent des amines biogènes de la lumière intestinale par diffusion passive et les métabolisent et/ou les stockent (Milovic, 2001). Après stimulation, la DAO est exportée à partir des cellules parenchymateuses vers les sites de liaison vasculaire de la microvasculature intestinale. Cette localisation de la DAO lui permet d'exercer sa fonction de barrière qui inactive l'histamine ingérée et empêche son transport et son accumulation dans la circulation sanguine, assurant ainsi un contrôle local de l'action de ce médiateur inflammatoire (Klocker *et al.*, 2004) (Figure 1.8). Lorsque cette barrière est atténuée ou absente, les taux d'histamine très élevés peuvent engendrer de graves maladies de l'intestin notamment des troubles intestinaux inflammatoires chroniques non spécifiques, la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (Kjeldsen et De Muckadell, 1993; Mennigen *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1990).

De plus, des études ont montré une relation entre un déficit de la DAO et le développement des polypes rectaux, des carcinomes rectaux ainsi que l'adénocarcinome du gros intestin ou de l'estomac (Hesterberg *et al.*, 1981; Kusche *et al.*, 1980). Ces données sont cohérentes avec les résultats des études récentes démontrant une régulation à la hausse de l'activité de l'histidine décarboxylase et des niveaux d'histamine, qui sont fortement corrélés avec la tumeur et le cancer colorectal (Masini *et al.*, 2005). Par ailleurs, d'autres études ont démontré que des médicaments ayant un effet inhibiteur sur la DAO tel que l'aminoguanidine peuvent entraîner un développement considérable des tumeurs du gros intestin. Cette découverte a des implications cliniques importantes pour de nombreux médicaments inhibiteurs de DAO car leur utilisation à long terme peut augmenter le risque des cancers (Gahl et Pitot, 1978) (Kusche *et al.*, 1988; Sattler et Lorenz, 1990). Afin de régler le problème de déficience et dysfonctionnement enzymatique de la DAO intestinale, un potentiel agent thérapeutique à base d'une formulation de DAO peut être administré comme supplément alimentaire (Calinescu *et al.*, 2012). La DAO peut être extraite à partir de deux principales sources qui sont les reins de porc et certaines légumineuses telles que : le pois jaune "*Pisum sativum*" et la gesse "*Lathyrus sativus*".

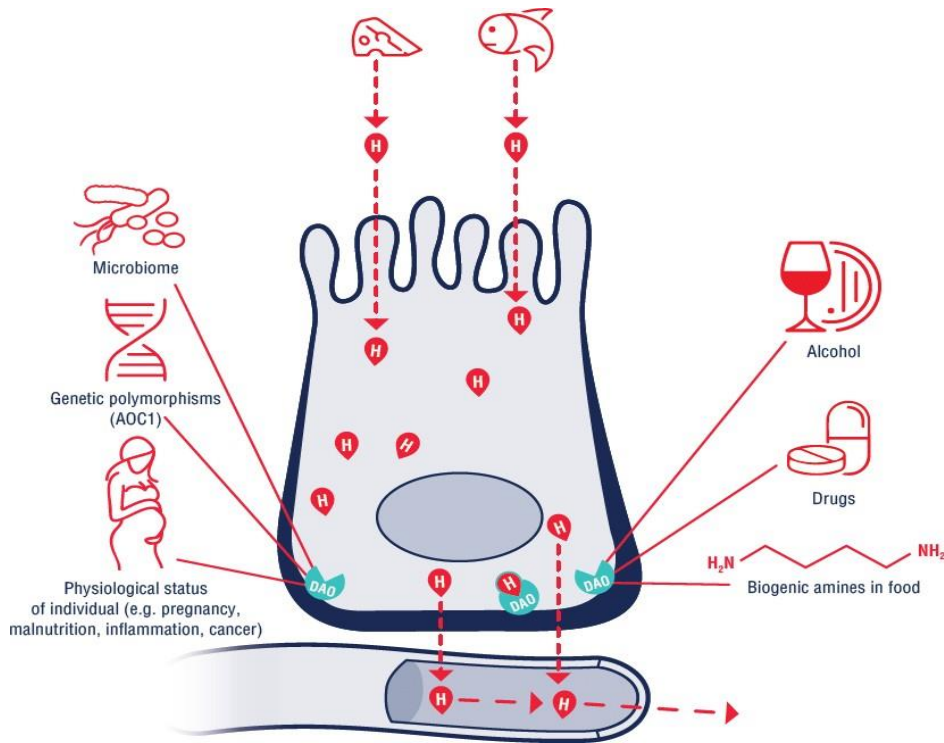


Figure 1.8 Fonction de la DAO dans les entérocytes. Les H en rouge représentent l’histamine libérée par les aliments. L’histamine passe à travers l’entérocyte dans la circulation et la DAO sur la membrane basolatérale crée une barrière en métabolisant l’histamine issue de l’alimentation (la goutte rouge avec H au contour vert). L’activité de la DAO est directement/indirectement dépendante de facteurs internes et externes tels que les polymorphismes du gène AOC1, l’état physiologique de l’organisme, alcool, autres amines biogènes et prise de médicaments. D’après (Hrubisko et al., 2021).

1.2.4 Diamine oxydase végétale (DAOv)

Les enzymes notamment d’origine végétale ont longtemps fait l’objet des études intensives de l’interface de la biochimie et de la physiologie végétale. Généralement, la DAO joue un rôle nutritionnel important chez les microorganismes, puisque ces derniers utilisent les amines primaires comme l’azote ou des sources de carbone (Parsons *et al.*, 1995). Chez les mammifères, la DAO est impliquée dans le métabolisme, la détoxification, et les maladies vasculaires (Máslínski *et al.*, 2018). Bien que son rôle physiologique dans les plantes ne soit pas très connu, la DAO végétale (DAOv) (Cu-AO; histaminase; EC 1.4.3.22) est localisée dans la paroi cellulaire des végétaux, et agit sur les polyamines au niveau de l’apoplaste. Elle est impliquée dans la détoxification, la croissance cellulaire, la réponse immunitaire, la cicatrisation des plaies en régulant les niveaux intracellulaires des polyamines telles que la putrescine, la cadavérine, la spermine et la spermidine.

Les produits aldéhydiques résultant de la désamination oxydative des polyamines par la DAO ainsi que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) libéré, ont un rôle dans la biosynthèse de certains alcaloïdes et la formation de la lignine et de la subérine (Bachrach, 2018; Scalet *et al.*, 1991; Tabor et Tabor, 1964). Des travaux sur le pois chiche (*Cicer arietinum L.*) a permis d'élucider l'implication et le rôle de la DAO dans les plantes. Des observations histochimique et histologiques de la pousse de pois chiche blessée mécaniquement ont montré que les niveaux de la cadavérine, les activités de la DAO (système délivrant du H₂O₂) et de la peroxydase (système consommateur de H₂O₂) ont été fortement augmentées indiquant leur rôle dans la réponse immunitaire, dans le processus de cicatrisation et dans la lignosubérisation (Scalet *et al.*, 1991). L'activité de la DAO dans l'extrait végétal a été démontrée pour la première fois en 1948 avant qu'elle soit retrouvée plus tard dans différents tissus (graines, semis, racines, pousses, xylème, axes, cotylédons, latex, feuilles) des variétés des espèces végétales telles que : *Cicer arietinum* (pousses), *Glycine max* (pousses), *Lathyrus cicera* et *Lathyrus sativus* (pousses), *Pisum sativum* (pousses, cotylédons, et embryons), *Vicia faba* (pousses et feuilles), et *Zea mays* (pousses), etc. (Medda *et al.*, 1995). Parmi ces variétés végétales, des grandes concentrations de la DAOv se trouvent principalement dans les pousses étiolées des légumineuses de : *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*, et *Lathyrus sativus* où la teneur totale en protéine est jusqu'à 4% (Masini *et al.*, 2007). L'histamine est impliquée dans non seulement les réactions anaphylactiques et allergiques, mais aussi dans la dysfonction endothéliale, la perturbation de l'échange sanguin entre les tissus et l'altération des tissus fonctionnels survenant chez des organes subissant une ischémie et une reperfusion. Des expériences sur des cobayes ont montré l'efficacité de l'histaminase extraite des pousses de pois en étant un cardioprotecteur contre les lésions de reperfusion post-ischémique, dans le modèle *in vivo* d'ischémie-reperfusion chez le rat (Floris et Mondovi, 2009). De plus, des expériences sur le cochon d'inde ont montré l'effet protecteur de l'histaminase des pousses de pois purifiée d'une anaphylaxie cardiaque active (Masini *et al.*, 2002). Dans le même contexte montrant l'efficacité des extraits végétaux, un extrait végétal brut à base de kiwi rustique (*Actinidia sp.*) a été rapporté pour prévenir et traiter maladies inflammatoires allergiques et non allergiques (différentes formes de dermatites, entérites, gastrites, etc.), principalement, en inhibant la libération d'histamine par les mastocytes et en réduisant les niveaux d'IgE et de cytokines Th2 dans le sérum (Mondovi *et al.*, 2013). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré également l'efficacité de la DAO (pig kidney DAO) comme complément alimentaire dans l'élimination de l'excès d'histamine causant les allergies alimentaires et les dysfonctions entériques ainsi que le développement des tumeurs.

Une expérience sur des cobayes a suggéré que la pkDAO possède une activité antihistaminique et un rôle protecteur du choc anaphylactique (Mondovì *et al.*, 1975). Une autre expérience *in vivo* a montré que lorsque la pkDAO a été injectée dans les cavités péritonéales des souris a permis d'inhiber significativement la croissance tumorale ascitique d'Ehrlich (Mondovì *et al.*, 1982). En revanche, des études récentes comparatives de l'activité de la DAOv et de la pkDAO et/ou les enzymes des procaryotes ont montré que l'histaminase végétale ou DAOv possède un meilleur nombre de transformations "turnover number" de la catalyse ainsi qu'une liaison et une affinité pour l'histamine plus élevée. De plus, la DAOv aurait une meilleure acceptabilité en étant plus sûre en termes d'effets secondaires, tout en présentant une activité spécifique plus élevée que DAO d'origine animale disponible dans le commerce (Comas-Basté *et al.*, 2019). Par ailleurs, la DAOv est plus accessible en termes de préparation et de sources. L'extraction de l'enzyme à partir des sources végétales à un degré élevé de pureté est réalisé en deux étapes chromatographiques simples et peu coûteuses (Mondovì *et al.*, 2013).

1.2.5 Aspects préparatifs et paramètres de germination liés à l'activité enzymatique de la DAOv

La germination est un processus naturel durant lequel un organisme se développe à partir d'une graine. Le processus de germination comprend un ensemble des événements qui commence par l'absorption de l'eau par une graine sèche et se termine par une extension de l'axe embryonnaire et l'émergence des hypocotyles et des radicules (Bewley, 1997). Au niveau cellulaire, elle se caractérise en premier lieu par le relancement de l'activité respiratoire en réactivant la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire (Ehrenshaft et Brambl, 1990). Ensuite, par la mobilisation des réserves en sécrétant les enzymes hydrolytiques, la dépolymérisation et le transport des réserves vers les cellules embryonnaires en développement ; et enfin, par une augmentation de l'activité des hydrolases pariétales permettant de diminuer la résistance mécanique exercée par les tissus entourant l'embryon (Fincher, 1989; Welbaum *et al.*, 1998). Les conditions environnementales adéquates sont nécessaires pour assurer le bon développement des plantules. Dans le but d'obtenir une DAO la plus active possible, les conditions de germination telles que : la température, l'humidité, la luminosité, la durée de germination et l'arrosage doivent être établies de manière favorable à la croissance des pousses tout au long de la germination. En effet, une étude a montré que l'activité de la DAO dans les pousses de pois chiche était plus élevée lorsqu'elles ont été germées à 25 °C.

Tandis que l'activité enzymatique dans les cotylédons et l'axe embryonnaire a fortement diminué à des températures entre 30 °C et 35 °C (Matilla *et al.*, 2002). Généralement, la lumière est essentielle pour que les plantes effectuent la photosynthèse. En revanche, l'activité de la DAO est significativement plus élevée dans les semis étiolés que dans celles cultivées sous des conditions lumineuses (Choudhary et Singh, 2000 ; Maccarrone *et al.*, 1991). Lorsque les plantes poussent dans des conditions de stress, le niveau de polyamine augmente et a induit l'élévation de l'activité de la DAO (Xing *et al.*, 2007). Des études ont suggéré qu'une germination à l'obscurité est considérée comme un stress à la plantule, ce qui explique l'élévation de l'activité de la DAO sous ces conditions (Yang *et al.*, 2011). La durée de germination est importante, car elle permet un développement maximal des pousses dans lesquelles se trouve la DAO en grande quantité; l'activité de la DAO est plus élevée dans des pousses de 7 à 9 jours ; une germination plus allongée entraîne une diminution dans l'activité de la DAO Tableau 1.2.

Tableau 1.2 Activité spécifique de la DAO (U/mg protéine) dans les organes de Fava Bean. L'activité spécifique de la DAO a augmenté durant les 7 premiers jours de germination dans l'obscurité ; elle est respectivement 390.86, 7.51 et 5.89 fois plus élevée que dans les cotylédons, l'hypocotyle et les racines, d'après (Yang *et al.*, 2011).

time (days)	seed	cotyledon	shoot	hypocotyl	radicle
0	0.12 ± 0.03 g	0.12 ± 0.05 c	NA	NA	NA
1	0.25 ± 0.04 f	0.29 ± 0.04 ab	NA	NA	NA
2	0.26 ± 0.04 f	0.26 ± 0.04 ab	NA	NA	NA
3	0.57 ± 0.06 e	0.33 ± 0.12 a	4.13 ± 0.08 e	NA	1.92 ± 0.15 d
4	1.99 ± 0.07 d	0.30 ± 0.07 ab	18.38 ± 0.36 d	0.53 ± 0.13 d	1.93 ± 0.46 d
5	6.36 ± 0.24 c	0.36 ± 0.08 a	52.93 ± 2.83 c	1.12 ± 0.19 c	5.33 ± 0.65 c
6	13.56 ± 0.12 b	0.20 ± 0.02 bc	65.87 ± 3.19 b	5.43 ± 0.78 b	8.79 ± 0.72 b
7	14.76 ± 0.31 a	0.21 ± 0.09 bc	82.08 ± 2.52 a	10.93 ± 0.50 a	13.93 ± 0.75 a

1.3 Métabolites de type acide-oxalyl-diaminopropionique et leurs déterminations par chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse dans certaines sources végétales

1.3.1 β-ODAP dans certaines légumineuses et ses potentiels effets neurotoxiques

Dans le but d'extraire le maximum de DAO, des variétés des légumineuses telles que *Pisum sativum* (*P. sativum*) et *Lathyrus sativus* (*L. sativus*) ont été sélectionnées pour cette étude. *L. sativus* appelée également la gesse commune ou pois carrés est connue de contenir une neurotoxine

un acide aminé non protéinogène, appelé acide β -N-oxaly-L- α,β -diaminopropionique (β -ODAP). *L. sativus* est une légumineuse annuelle polyvalente appartenant à la tribu des *Vicieae* de la famille des *Fabaceae* considérée peut être comme la légumineuse la plus résistante aux conditions environnementales extrêmes telles que la sécheresse, les inondations, la salinité du sol ainsi qu'aux attaques d'insectes (Kumar *et al.*, 2011; Unander, 2002).

D'un point de vue nutritionnel, les graines de *L. sativus* contiennent 31% de protéines, 41% de glucides, 17 % de fibres alimentaires totales (2 % solubles et 15 % insolubles), 2 % matières grasses et 2% de cendres, sur matière sèche (Akalu *et al.*, 1998; Aletor *et al.*, 1994) Figure 1.9.

En raison de sa culture facile et sa capacité à fixer l'azote à travers ses racines, *L. sativus* est largement cultivée et consommée dans des pays ayant de grandes zones de terres semi-arides comme : Éthiopie, Népal, Inde, Bangladesh, Pakistan et Afghanistan (Hanbury *et al.*, 1999). Or, sa culture a été limitée à l'échelle mondiale en raison de sa teneur en β -ODAP dans les graines et les pousses. Une consommation excessive (30 à 50 % du régime alimentaire) et prolongée de plus de 3 mois de *L. sativus*, peut causer un désordre neurologique, appelé le neurolathyrisme, qui se traduit par une paralysie irréversible des membres inférieurs chez l'humain et l'animal (Barrow *et al.*, 1974). D'autres signes neurologiques sporadiques sont également signalés suite à cette consommation excessive comme l'atteinte des nerfs crâniens ainsi que l'atteinte de la vessie et la polyneuropathie (Paleacu *et al.*, 1999).

Les enfants nourris avec des graines de gesse présentaient un retard de croissance et un système nerveux sous-développé (Grela *et al.*, 2001), il a été reporté que la gesse contient 0.5 à 2.5 % de β -ODAP (Kumar *et al.*, 2011). En plus de *Lathyrus sativus*, la neurotoxine β -ODAP est présente dans plus de 21 espèces principalement *Lathyrus cicera* et *Lathyrus Clymenum*, et quelques autres genres de légumineuses : 17 espèces d'Acacia et 13 espèces de Crotalaires (Rosenthal, 2012). Généralement, le β -ODAP dans les plantes est censé fonctionner comme une molécule porteuse pour les ions zinc (Lambein *et al.*, 1994).

D'autres études suggèrent que le β -ODAP joue également un rôle dans la tolérance à la sécheresse et dans la résistance au stress oxydatif (Jiang *et al.*, 2013).

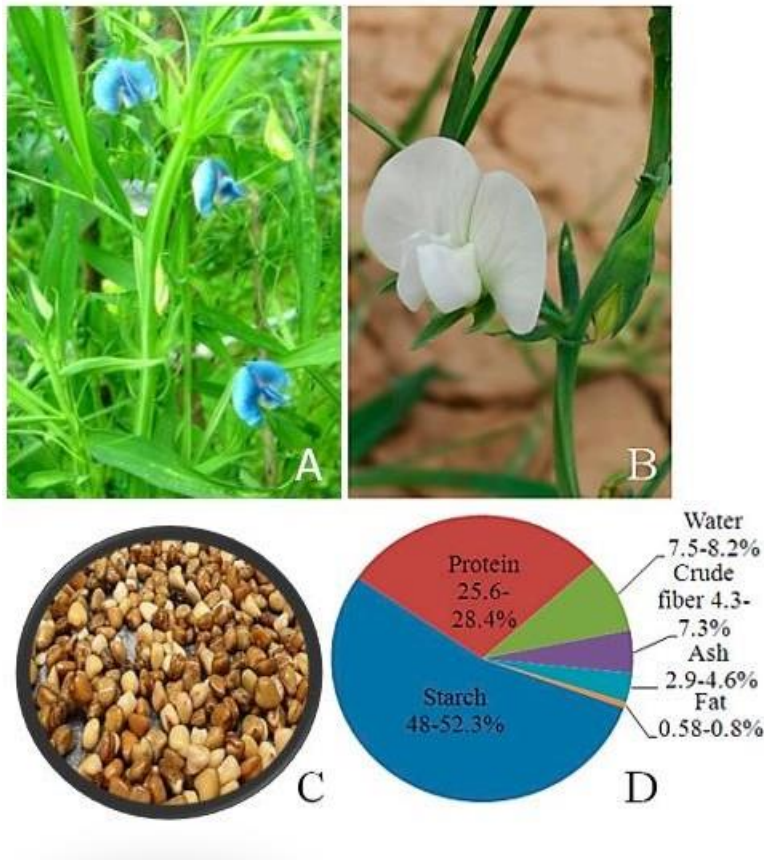


Figure 1.9 Valeur nutritive de *Lathyrus sativus*. (A, B) fleurs colorées de *L. sativus* (gesse). (C) graines de *L. sativus*. (D) Les graines contiennent environ 28% de protéines, 48% amidon et moins de 1% de matière grasse, d'après (Xu *et al.*, 2017).

Les actions neurotoxiques de β -ODAP ont également été largement caractérisées *in vitro*, en utilisant à la fois des sections de cerveau et des cultures des cellules primaires (La Bella *et al.*, 1996; Omelchenko *et al.*, 1999). Ces études ont montré que β -ODAP agit comme un agoniste puissant des récepteurs de α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate (AMPA) (Nunn *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 1989). De plus, lorsqu'il est administré à des rats à des doses appropriées, le β -ODAP augmente le guanosine monophosphate cyclique cérébelleux (GMP) et induit une régulation négative des récepteurs du glutamate dans le cortex moteur primaire (Labella *et al.*, 1993). Mécaniquement, une grande partie de la neuropathologie produite par β -ODAP semble être une conséquence directe de ses similitudes structurelles avec le neurotransmetteur excitateur L-glutamate et sa capacité à induire une excitotoxicité en tant qu'agoniste de non-NMDA (Figure

1.10) (Warren *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que le β -ODAP pourrait induire une dégénérescence neuronale par une stimulation excessive des cellules nerveuses via les récepteurs plasmalemmes du glutamate. Dans les graines de *L. sativus*, β -ODAP est accompagné avec des concentrations plus faibles de α -ODAP. Contrairement à β -ODAP, α -ODAP n'est pas toxique; l'isomérisation de β -ODAP en α -ODAP est possible dépendant des conditions comme : la chaleur, la fermentation, un pré-trempage dans des solutions alcalines. Toutes ces techniques peuvent diminuer la concentration de β -ODAP et augmenter la concentration de α -ODAP diminuant ainsi la toxicité de β -ODAP de *Lathyrus* (Kumar *et al.*, 2011; Padmajaprasad *et al.*, 1997; Vaz Patto et Rubiales, 2014).

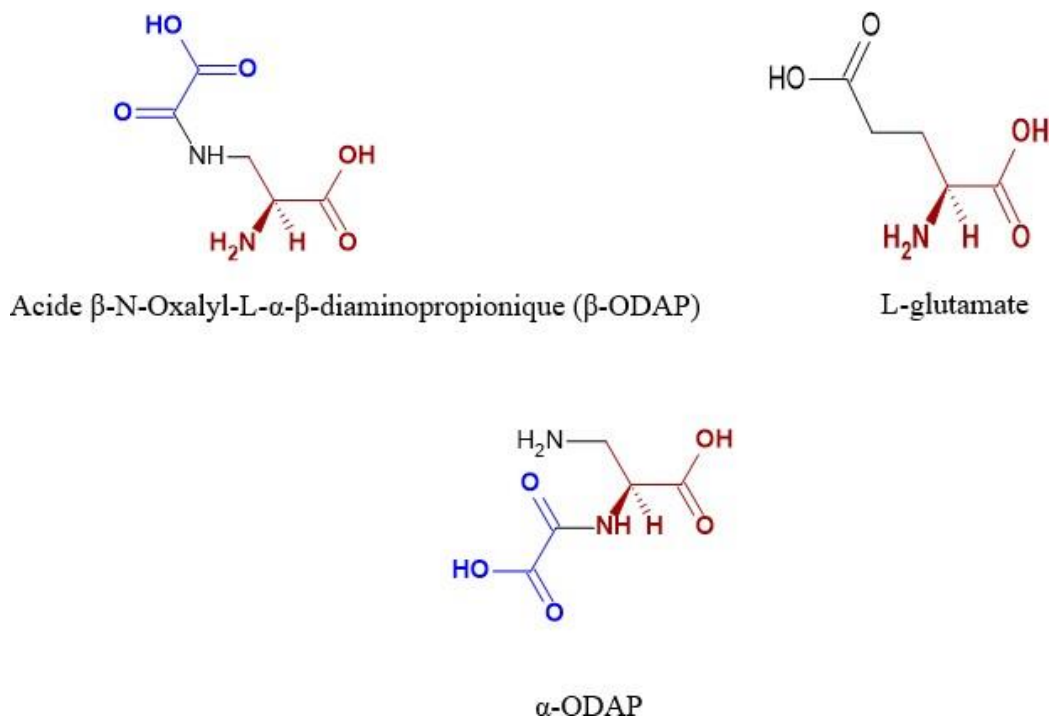


Figure 1.10 Structure de β -ODAP, de L-glutamate et de α -ODAP (parties colorées en rouge représentent les parties similaires entre les deux molécules). Adapté de (Moges *et al.*, 2004) et (Bridges *et al.*, 1989).

Par ailleurs, vu les différentes vertus de la culture de la gesse plusieurs études ont montré l'intérêt d'exploiter la variabilité génétique du β -ODAP afin de développer des variétés à faible teneur en

ODAP; qui, avec des pratiques agronomiques et de détoxification améliorées, peut aider à réduire le risque de lathyrisme. Plusieurs variétés de gesse à faible teneur en β -ODAP ont pu être développées, telles que Wasie en Éthiopie, Ratan, Prateek et Mahateora en Inde, et BARI Khesari-1 et BARI Khesari-2 au Bangladesh avec $<0,10$ % de β -ODAP. De plus, il existe des pratiques agronomiques qui ont pu modifier la teneur en β -ODAP comme: l'application au sol de 15–20 kg ha^{-1} de sulfate de zinc, une semis précoce et le trempage des graines dans l'eau (Kumar *et al.*, 2011).

1.3.2 Détection et quantification de β -ODAP par UHPLC-MS/MS dans des légumineuses

La détection et la quantification de β -ODAP dans graines de *L. sativus* a fait appel à plusieurs techniques analytiques séparatives. Ces dernières doivent être précises et à haut débit pour des programmes de sélections où un grand nombre d'échantillons doit être quantifié de manière simple et rapide. En revanche, certaines méthodologies analytiques ne sont pas capables de distinguer la toxine β -ODAP de son isomère non toxique α -ODAP telles que les méthodes colorimétriques, CPG-MS (chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse) qui nécessitent la dérivatisation de l'échantillon et CCM (chromatographie sur une couche mince). D'autres méthodologies sont utilisées également pour analyser la présence de β -ODAP et α -ODAP telles que : électrophorèse capillaire de zone (CZE), analyse par injection de flux et résonance magnétique nucléaire (RMN) (Tarade *et al.*, 2007). Néanmoins, la méthode HPLC est la méthode qui est la plus utilisée et largement développée pour le criblage d'échantillons végétaux et des tissus d'animaux contenant du β -ODAP en étant plus simple, plus rapide, fiable et pas chère. Plus récemment, une méthode UHPLC-MS/MS utilisant une colonne C18 a été développée pour la quantification du β -ODAP, de la L-homoarginine et de l'asparagine dans 173 génotypes de *Lathyrus sativus* (Arslan *et al.*, 2017). Selon l'échantillon d'intérêt et la composition de la phase stationnaire, la phase mobile peut se composer d'un mélange de solvant liquide pressurisé : souvent l'eau, acétonitrile, et/ou méthanol avec l'ajout ou non de l'acide formique où l'élution des analytes peut être en mode isocratique ou en mode gradient. La méthode de chromatographie est définie principalement par la phase stationnaire. La chromatographie en phase inverse est la méthode la plus utilisée en biochimie visant à séparer les constituants d'un mélange en fonction de leur polarité où la phase stationnaire consiste en une colonne C18 pour la séparation. Pour la détection des analytes par spectrométrie de masse, il existe plusieurs procédés comme : quadripôle, temps de vol, piège ionique quadripolaire, etc., qui sont utilisés pour analyser la substance active, la teneur et les

résidus présents dans les aliments. En comparaison à d'autres détecteurs chromatographiques, leur sensibilité, spécificité et applicabilité à grande échelle rendent les systèmes LC-MS/MS plus propices. Dans l'une des études, la détermination de α - et β -ODAP était possible en développant la méthode HPLC-MS/MS sans dérivation préalable d'échantillon en utilisant la chromatographie à interaction hydrophile (HILIC) Figure 1.11. Comme le β -ODAP est une molécule acide ($pK_a = 2.1$), la phase mobile utilisée était de pH : 3 à 1.7 avec l'ajout de l'acide formique en mode isocratique (Bento-Silva *et al.*, 2019).

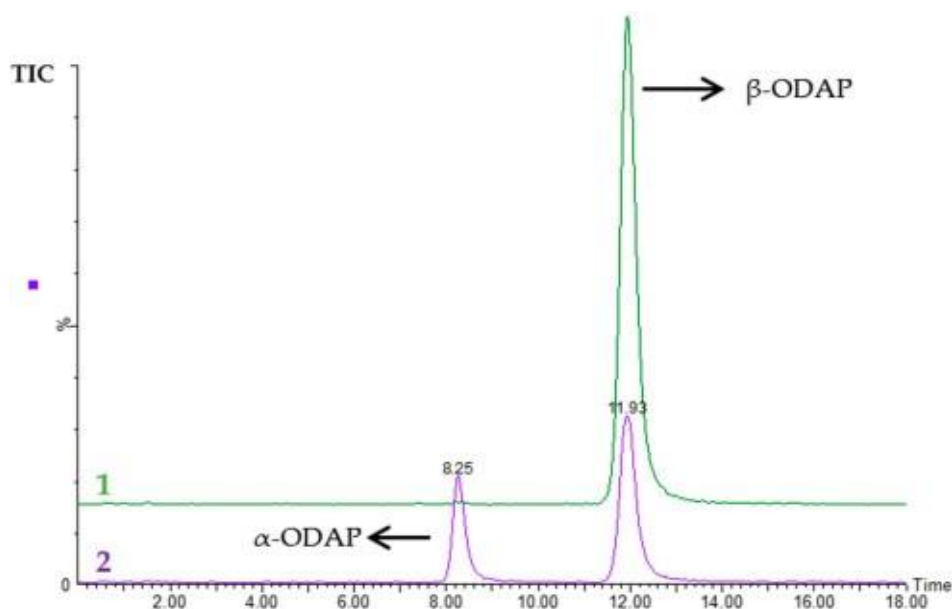


Figure 1.11 Chromatogramme des deux pics α -ODAP et β -ODAP à partir de MRM (Multiple Reaction Monitoring). TIC : Total ion chromatogram, d'après (Bento-Silva *et al.*, 2019)

CHAPITRE 2

PRÉSENTATION DU PROJET

Les avancées récentes dans notre compréhension des actions bénéfiques de la DAO végétale (DAOv) par l'atténuation des effets néfastes causés par l'excès d'histamine, notamment l'intolérance à l'histamine (histaminose) et les dysfonctions entériques, font de la DAOv une molécule biopharmaceutique intéressante. Différente des thérapies existantes telles que les antihistaminiques et la DAO d'origine animale, une formulation à base de DAOv pourrait représenter une alternative sûre et non toxique qui peut complètement remplacer ou agir en complément avec les autres traitements existants. Particulièrement la DAOv a montré son efficacité dans la modulation des réponses inflammatoires et allergiques, la prévention des lésions de reperfusion post-ischémiques cardiaques et splanchniques impliquant l'histamine (Masini *et al.*, 2007). Par ailleurs, la DAOv possède une meilleure réactivité avec l'histamine et les diamines aliphatiques ainsi qu'une activité spécifique enzymatique plus élevée que celle d'origine animale (Comas-Basté *et al.*, 2019; Pietrangeli *et al.*, 2007). La problématique de ce projet est que l'extrait de la DAO à partir de *L. sativus* contient une neurotoxine appelée β -N-oxalyl-L- α,β -diaminopropionique (β -ODAP). Tenant compte de cette contrainte, ce projet visait à explorer l'activité de la DAO dans différents cultivars de *P. sativum* développés au Canada et dans *L. sativus* tout en prenant en considération l'éventuelle présence de β -ODAP dans l'extrait de DAOv. Pour ce faire, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) a été utilisée afin de détecter et de quantifier le contenu de la neurotoxine dans les extraits de DAOv (Figure 2.1).

Le premier objectif de cette étude était d'établir des conditions de germination optimales favorisant le bon développement des pousses de *L. sativus* et des cultivars de *P. sativum* pour obtenir le maximum d'activité de DAO possible (Figure 2.2). Tenant compte de l'importance des conditions de germination dans l'obtention d'une DAO avec une activité enzymatique élevée, une hypothèse s'est émise dans ce travail que l'arrosage avec des solutions nutritives pourrait augmenter davantage l'activité enzymatique de la DAO. Étant donné que le Cu^{2+} est nécessaire à la formation de DAO (Zhang *et al.*, 2003), une des variantes était l'arrosage avec des solutions contenant : CuCl_2 . Aussi l'urée comme source d'azote pour aider la plantule à mieux se développer et augmenter l'activité de la DAO a été utilisée.

L'eau a été utilisée comme témoin. La 2^{ème} possibilité est que ces solutions pourraient créer un stress qui va permettre de stimuler l'activité de la DAO puisque ce dernier joue un rôle dans la réponse immunitaire de la plantule (Scalet *et al.*, 1991) (Annexe A).

Le deuxième objectif consistait à doser l'activité de la DAOv dans ces légumineuses et sélectionner les variétés présentant la DAO la plus active (Figure 2.3) avant de passer à la technique HPLC-MS pour la détection et la quantification de β -ODAP dans des extraits bruts dialysés et non dialysés (Figure 2.4). Les résultats de la quantification β -ODAP sont comparés avec le seuil de toxicité dans la littérature, et la sélection de la nouvelle source de DAOv est basée sur la variété contenant la DAOv la plus active mais également la plus sûre en termes de toxicité.

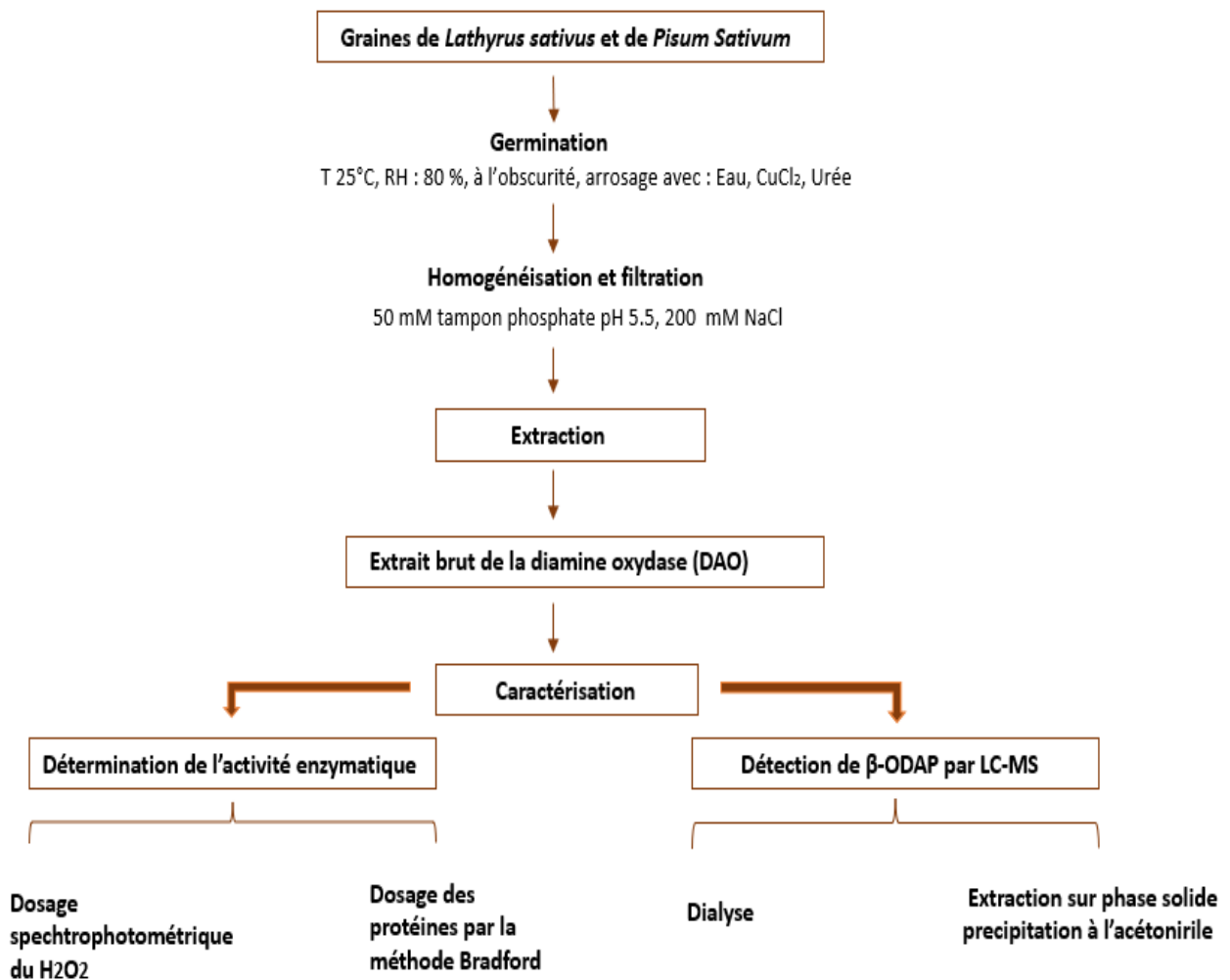


Figure 2.1 Présentation schématique générale des différentes étapes du projet de maîtrise.

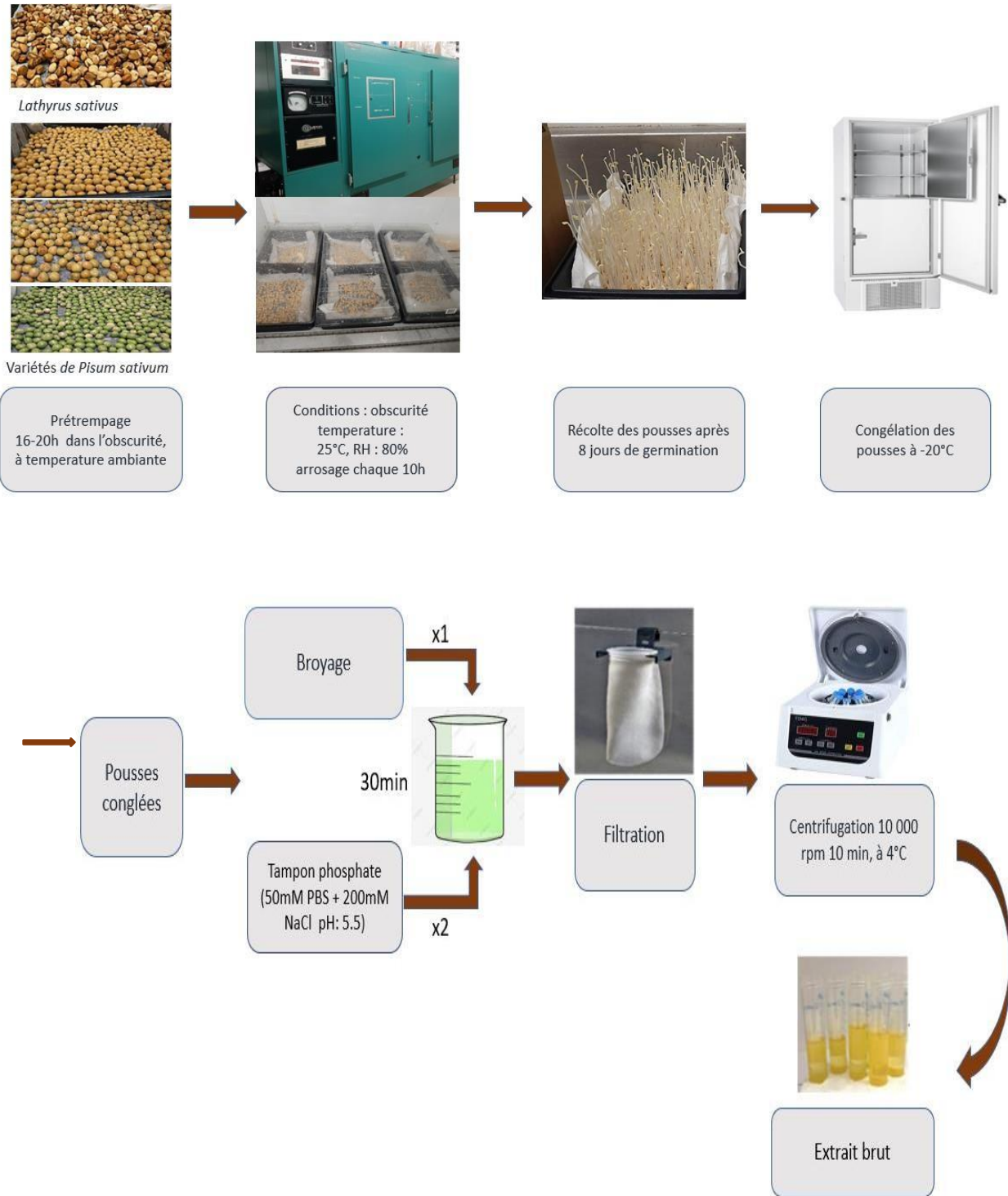
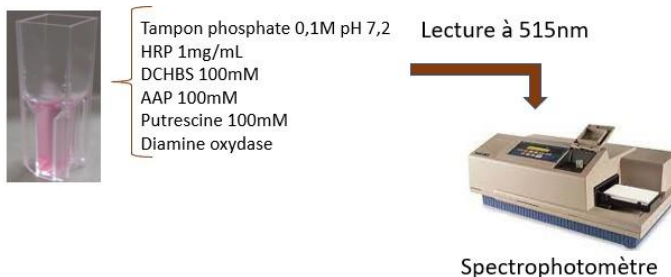


Figure 2.2 Conditions de germination et processus d'extraction de la DAOv à partir de *L. sativus* et des cultivars de *P. sativum*

- **Dosage de l'activité enzymatique:**
Méthode DCHBS (Sodium 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate), AAP (Amino antipyrine), et HRP (Horseradish peroxidase)



- **Dosage protéique:**
Méthode Bradford avec BSA (BOVINE SERUM ALBUMIN) comme standard concentration :0,1 mg/mL

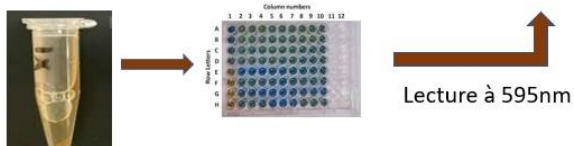


Figure 2.3 Dosage de l'activité enzymatique et la concentration protéique dans l'extrait de la DAOv.

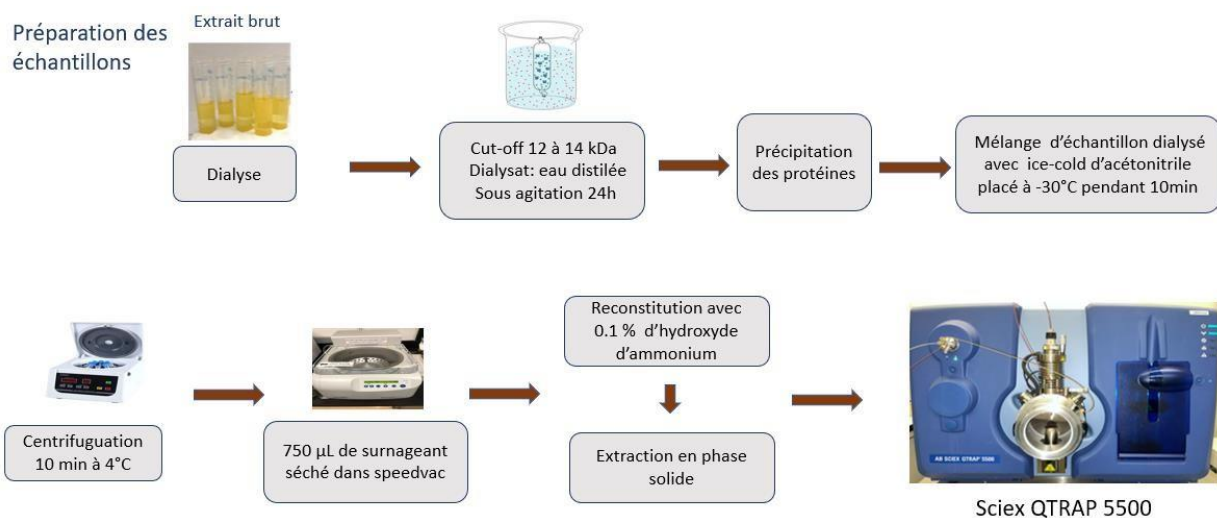


Figure 2.4 Préparation des extraits bruts de DAO avant de les injecter dans le spectromètre de masse (QTRAP).

CHAPITRE 3

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Diamine Oxidase as a Therapeutic Enzyme: Study of Germination from Vegetal Sources and Investigation of the Presence of β -N-Oxalyl-L- α , β -diaminopropionic Acid (β -ODAP) using LC-MS/MS

Rym Boulfekhar^{1,2}, Leanne Ohlund¹, Kathrina Mae Kumaresan¹, Meriem Megoura^{1,2}, Thomas D. Warkentin³, Pompilia Ispas-Szabo^{1,2}, Lekha Sleno¹, Mircea Alexandru Mateescu^{1, 2,*}

¹ Department of Chemistry & Center CERMO-FC, Université du Québec à Montreal, CP 8888, Branch A, Montreal, Quebec H3C 3P8, Canada.

² Department of Chemistry & Research chair Allerdys - Prevention of allergies and enteric dysfunctions, University du Québec à Montreal, CP 8888, Branch A, Montreal, Quebec H3C 3P8, Canada.

³ Crop Development Centre, Department of Plant Sciences, University of Saskatchewan, 51 Campus Dr., Saskatoon, SK S7N 5A8, Canada.

*Article publié dans le journal : *International Journal of Molecular Sciences*

*Corresponding authors:

Mircea Alexandru Mateescu

Lekha Sleno

Department of Chemistry, UQAM, CP 8888, Branch A. Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada

Phone: +1 (514) 987 4319

e-mail : mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Phone: +1-(514)-987-3000 (ext. 1599) e-mail: sleno.lekha@uqam.ca

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Rym Boulfekhar a participé dans l'élaboration du concept, elle était responsable de la rédaction du corps du manuscrit et des parties expérimentales et méthodologiques. Elle a participé dans la préparation des protocoles et dans le traitement des résultats et la recherche bibliographique.

Leanne Ohlund a participé dans l'élaboration du concept pour les analyses LC-MS, révision du manuscrit, édition et préparation des figures.

Kathrina Mae Kumaresan a participé dans les analyses de LC-MS.

Meriem Megoura a participé dans la préparation des échantillons.

Thomas D. Warkentin : choix des cultivars à utiliser comme sources végétales, révision du manuscrit.

Pompilia Ispas-Szabo a participé dans l'élaboration du concept, l'analyse des données, la rédaction et révision du manuscrit, la coordination du travail.

Lekha Sleno : responsable de l'élaboration du concept pour les analyses LC-MS, révision du manuscrit, édition et préparation des figures.

Mircea Alexandru Mateescu directeur du projet, a supervisé toutes les activités scientifiques et a fourni les instructions requises concernant les parties expérimentales du projet et les interprétations des résultats obtenus. Révision et correction du manuscrit.

3.1 Résumé

La diamine oxydase végétale (DAOv), une enzyme proposée pour soulager les symptômes de l'histaminose, montre une meilleure réactivité avec l'histamine et les diamines aliphatiques, ainsi qu'une activité enzymatique plus élevée que la DAO d'origine animale. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité enzymatique de DAOv à partir de grains germés de *Lathyrus sativus* (pois d'herbe) et de *Pisum sativum* (pois), et de vérifier la présence d'une neurotoxine, l'acide β -N-Oxalyl-L- α,β -diaminopropionique (β -ODAP), dans l'extrait brut obtenu à partir de leurs semis. La chromatographie liquide ciblée à réactions multiples ; une méthode de spectrométrie de masse de surveillance a été développée et utilisée pour quantifier le β -ODAP dans les extraits analysés. Une procédure de préparation d'échantillons optimisée, impliquant la précipitation des protéines avec l'acétonitrile suivi d'une extraction en phase solide par échange d'anions mixtes, permettant une sensibilité élevée et une forme de pic plus symétrique pour la détection de β -ODAP. L'extrait de *Lathyrus sativus* a présenté la plus forte activité enzymatique de DAOv des extraits, suivi de l'extrait du cultivar de pois Amarillo du Centre de développement des cultures (CDC). Les résultats ont également montré que même si le β -ODAP était présent dans l'extrait brut de *L. sativus*, sa teneur était bien inférieure au seuil de toxicité (300 mg de β -ODAP/kg corps/jour). CDC Amarillo a montré 5000 fois moins de β -ODAP que l'extrait de *L. sativus* non dialysé. Il a été conclu que les deux espèces peuvent être considérées comme des sources de vDAO pour une éventuelle utilisation thérapeutique.

3.2 Abstract

Vegetal diamine oxidase (vDAO), an enzyme proposed to relieve symptoms of histaminosis, shows better reactivity with histamine and aliphatic diamines, as well as higher enzymatic activity than DAO of animal origin. The objective of this study was to evaluate the enzyme activity of vDAO from germinating grains from *Lathyrus sativus* (grass pea) and *Pisum sativum* (pea), and to verify the presence of a neurotoxin, β -N-Oxalyl-L- α,β -diaminopropionic acid (β -ODAP), in the crude extract obtained from their seedlings. A targeted liquid chromatography–multiple-reaction monitoring mass spectrometry method was developed and used to quantify β -ODAP in the analysed extracts. An optimized sample preparation procedure, involving protein precipitation with acetonitrile followed by mixed-anion exchange solid-phase extraction, allowed for high sensitivity and good peak shape for β -ODAP detection. The *Lathyrus sativus* extract exhibited the highest vDAO enzyme activity of the extracts, followed by the extract from pea cultivar Amarillo from the Crop Development Centre (CDC).

The results have also shown that even though β -ODAP was present in the crude extract from *L. sativus*, its content was far below the toxicity threshold (300 mg of β -ODAP/kg body/day). CDC Amarillo showed 5000-fold less β -ODAP than the undialysed *L. sativus* extract. It was concluded that both species can be considered as convenient sources of vDAO for potential therapeutic use.

Keywords: vegetal diamine oxidase, histaminosis, histamine, *L. sativus*, *P. sativum*, β -ODAP, LC-MS.

3.3 Introduction

Histamine intolerance (HIT), also referred to as enteral histaminosis, is a disorder caused by an excessive increase in histamine (Comas-Basté *et al.*, 2020). Histamine is a biogenic amine that plays an important role in the body as a neuromediator and immune modulator (Nuutinen et Panula, 2010). In contrast, HIT is defined by the impaired gastrointestinal breakdown of histamine from ingesting foods containing high levels (Schnedl et Enko, 2021), such as chocolate, certain cheeses, sauerkraut, tomatoes, and some red wines (Hungerford, 2021). Among the causes of HIT is the reduced ability to metabolize histamine by the intestinal enzyme diamine oxidase (DAO) (Mušič *et al.*, 2013; Reese *et al.*, 2017; Sattler *et al.*, 1988).

Considering that DAO is the main exogenic histamine degrading enzyme with predominant activity in the gut, histamine excess in the gut lumen may trigger diarrhea, abdominal pain, or constipation by enhancing neurosecretory functions and muscle contractility (Maintz et Novak, 2007). In addition, histamine excess may be linked to serious inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis (Raithel *et al.*, 1995). DAO copper-containing amine oxidase (EC 1.4.3.22) is a homodimer and ubiquitous enzyme with a molecular mass in the range of 140–200 kDa. DAO catalyzes the oxidative deamination of the primary amino group of histamine to imidazole acetaldehyde, consuming dioxygen with the simultaneous release of stoichiometric amounts of ammonia and hydrogen peroxide (Elmore *et al.*, 2002), as shown below.



A deficiency in DAO activity can lead to the development of histamine intolerance, a clinical condition that can be treated with a low-histamine diet and oral DAO supplementation to improve intestinal histamine breakdown (San Mauro Martin *et al.*, 2016). Pig kidney and some legumes seedlings are suitable sources for the formulation of a DAO supplement. In contrast to DAO of animal origin, vegetal DAO (vDAO) is believed to have higher specific activity, as well as being more acceptable and safer in terms of side effects (Comas-Basté *et al.*, 2019). Therefore, vDAO has been suggested as an effective therapeutic enzyme for oral administration to treat food histaminosis, allergies, and histamine-related enteric dysfunctions (Neree *et al.*, 2020).

vDAO is found in different tissues (seeds, shoots, roots, seedlings, embryo axes, cotyledons, apices, leaf) of a variety of plant species including *Cicer arietinum* (seedlings), *Glycine max* (seedlings), *Lathyrus cicera* and *Lathyrus sativus* (seedlings), *Pisum sativum* (seedlings, cotyledons, and embryos), *Vicia faba* (seedlings and leaves), and *Zea mays* (seedlings), (Medda et al., 1995). vDAO is extracted from seedlings that are obtained after a period of germination. The germination process includes a set of physiological events that begins with the absorption of water by the dry seed and ends with extension of the embryonic axis and the emergence of hypocotyls and radicles (Bewley, 1997). At the cellular level, it is characterized primarily by the revival of respiratory activity by reactivating glycolysis, the Krebs cycle, and the respiratory chain (Ehrenschaft et Brambl, 1990). Then, the reserves are mobilized by secreting hydrolytic enzymes followed by depolymerization and transport of reserves towards the embryonic cells in development, and finally, the activity of parietal hydrolases are increased, which reduces the mechanical resistance exerted by the tissues surrounding the embryo (Fincher, 1989; Welbaum et al., 1998). Adequate environmental conditions are necessary to ensure the proper development of seedlings. To obtain the most active DAO possible, the germination conditions including temperature, water, and light must be optimized to enhance growth of seedlings throughout germination (Choudhary et Singh, 2000; Kivirand et Rincken, 2007; Luhova et al., 2003; Maccarrone et al., 1991; Matilla et al., 2002).

Large concentrations of vDAO are mainly found in the etiolated seedlings of legumes of *Pisum sativum* (pea) and *Lathyrus sativus* (grass pea), where the total protein content can be as high as 4% (Luhova et al., 2003; Masini et al., 2007). Pea and grass pea seeds have a high nutritional value, with a protein content of 22-37% (Hanbury et al., 2000). Grass pea is an affordable and wholesome food option in areas of North India and Africa that are vulnerable to drought and hunger (Kumar et al., 2011; Singh and Singh, 1952; Woldeamanuel et al., 2012). However, due to the presence of β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid (β -ODAP), a free non-proteinogenic amino acid with neurotoxic effects, extensive production and consumption of grass pea seeds in food and feed has been limited.

β -ODAP may generate an irreversible paralysis of the lower limb muscles in humans resulting in "neurolathyrism" (Fikre *et al.*, 2008; Woldeamanuel *et al.*, 2012). This chronic non- progressive motor neurodegeneration may be brought on by excessive ingestion of grass pea (300to 400 g/day for 2 to 4 months) (Rao *et al.*, 1964).

The main objective of this study was to explore the activity of vDAO in different cultivars of *P. sativum*, developed in Canada, and in *L. sativus* and determine their safety as a source of vDAO, in the context of potential toxicity from residual β -ODAP content. For this work, a targeted liquid chromatography–multiple reaction monitoring (LC-MRM) tandem mass spectrometry assay was developed for the sensitive detection and quantitation of β -ODAP content in vDAO extracts.

3.4 Results

3.4.1 vDAO Activity in different seed varieties.

This study is an important part of a more extended project focused on orally administered vDAO as a promising and effective therapeutic approach to alleviate histamine-related dysfunctions, particularly enteric ones. Various cultivars of *Pisum sativum* (*P. sativum*) have been compared with *Lathyrus sativus* (*L. sativus*) as sources of vDAO. One of the main parameters to evaluate the source to be retained was the vDAO enzyme activity measured as the rate of oxidation of biogenic amines, such as putrescine or histamine, via the amount of hydrogen peroxide as product of reaction for extracts from different vegetal sources (Table 3.1), organs and tissues (Table 3.2) and germination time (Table 3.3).

Crude extracts from several Canadian field pea seed varieties obtained through the Crop Development Centre (CDC), as well as from *L. sativus* and *P. sativum* were prepared to investigate their vDAO enzyme activities. vDAO enzyme activity, total activity, and specific activity of *L. sativus* (2.21 U/mL, 99.45 U and 1.41 U/mg), respectively, were the highest compared with the other seed varieties of seeds (Table 3.1). When compared with other pea varieties, CDC Amarillo had the highest enzyme activity total activity and specific vDAO activity at (1.31 U/mL, 58.95 U and 0.77 U/mg), respectively.

Tableau 3.1 DAO activity in seedlings extracts of pea and grass pea.

Seedlings	vDAO activity (U/mL)	Total volume (mL)	vDAO total activity (**U)	Protein concentration (mg/mL)	vDAO specific activity (U/mg protein)
<i>Lathyrus sativus</i>	2.21 ± 0.09	45	99.45 ± 4.05	1.57 ± 0.47	1.41 ± 0.06
CDC Amarillo	1.31 ± 0.01	45	58.95 ± 0.45	1.71 ± 0.17	0.77 ± 0.01
CDC Meadow	0.82 ± 0.01	45	36.97 ± 0.61	1.30 ± 0.04	0.63 ± 0.01
CDC Limerick	0.75 ± 0.02	45	33.82 ± 0.99	1.84 ± 0.15	0.41 ± 0.02
CDC Inca	0.70 ± 0.01	45	31.52 ± 0.73	1.86 ± 0.21	0.38 ± 0.02
*Yellow pea	0.50 ± 0.03	45	22.50 ± 1.52	1.35 ± 0.09	0.36 ± 0.02
CDC Dakota	0.40 ± 0.01	45	18.40 ± 0.68	1.48 ± 0.08	0.27 ± 0.01

* Commercial yellow pea (unknown cultivar). **U One unit (U) is the amount of DAO catalyzing the oxidation of 1 μmol of putrescine/min. The values were obtained starting from 20 g of frozen seedlings. Data represent the results of three replicates (n=3) and are expressed as means ± SDs.

3.4.2 vDAO activity during germination of CDC Amarillo seedlings

CDC Amarillo was selected to continue the investigation on DAO quantitation instead of *L. sativus* (grass pea), because of the known presence of β-ODAP in grass pea (Buta *et al.*, 2019; Shinomol et Muralidhara, 2007). The DAO enzyme activity and specific activity in seedlings of CDC Amarillo increased over the course of 8 germination days, going from 0.44 U/mL and 0.19 U/mg on the 4th day, to 1.08 U/mL and 0.81 U/mg on the 8th day. Beyond the 8th day, the vDAO activity was seen to decrease until it reached 0.66 U/mL and 0.47 U/mg on the 10th day of germination (Table 3.2).

Tableau 3.2 Effect of germination time on DAO activity in CDC Amarillo seedlings.

DAYS	vDAO activity (U/mL)	Total volume (mL)	vDAO total activity (U)	Protein concentration (mg/mL)	vDAO specific activity (U/mg protein)
1	*NA	NA	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA	NA
4	0.44 ± 0.02	4.1	1.80 ± 0.08	2.37 ± 0.18	0.19 ± 0.01
5	0.59 ± 0.05	7	4.13 ± 0.35	2.74 ± 0.18	0.22 ± 0.02
6	0.68 ± 0.08	7	4.76 ± 0.56	1.29 ± 0.11	0.53 ± 0.02
7	0.84 ± 0.11	20	16.82 ± 2.2	1.39 ± 0.01	0.61 ± 0.07
8	1.08 ± 0.06	29	31.32 ± 1.74	1.34 ± 0.25	0.83 ± 0.18
9	0.91 ± 0.02	32	29.12 ± 0.64	1.52 ± 0.16	0.53 ± 0.04
10	0.66 ± 0.04	17	11.22 ± 0.68	1.41 ± 0.01	0.47 ± 0.02

*NA means non-applicable because the seedlings are only harvested after the fourth day of germination (no shoots were available for extraction in the first 3 days). Data represent the results of three replicates (n=3) and are expressed as means \pm SDs. The volumes are different because the quantity of seedlings harvested was not the same each day of extraction.

3.4.3 vDAO activity in seedlings organs

The distribution of vDAO activity in different organs of CDC Amarillo seedlings is summarized in Table 3.3. The vDAO specific activity in the shoots was 10- and 5- fold greater than in cotyledons and roots, respectively, in 5-day-old seedlings.

Tableau 3.3 vDAO activity in different organs of pea variety CDC Amarillo after 5 days of germination.

CDC Amarillo	vDAO activity (U/mL)	Volume (mL)	vDAO total activity(U)	Protein concentration (mg/mL)	vDAO specific activity (U/mg protein)
Cotyledons	0.44 \pm 0.04	5	2.22 \pm 0.24	13.54 \pm 0.38	0.03 \pm 0.01
Roots	0.12 \pm 0.006	5	0.59 \pm 0.01	1.78 \pm 0.23	0.06 \pm 0.01
Shoots	0.84 \pm 0.05	5	4.21 \pm 0.22	2.74 \pm 0.09	0.30 \pm 0.03

Data from three replicates (n=3) are expressed as means \pm SDs. The germination time was limited to 5 days because after this period the cotyledon reserves were nearly depleted.

As mentioned, the enzymatic activity of vDAO in *L. sativus* extracts was the highest among all varieties analysed. However, due to the potential problems related to the presence of the neurotoxin β -ODAP in *L. sativus*, we developed a method that can quantify β -ODAP with a high specificity and sensitivity in seedling extracts.

3.5 LC-MRM method development and β -ODAP in seedling extracts

LC-MRM was used for the detection and quantitation of β -ODAP without the need for sample derivatization. Glycyl-L-aspartic acid was chosen as an appropriate internal standard (IS) to correct for losses that may occur during sample preparation and analysis, for more precise quantitation. This IS was chosen because of its physicochemical properties close to β -ODAP.

A Thermo Scientific™ Acclaim™ Organic Acid LC column (150 x 2.1 mm, 3 μ m) was used for the separation of β -ODAP, because of its ability to retain organic acids and the fact that the IS co-

eluted under the conditions chosen, for better correction of matrix effects. Three MRM transitions were chosen for the detection of β -ODAP to ensure specificity of detection in real samples. A calibration curve between 0.5 and 50 μ M was employed to quantify β -ODAP in extracts, which were diluted appropriately to fall into the dynamic range of the method.

The LC-MRM method was developed to detect the two co-eluting compounds with good peak shape as seen for a standard mix in the absence of matrix background in Figure 1a. The analysis of raw Yellow pea and *L. sativus* extracts following a simple protein precipitation step yielded inconclusive results, because of the presence of multiple peaks at 1.99 min and 2.3 min with peak tailing (Figure 3.1b). The irregular shape of the β -ODAP peak was likely due to the presence of remaining high salt concentrations in the injected sample. To facilitate detection and improve the peak shape of β -ODAP, while lessening ion suppression from high salt content in samples, a mixed anion exchange (MAX) solid phase extraction step was added following protein precipitation. This protocol yielded satisfactory results, since a single β -ODAP peak with perfect co-elution with the IS signal as well increased sensitivity (Figure 3.1c).

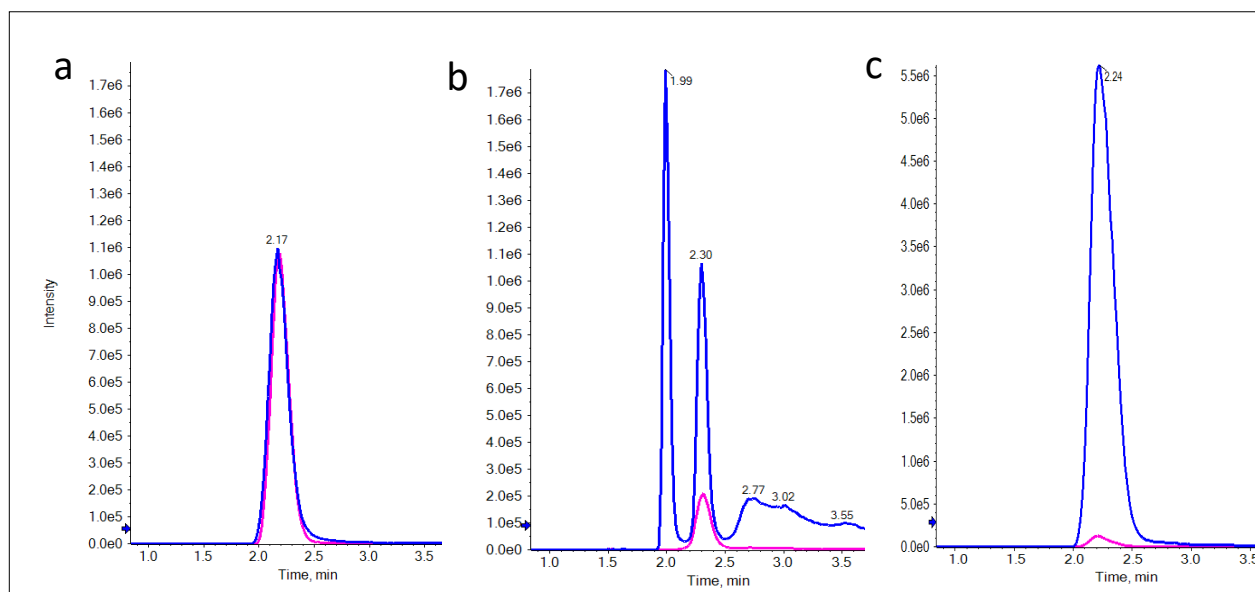


Figure 3.1 LC-MRM chromatograms of β -ODAP in blue (m/z 177.0 \rightarrow 116.0) and internal standard Gly-Asp in pink (m/z 191.0 \rightarrow 116.0) for a standard mix of 12.5 μ M each in 10% acetonitrile (ACN) (a), and in *L. sativus* raw extract spiked with Gly-Asp following protein precipitation with acetonitrile only (b). By incorporating an extra MAX-SPE step during clean-up of *L. sativus* raw extract (c), peak shape is re-established for β -ODAP and a clear co-elution of analyte and IS peaks is seen.

3.5.1 β -ODAP content Quantitation in DAO Extracts

The quantitation of β -ODAP in crude extracts of *L. sativus*, CDC Amarillo and Yellow pea of an unknown cultivar (purchased from the supermarket) was assessed. The method was validated using an external calibration curve from 0.5 to 50 $\mu\text{mol/L}$ of β -ODAP in 0.1% BSA with the same sample preparation procedure as that used for the samples. Quality control samples (QCs) at three concentration levels were also prepared and extracted in the same manner.

Figure 3.2 shows the calibration curve and accuracy data for the standards and QCs analysed with the sample extracts, which were all within the acceptance of a validated quantitative assay.

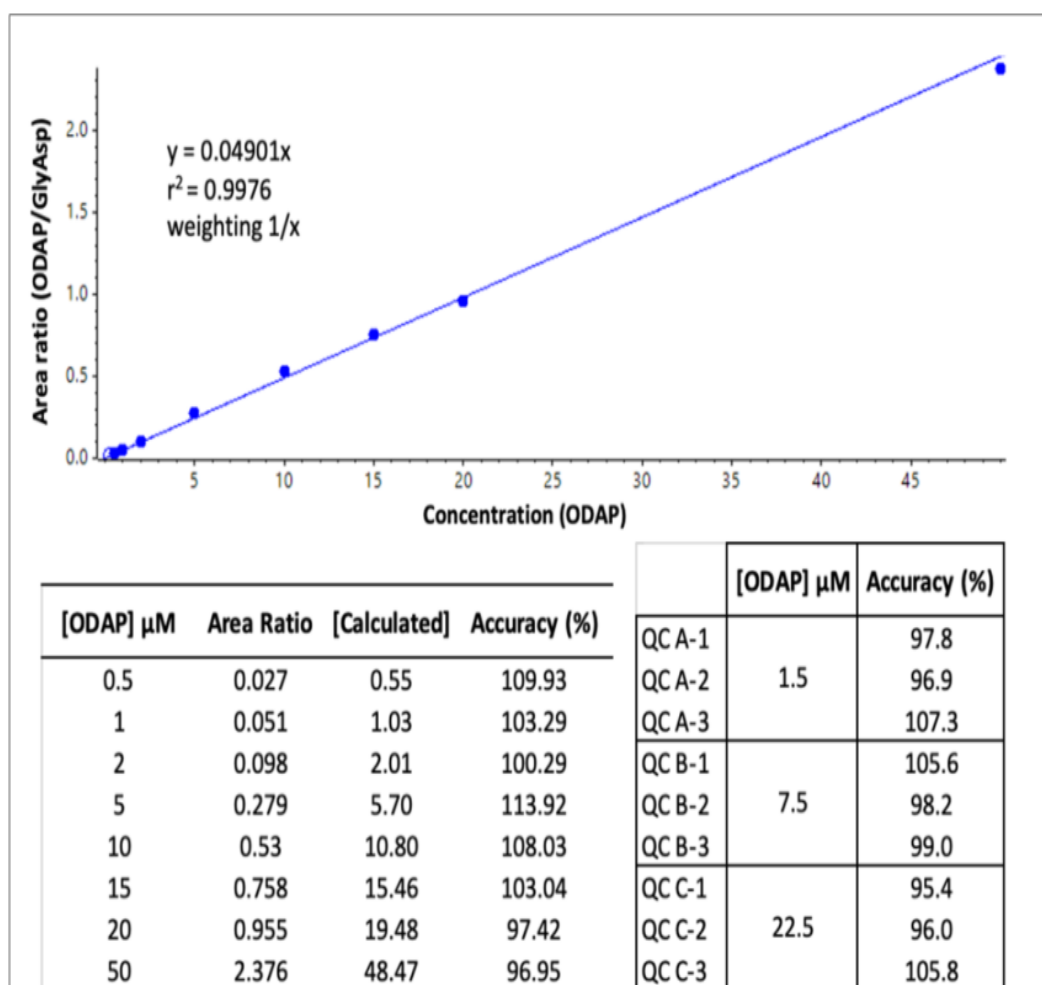


Figure 3.2 β -ODAP calibration curve, using the area ratio of ODAP/Gly-Asp LC-MRM peaks, as well as accuracy data for each calibration standard and triplicate QC samples at three concentration levels.

Figure 3.3 shows representative chromatograms of a calibration standard at 10 μM $\beta\text{-ODAP}$, as well as *L. sativus* crude extract before and after dialysis.

The $\beta\text{-ODAP}$ peak was significantly reduced after dialysis, considering the sample dilution (200-fold) for the raw extract prior to extraction to ensure the sample would fall into the dynamic range of the calibration curve. In Table 3.4, the $\beta\text{-ODAP}$ concentration measured in DAO extracts is shown. *L. sativus* raw extract had on average 7.65 $\mu\text{mol ODAP/mg protein}$, and dialysis was shown to reduce this level substantially to 0.18 $\mu\text{mol ODAP/mg protein}$, whereas the $\beta\text{-ODAP}$ concentrations measured in crude CDC Amarillo and in yellow pea extracts were approximately 5000 times lower (Table 3.4).

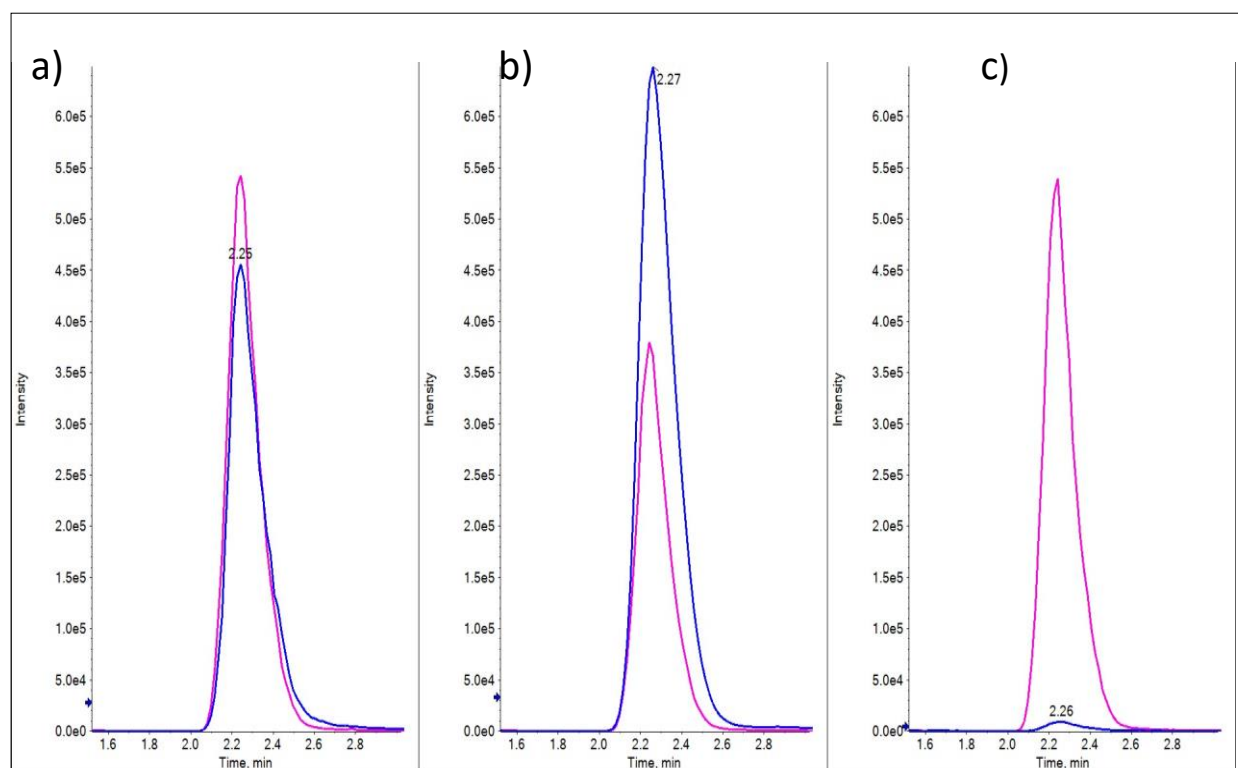


Figure 3.3 Representative LC-MRM chromatograms of $\beta\text{-ODAP}$ (blue) and of Gly-Asp (pink) in a calibration standard at 10 μM $\beta\text{-ODAP}$ in 0.1% BSA (a), *L. sativus* crude extract (diluted 200-fold) (b) and dialysed extracts (diluted 10-fold) (c).

Tableau 3.4 β -ODAP concentrations found in *L. sativus*, CDC Amarillo and Yellow pea crude extracts, before and after dialysis. An external calibration curve of β -ODAP was used for quantitation, using Gly-Asp as internal standard.

Samples	Protein content ($\mu\text{g/mL}$)	[β -ODAP] ($\mu\text{mol/L}$)	[β -ODAP] ($\mu\text{mol/mg Protein}$)
<i>L. sativus</i> crude extract	600 \pm 120	4722 \pm 2116	7.65 \pm 2.02
<i>L. sativus</i> dialysed crude extract	876 \pm 219	158 \pm 35	0.18 \pm 0.02
CDC Amarillo crude extract	624 \pm 115	0.99 \pm 0.03	0.0016 \pm 0.0003
*Yellow pea crude extract	615 \pm 181	0.58 \pm 0.16	0.0011 \pm 0.0006

* Commercial yellow pea (unknown cultivar). Data represent results of three replicates (n = 3) and are expressed as mean \pm SD

3.6 Discussion

The objective of this research was to evaluate the enzyme activity of vDAO during the germination of seeds from different legumes, i.e., *Lathyrus sativus* (grass pea) and *Pisum sativum* (pea). A selective and sensitive method was also developed to measure the concentration of the neurotoxin β -N-Oxalyl-L- α,β -diaminopropionic acid (β -ODAP) in the crude extracts obtained from their sprouts. In the evaluation of vDAO enzymatic activity (Table 3.1) from seedling extracts, it was revealed that vDAO is most active in *L. sativus*, followed by the pea cultivar CDC Amarillo. During the first 10 days of germination of CDC Amarillo seedlings (Tables 3.2), the vDAO enzyme activity and its specific activity were higher on the 8th (1.08 U/mL and 0.81 U/mg protein) of germination, after which they decreased from 9th day until they reached 0.66 U/mL and 0.47 U/mg protein on the 10th day of germination. comparable with previous work by Luhova et al. (Luhova *et al.*, 2000) showing that *P. sativum* seedlings that germinated for 6 to 8 days contained more DAO than those that were allowed to grow for a longer period. In addition, the germination conditions in the dark may have led to an increase in vDAO activity over time. When plants undergo stress, such as that induced by growing in etiolated conditions, the amount of polyamine rises, leading to an increase in vDAO activity (Xing *et al.*, 2007). During germination, vDAO activity was higher in lentils (*Lens culinaris Medicus*) and peas (*Pisum sativum*) in etiolated seedlings than in light-grown ones (Federico et Angelini, 1988).

In CDC Amarillo, vDAO enzyme activity was measured in different organs (roots, seeds, and shoots) of 5-day-old seedlings (Table 3.3). Both vDAO enzyme activity and specific activity were higher in shoots than in other organs. More precisely, the vDAO specific activity was found to be 10 and 5 times higher in shoots than in cotyledons and roots, respectively, whereas it was undetectable in seeds during the first 3 days of germination. Similar results were found in germinated fava beans (*Vicia faba L.*), where the DAO activity in shoots was significantly higher than that in seeds, radicles, cotyledons, and hypocotyls (Yang *et al.*, 2011).

Another equally important objective of this study was to ensure that the chosen source of vDAO is safe and without health risk. There are several analytical methods in the

literature (including colorimetric methods, gas chromatography-mass spectrometry, capillary zone electrophoresis, and flow injection analysis for the detection of β -ODAP in samples of *L. sativus*. However, they can be time-consuming, with some requiring derivatization of the sample and being less effective for quantitation (Tarade *et al.*, 2007). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the most suitable analytical method, being the most selective and reliable (Ghosh *et al.*, 2015). For better sensitivity and selectivity of β -ODAP detection, sample preparation was optimized using raw extracts. A protein precipitation step followed by solid-phase extraction reduced matrix effects and improved peak shape, allowing much better detection (He et Blaney, 2015) through the removal of excess salts and proteins present in crude extracts. The results (Figure 1b) show poor peak resolution with the presence of peak tailing as well as signal suppression. However, Figure 1c underlines the effectiveness of the precipitation of acetonitrile coupled with SPE clean-up to improve the resolution peak shape and signal of β -ODAP.

Vegetal DAO has been proposed for oral administration via monolithic tablets to ensure preservation of enzymatic activity in simulated gastric fluids (Calinescu *et al.*, 2012). Based on our results, the vDAO enzymatic activity in *L. sativus* was the highest among all varieties of legumes analysed. Because a previous study in the literature has mentioned the possible presence of β -ODAP in *L. sativus*, which is implicated in neuroleptism (Del Cura et Huertas, 200), our objective was to ensure the utilization of a source of vDAO that is considered as GRAS (generally recognized as safe) and not subject to pharmacovigilance limitations. The results of β -ODAP quantitation (Figure 3.2 and Table 3.4) show that it is present in a relatively high concentration in the crude extract of *L. sativus*, while it is 5000-fold less concentrated in the crude extract of CDC Amarillo. Since vDAO was suggested to be administered as monolithic tablets, a sample of freeze-dried *L. sativus* was also analysed with undetectable levels (data not shown). The freeze-drying process at low pressure (Lim *et al.*, 2016; Pieters *et al.*, 2012), and dialysis involved in the preparation of the powdered sample reduced the quantity of β -ODAP. The toxicity level of β -ODAP detected in the crude extract of *L. sativus* was estimated according to data in the literature.

In one study, neonatal and young mice that were injected intraperitoneally with high doses of β -ODAP (225–1350 mg/kg body) or via gavage (3900 mg/kg) developed seizures and opisthotonus (Mehta *et al.*, 1979).

Other in vivo studies showed mice exhibited signs of neurotoxicity 2–4 weeks after being given 300 mg/kg body/day of synthetic β -ODAP (Yan *et al.*, 2006). A level of ODAP in a legume cultivar below 0.2 % (w/w seeds) is considered to be safe for human consumption (Dahiya, 1976). Based on these data, theoretically, the threshold of β -ODAP considered safe for consumption is 0.3 g of β -ODAP /kg body/day . Since vDAO tablets are intended for humans and considering the average 8 of 12 human adult weight is 80 kg, the safety threshold for β -ODAP is estimated at 24 g/day for 2-4 weeks. Considering the content of β -ODAP in *L. sativus* of 0.5–2.5 % (Medda *et al.*, 1995), The estimated toxic of *L. sativus* would be 960 g/day. Based on a 500 mg tablet containing vDAO at 20–60 % weight, β -ODAP should not be present in quantities over 2.5-7.5 mg/tablet.

Supposing an administration of 3 tablets/day, the estimated amount of ODAP may be 7.5 to 22.5 mg/day, which is much lower than the daily limit of toxicity. Practically, a volume of 15 mL of extract of vDAO generates 1 g of powder after freeze drying. The mass of β -ODAP equivalent to the concentration of 4722 μ mol/L before the dialysis is about 0.011 g. Even without dialysis and considering a consumption of 3 tablets /day, this amount is much lower than the 24 g/day of β -ODAP (or 960 g/day of *L. sativus*), which is suggested to be toxic for humans. In contrast to *L. sativus*, the two pea varieties tested were essentially free of β -ODAP, providing a safe and convenient source of vDAO.

3.7 Materials and Methods

3.7.1 Materials

Lathyrus sativus seeds (chickling vetch, variety unknown) were kindly provided by Cover Crop Canada. *Pisum sativum* seeds: CDC Amarillo, CDC Meadow, CDC Limerick, CDC Inca and CDC Dakota were generously provided by CDC (Crop Development Centre), University of Saskatchewan, Commercial yellow pea (unknown cultivar) , Bovine Serum Albumin (BSA), horseradish peroxidase (HRP, Type I, 96 U/mg solid), putrescine (1,4-diaminobutane dihydrochloride), 4-amino-antipyrine (AAP), 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate sodium (DCHBS), β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid (β -ODAP), and glycyl-L-aspartic acid (Gly-Asp), membranes of cellulose (12-14 kDa cut-off) were purchased from Sigma–Aldrich (St-Louis, MO, USA).

Bradford reagent and the acrylamide/bis-acrylamide solution (29:1) were from Bio- Rad Laboratory (Mississauga, Ontario, Canada). All other chemicals were Reagent Grade and were used without further purification.

3.7.2 Germination of seeds

The pea and grass pea seeds were sterilized using 10% (v:v) of sodium hypochlorite for 20 min, then washed and imbibed in distilled water at room temperature in the dark for 16-20 hours. The soaked seeds were placed in a germination chamber and germination was carried out in trays (54 cm length X 27 cm width containing two bins 24 cm length X 24 cm in width) cleaned and disinfected beforehand with bleach and then covered by a plastic cover with holes. The germination conditions were as follows: temperature 25 °C, relative humidity 80%, in the dark. A culture solution or running water was given every 12 hours for seed germination until obtaining seedlings about 9 to 12 cm in length. After 8 days of germination, the seedlings were collected and washed with distilled water, then stored at -80 °C prior to measuring vDAO activity, protein, and β -ODAP content.

3.7.3 vDAO extraction

Frozen seedlings were ground with a blender until obtention of small uniform pieces (a few millimetres in size) and then mixed under stirring at a ratio of 1:2 (mass/volume) with 50 mM sodium phosphate buffer containing 200 mM of NaCl pH 5.5. After 30 min, the mix was filtered and then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatants were stored at -20 °C for further analyses.

3.7.4 Spectrometric assay of vDAO activity

Measurement of H₂O₂ formation was conducted by the DCHBS- AAP-HRP method using putrescine as a substrate (Pietrangeli *et al.*, 2012). The vDAO activity was determined using reaction solutions (1.6 mL) containing: 1 mL sodium phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4), 30 μ L putrescine 100 mM, 10 μ L 4- aminoantipyrine 100 mM, 10 μ L 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid 100 mM, 10 μ L horseradish peroxidase 1 mg/mL. The reaction was initiated by adding 50-100 μ L crude enzyme extracts.

The absorbance at 515 nm was read on a PerkinElmer LS45 fluorimeter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). vDAO activity was measured in 8 days old seedlings.

3.7.5 Dialysis of raw extracts

The supernatant obtained after the vDAO extraction was dialysed overnight using membranes of cellulose (12-14 kDa cut-off) under shaking in a beaker against distilled water. Prior to dialysis, the membranes were treated by adding 0.3 % (w/v) of sodium sulfide at 80 °C for 1 min then washed with hot water (60 °C) for 2 min, followed by acidification with 0.2 % (v/v) sulfuric acid, then rinsed with hot water to remove the acid. The distilled water was changed 3 times.

3.7.6 Protein content

The protein content of all analysed samples was measured by the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as the calibration standard.

3.7.7 Preparation of standards

Standard stock solutions of β -ODAP and Gly-Asp at 10 mM concentrations were prepared in 10% ACN and 10 % ACN, 0.1 % ammonium hydroxide, respectively. All subsequent standard dilutions were prepared in 10 % ACN. A standard calibration curve of β -ODAP was constructed using the following concentrations: 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, and 50 μ M in 0.1 % BSA.

3.7.8 Sample preparation for β -ODAP analysis

Initial method testing was done with 250 μ L of raw *L. sativus* and *P. sativum* extracts with internal standard Gly-Asp added at 25 μ M and then acetonitrile precipitated with 3 volumes of ice-cold ACN for 10 min at -30 °C, then centrifuged at 14000 rpm for 10 min at 4 °C. Supernatants (750 μ L) were transferred to new tubes and dried in a Speedvac universal vacuum system (ThermoFisher Scientific, Asheville, NC). Samples were reconstituted in 100 μ L of 10 % acetonitrile. A mixture of β -ODAP and Gly-Asp were also prepared at 12.5 μ M for LC-MRM analysis to compare with sample results. All the samples : raw extract and dialysed *Pisum sativum*, raw extract, dialysed and freeze-dried (dissolved in water at 5 mg/mL) *Lathyrus sativus*, raw extract and dialysed CDC Amarillo were diluted 2-fold in water except for the raw *L. sativus* sample, which was diluted 200-fold.

A sample volume of 200 μL was taken from both the diluted samples and standards curve solutions and mixed with 50 μL of 100 μM Gly-Asp internal standard. Samples and standards were precipitated with 3 volumes of ice-cold ACN as described above. After drying the supernatants, samples and standards were reconstituted in 1 mL of 0.1 % ammonium hydroxide. Sample clean-up was performed by SPE using Oasis MAX 1 cc, 30 μm vacuum cartridges (Waters Limited, Mississauga, ON) with 30 mg sorbent. Each cartridge was conditioned with methanol, then water, before loading the samples. Cartridges were washed with 1 ml of 0.1% ammonium hydroxide and then 500 μL of water. Samples were eluted with 5% formic acid in methanol in two steps of 500 μL . Elutions were dried in a Speedvac then reconstituted in 200 μL of 10 % ACN for analysis.

3.7.9 LC-MRM analysis

Samples and standards (5 μL) were analysed on a QTRAP 5500 mass spectrometer (Sciex, Concord, ON) coupled to a Nexera UHPLC (Shimadzu, Columbia, MD) equipped with a Thermo Acclaim Organic Acid C18 column (2.1 x 150 mm, 3 μm) with mobile phases of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1 % formic acid, at 40 $^{\circ}\text{C}$ and a flow rate of 0.2 mL/min. The elution gradient used was as follows: 3 % B held for 1 min, then increased linearly to 25 % B at 5 min, up to 90 % B at 5.5 min. MRM experiments were performed in positive electrospray ionization (ESI) mode with the following source parameters: ion spray voltage, 5000 V; temperature, 500 $^{\circ}\text{C}$; nebulizer and drying gases (GS1 and GS2), 50 psi; and curtain gas, 35 psi; declustering potential, 80 V. Quantitation was performed using the MRM transitions m/z 177.0 \rightarrow 116.0 (analyte β -ODAP) and m/z 191.0 \rightarrow 116.0 (IS Gly-Asp) with collision energies of 13 and 25 V respectively and dwell times of 150 ms.

3.7.10 Data analysis

Data were analysed using PeakView v2.2 and MultiQuant v3.0.2 for quantitation (Sciex, Framingham, MA).

3.8 Conclusions

This study demonstrated that *Pisum sativum* cultivars are an interesting source for vDAO extraction. Of the five *P. sativum* cultivars evaluated, CDC Amarillo had the greatest vDAO concentration. It is important to note that CDC Amarillo was developed at the University of Saskatchewan, and has strong agronomic performance, good fungal disease resistance, high grain yield, high seed protein concentration, and is widely grown in western Canada (Warkentin *et al.*, 2017; Warkentin *et al.*, 2014; Warkentin *et al.*, 2007), i.e., CDC Amarillo production is widely available for vDAO extraction. *L. sativus* (grass pea) was the source containing the most active vDAO tested.

A simple and reliable procedure was described to evaluate the concentration of the neurotoxin β -ODAP in crude extracts. Since both genotype and environmental conditions (Dahiya et Jeswani, 1975) can modify the content of β -ODAP in grass pea seeds, it is important to have a convenient method as LC-MS to detect this compound. Overall, it was shown that seedlings of *L. sativus* and *P. sativum* can be used as vegetal sources of vDAO that is safe for humans when administered in oral formulations to treat food histaminosis and to prevent histamine related dysfunctions.

Funding: This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to MAM (grant number 06919) and by the Courtois Foundation. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results

Acknowledgments: Authors kindly thank Cover Crop Canada and Crop Development Center that provided various seeds and cultivars for this study. The financial support of Foundation Courtois is gratefully acknowledged.

Abbreviations: 4-Aminoantipyrine (AAP); Acetonitrile (ACN); Bovine serum albumin (BSA); β -N-Oxalyl-L- α,β -diaminopropionic acid (β -ODAP); Crop Development Centre (CDC); Diamine oxidase (DAO); 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzoic acid (DCHBS); electrospray ionization (ESI); Formic acid (FA); Glycyl-Aspartate (Gly-Asp). Histamine intolerance (HIT); Horseradish Peroxidase (HRP); Internal standard (IS); Mixed-Mode Anion-eXchange (MAX); Multiple reaction monitoring (MRM); Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC/MS); *Lathyrus sativus* (*L. sativus*); *Pisum sativum* (*P. sativum*); Solid Phase Extraction (SPE); Vegetal diamine oxidase (vDAO).

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours des dernières décennies, il a été démontré que l'amine oxydase contenant du cuivre (Cu-AO) d'origine végétale : la diamine oxydase (DAO) présente des effets bénéfiques dans des modèles animaux *in vivo* et *ex vivo* sur des conditions inflammatoires ou allergiques, y compris les réactions de type asthmatique (Bani *et al.*, 1997) et les lésions d'ischémie-reperfusion cardiaque (Masini *et al.*, 2003) ou intestinale (Masini *et al.*, 2007) liés à l'excès d'histamine. Au même titre que les antihistaminiques et la DAO d'origine animale, la diamine oxydase végétale (DAOv) a fait ses preuves dans l'atténuation des dysfonctions entériques induites par l'histamine. Néanmoins, on pense que la DAOv extraite à partir des légumineuses a une meilleure acceptabilité et elle est plus sûre en termes d'effets secondaires, tout en présentant une activité spécifique ainsi qu'une affinité plus élevée que le DAO d'origine animale disponible sur le marché (Comas-Basté *et al.*, 2019; Neree *et al.*, 2020). La DAOv (EC 1.4.3.22) se présente comme une enzyme glycoprotéique, composée de deux sous unités identiques ; chaque unité contient un ion de cuivre et un cofacteur redox topaquinone qui sont fondamentaux pour la fonction de désamination oxydative de la DAO (Matsuzaki *et al.*, 1994; Mu *et al.*, 1992).

L'objectif global de cette étude était de proposer la DAOv comme approche thérapeutique la plus efficace et la plus active possible administrée par voie orale pour atténuer les dysfonctionnements liés à l'histamine en particulier les dysfonctions entériques. Une grande quantité de la DAOv est extraite principalement à partir des pousses étiolées des légumineuses de : *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*, et *Lathyrus sativus* (Masini *et al.*, 2007), en particulier, des homogénats bruts des pousses de *L. sativus* (Padiglia *et al.*, 1991). En revanche, l'une des limitations de ce projet était la présence d'une neurotoxine dans les graines de *L. sativus* appelée acide β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionique (β -ODAP) (Barrow *et al.*, 1974). Dans ce contexte, l'un des objectifs de ce projet était d'explorer l'activité enzymatique de la DAO dans les pousses de *P. sativum* et *L. sativus* après avoir optimisé les conditions de germination adéquates au bon développement des plantules.

Pour cette étude, des cultivars de *P. sativum* développés au Canada ont été sélectionnés. Ces derniers sont issus d'un croisement entre d'autres pedigrees portant des caractéristiques bien définies comme leur résistance aux champignons et leur teneur élevée en protéine (Warkentin *et al.*, 2017; Warkentin *et al.*, 2014; Warkentin *et al.*, 2007). Le dosage de l'activité enzymatique de la DAO (Tableau 3.1, Annexe B) a montré que la DAO est plus active dans *L. sativus* suivie du cultivar de CDC. Amarillo. Ces résultats ont permis d'identifier une nouvelle variété de *P. sativum* en étant une variété aussi intéressante que *L. sativus* pour extraire la DAO.

Tenant compte de la présence de (β -ODAP) dans les graines de *L. sativus*, la variété CDC Amarillo a été sélectionnée pour le reste de l'étude. Durant les premiers 7 à 9 jours de germination, une graine germée donne naissance à une plantule appelée également pousse. Le dosage de l'activité de la DAO extraite à partir des pousses de CDC Amarillo (Tableau 3.2) a montré que l'activité spécifique de la DAO était plus élevée au 8^{ème} jour (0.81 U/mg protéine) de germination puis elle a baissé à partir du 9^{ème} jour, en descendant jusqu'à 0.47 U/mg protéine au 10^{ème} jour de germination.

Chez la même variété de CDC Amarillo, l'activité de la DAO a été mesurée dans différents organes (racines, graines et pousses) d'une plantule de 5 jours. Il a été constaté que l'activité de la DAO dans les pousses était respectivement 10 et 5 fois plus élevée que celle dans les graines et les racines et elle était non détectable dans les graines durant les 3 premiers jours de germination (Tableau 3.3). Ces résultats montrent que la DAO se trouve principalement dans des pousses de 8 jours de germination. Ces données sont comparables avec des travaux antérieurs (Luhova *et al.*, 2003) qui ont montré que les pousses de *P. sativum* germées pendant 6 à 8 jours contenaient plus d'AO que celles germées plus longtemps.

Des expériences d'arrosage des pousses de *Fava Bean* avec CaCl_2 et CuCl_2 ont montré que l'activité spécifique de la DAO a augmenté de manière significative ($p < 0,05$) avec l'augmentation de la concentration de CuCl_2 de 0-400 μL (Yang *et al.*, 2011). Nos résultats n'ont pas montré une différence significative en termes d'activité enzymatique spécifique de la DAO chez les pousses de CDC Amarillo arrosées avec CuCl_2 et l'urée en comparant avec les pousses témoins arrosées avec de l'eau. En revanche, l'activité enzymatique de la DAO (U/mL) a été légèrement augmentée de 1,19 U/mL (témoin) à 1,56, 1,61, et 1,63 U/mL avec l'augmentation de la concentration de

CuCl₂ respectivement de 250 µM, 500 µM et 1000 µM ainsi qu'avec l'urée (1,30 U/mL) à 1000 µM (Annexe A, Figure A.1, Tableau A.1).

Par ailleurs, le pouvoir germinatif des pousses a été affecté lorsque les pousses de CDC Amarillo ont été arrosées avec ces nutriments. En effet, les pousses témoins présentaient une meilleure croissance que celles arrosées avec les nutriments (Annexe A, Figure A.2). Ce résultat est en accord avec une expérience explorant l'impact des métaux lourds sur la germination de *Pisum sativum*, qui a montré que l'arrosage avec le Cu a entraîné une forte diminution dans le pouvoir germinatif des graines suite à un dysfonctionnement dans la mobilisation des réserves (Mihoub *et al.*, 2005).

Un autre objectif aussi important de cette étude était non seulement de trouver la source la plus riche en DAO mais aussi d'être sûre et sans risque à la santé humaine. Étant donné que l'activité de la DAO était plus élevée dans les pousses de *L. sativus*, il était primordial de détecter la présence de β-ODAP dans tous nos échantillons pris en considération dans cette étude. Il existe plusieurs méthodes analytiques dans la littérature (méthodes colorimétriques, chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, électrophorèse capillaire de zone, analyse par injection de flux, etc.) permettant la détection de β-ODAP dans les échantillons de *L. sativus* ; elles peuvent toutefois être longues, certaines nécessitant la dérivation de l'échantillon et moins efficaces dans l'estimation exacte de la quantité de β-ODAP (Tarade *et al.*, 2007). Néanmoins, la technique de chromatographie liquide-spectrométrie de masse (HPLC-MS) est considérée comme la méthode analytique la plus propice à cette analyse en étant la plus simple, la plus rapide et la plus fiable (Ghosh *et al.*, 2015).

Pour une meilleure sensibilité et sélectivité de β-ODAP dans cette analyse, le processus d'extraction sur une phase solide (SPE) peut être utilisé avant l'étape de HPLC. Ce dernier, il permet de supprimer efficacement les effets de matrice sur le temps de rétention et la forme du pic ce qui permet une meilleure détection (He et Blaney, 2015). Afin d'obtenir une meilleure résolution du pic de β-ODAP lors de la séparation, l'étape de la préparation des échantillons a été optimisée en ajoutant la méthode d'extraction sur une phase solide (SPE) à l'aide des cartouches permettant d'éliminer l'excès du sel présent dans les extraits bruts de la DAO.

Les résultats de la figure 3.1 b montrent clairement une mauvaise séparation des pics des extraits bruts de *L. sativus* et *P. sativum* avec présence des épaulements. Or, la figure 3.1 c permet de mettre en évidence l'efficacité de SPE avec la précipitation d'acétonitrile dans l'amélioration de la séparation, la forme et la symétrie du pic de β -ODAP.

Les résultats de la quantification de β -ODAP (Figure 3.2 et tableau 3.4) ont effectivement montré que β -ODAP est présent en plus grande quantité dans l'extrait brut de *L. sativus* (4722 $\mu\text{mol/L}$) en comparant avec les extraits bruts de CDC Amarillo et de pois jaune commercial qui contenaient 0.99 $\mu\text{mol/L}$ et 0.58 $\mu\text{mol/L}$. En revanche, la quantité de β -ODAP a baissé de 4722 $\mu\text{mol/L}$ à 158 $\mu\text{mol/L}$ après une dialyse durant une nuit contre l'eau. Étant donné que la DAO sera administrée sous forme des comprimés monolithiques, un échantillon de DAO lyophilisé a été également analysé. Fait intéressant, la poudre de la DAO contenait une quantité négligeable de β -ODAP qui est de moins de 0.5 $\mu\text{mol/L}$ tout comme l'extrait brut de CDC Amarillo (data not shown). Ceci peut être expliqué par le fait que le processus de lyophilisation a permis de réduire la quantité de β -ODAP de même que la dialyse. La lyophilisation se déroule à basse pression accompagnée d'une sublimation de l'eau (Lim *et al.*, 2016 ; Pieters *et al.*, 2012) ce qui peut entraîner une diminution dans la teneur en β -ODAP.

La toxicité de la quantité de β -ODAP détectée dans l'extrait brut de *L. sativus* a été estimée avec des données de la littérature. Le niveau d'ODAP dans un cultivar inférieur à 0,2% est considéré comme sans danger pour la consommation humaine (Dahiya, 1976). Des expériences *in vivo* sur des souris nouveau-nées injectées par voie intrapéritonéale avec de fortes doses de β -ODAP (225-1350 mg/kg corps) ou par gavage (3900 mg/kg) ont développé des convulsions et un opisthotonus (Mehta *et al.*, 1979). D'autres études *in vivo* ont montré des signes de neurotoxicité après 2 à 4 semaines après administration exclusive de 300 mg/kg/jour de β -ODAP synthétique (Yan *et al.*, 2006). Sur la base de ces données, théoriquement, le seuil de β -ODAP considéré comme sûr à la consommation est de 0,3 g de β -ODAP/kg/jour.

Étant donné que les comprimés DAO sont destinés à l'humain et le poids moyen d'un adulte humain est de 80 kg ; le seuil de sécurité pour le β -ODAP est estimé à 24 g/jour pendant 2 à 4 semaines. En tenant compte d'une teneur en β -ODAP dans *L. sativus* est évaluée entre 0,5 et 2,5 % (Luhova *et al.*, 2003), la quantité estimée de *L. sativus* considérée comme toxique est de 960 g/jour.

Considérant un comprimé de 500 mg contenant du vDAO dans une proportion de 20 à 60 %, la teneur en β -ODAP devrait être d'environ 2,5 à 7,5 mg/comprimé. En supposant une administration de 3 comprimés/jour, la quantité estimée d'ODAP peut être de 7,5 à 22,5 mg/jour ce qui est bien inférieure à 960 g/jour de *L. sativus* estimés théoriquement sans danger pour la consommation humaine.

Pratiquement, un volume de 15 mL d'extrait de vDAO génère 1 g de poudre après lyophilisation. La masse de β -ODAP équivalente à la concentration de 4722 $\mu\text{mol/L}$ avant la dialyse est d'environ 0,011 g. Même sans dialyse et en considérant une consommation de 3 comprimés/jour ; cette quantité est bien inférieure à la quantité de 24 g/jour de β -ODAP estimée comme toxique pour l'homme. La concentration déterminée de β -ODAP dans l'extrait de 15 mL de *L. sativus* après dialyse était d'environ 158 $\mu\text{mol/L}$ ce qui peut correspondre à une teneur inférieure à 9,11 $\mu\text{g/comprimé}$. Cette quantité est très inférieure à 960 g/jour de *L. sativus* estimée théoriquement pour la consommation humaine et qui peut contenir 24 g de β -ODAP (seuil de toxicité). De ce fait, les deux quantités d'extrait non dialysé (7,5 à 22,5 mg) ou dialysé (9,11 à 27,33 μg) de pousses de *L. sativus* ont généré des poudres de vDAO avec une teneur en β -ODAP beaucoup plus faible que la quantité de β -ODAP estimé comme toxique (limite de toxicité). En revanche, les échantillons de pois jaune sont totalement exempts de β -ODAP, en fournissant donc une source vDAO sûre et sans danger à la consommation humaine. Il est possible que le taux de β -ODAP estimé en dessous du seuil de toxicité dans les échantillons brut de *L. sativus* revient aux caractéristiques de ce lot ou la variété, ou bien cela est probablement dû au pré-trempage des graines dans l'eau courante durant la nuit avant la germination qui a permis de réduire le contenu de la neurotoxine. Cette suggestion est basée sur une expérience qui a montré qu'un pré-trempage dans une solution alcaline permet de diminuer la concentration de β -ODAP à 67 % et d'augmenter la concentration de α -ODAP, l'isomère non toxique de β -ODAP (Kumar *et al.*, 2011). Tous ces résultats permettent de considérer ce lot de *L. sativus* comme la source contenant le plus de DAOv avec CDC Amarillo. Bien que les résultats de LC-MS ont montré que l'extrait brut de *L. sativus* est sans danger et sûr à la consommation humaine cela n'exclue pas la potentielle toxicité de β -ODAP possiblement présente dans d'autres lots et/ou variétés de la gesse étant donné que d'autres facteurs peuvent modifier la teneur en β -ODAP tels que : le génotype et l'environnement (Dahiya et Jeswani, 1975).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, les résultats de cette étude ont suggéré que les graines de *Lathyrus sativus* et le cultivar CDC Amarillo de *Pisum sativum* peuvent être considérés comme les premières sources contenant le plus de la DAOv. La technique analytique LC-MS s'est montrée efficace dans la détection et la quantification de la neurotoxine β -ODAP. Son efficacité et sa sensibilité ont été augmentées grâce aux étapes d'extraction sur une phase solide (SPE) et la précipitation d'acétonitrile dans la préparation des échantillons.

Malgré le fait que le taux de toxicité estimé théoriquement et expérimentalement de β -ODAP dans ce lot de *L. sativus* est largement en dessous du seuil de toxicité, il serait également important de vérifier tout de même la toxicité de β -ODAP possiblement présente dans d'autres lots et/ou variétés de la gesse, étant donné que d'autres facteurs peuvent modifier la teneur en β -ODAP tels que : le génotype et l'environnement. La teneur en β -ODAP dans l'extrait brut de la DAO pouvait être modifiée suite aux processus de germination et d'extraction comme le pré-trempage qui ont permis la diminution de taux de la neurotoxine. Par ailleurs, les résultats de l'extrait de la DAOv lyophilisé et dialysé sont assez satisfaisants vu le contenu négligeable en β -ODAP.

Comme perspective, il serait intéressant de penser à utiliser des sources de *L. sativus* génétiquement modifiées contenant des taux très faibles de β -ODAP (0.007% – 0.02% de poids de graines) (Kumar *et al.*, 2011) tout en étudiant la relation possible entre la teneur en β -ODAP et l'activité enzymatique de la DAO. De plus, le taux très bas et/ou absence de β -ODAP dans l'extrait brut de CDC Amarillo permet de la considérer comme une 2^{ème} source de la DAO après *L. sativus*. En dépit des résultats non-concluants de l'arrosage de CDC Amarillo avec des nutriments, cette hypothèse reste toutefois intéressante et ouverte à des modifications qui peuvent donner de meilleurs résultats comme le changement de la concentration ou tester d'autres nutriments tels que : le CaCl_2 . Une formulation monolithique à base de DAOv extraite à partir de *Lathyrus sativus* ou de CDC Amarillo serait envisageable en vue de traiter les dysfonctions entériques liés à l'excès d'histamine.

ANNEXE A

Effets des nutriments sur le pouvoir germinatif et sur l'activité enzymatique de la DAO chez
CDC Amarillo

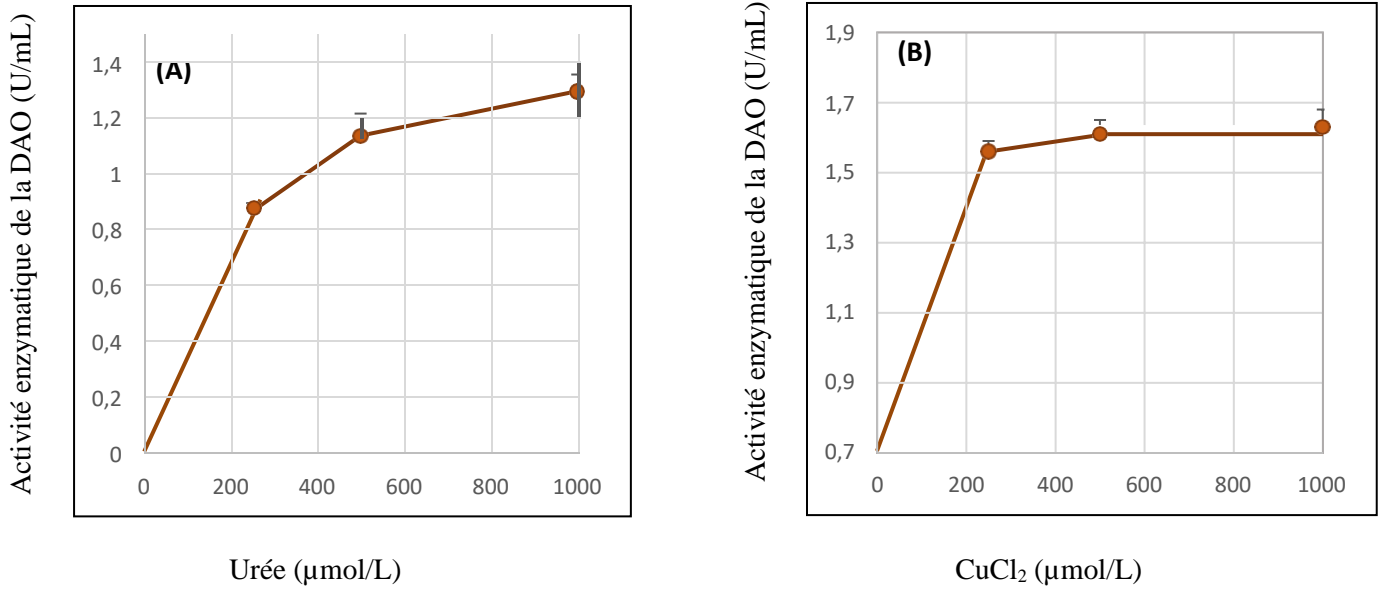


Figure A.1 Effet de l'urée (A) et de CuCl₂ (B) sur l'activité enzymatique de la DAO dans CDC Amarillo. Les valeurs sont les moyennes d'analyses en triplicata. Les barres d'erreurs montrent les écarts-types.

Tableau A.1 Tableau comparatif de l'activité enzymatique (U/mL) et activité spécifique de la DAO (U/mg protéine) des pousses de CDC Amarillo arrosées avec Eau (Témoin), CuCl₂ et l'urée à des concentrations de 250 µM, 500 µM et 1 mM.

Solutions d'arrosage	Activité de la DAO (*U/mL)	Concentration en protéine (mg/mL)	Activité spécifique de la DAO (U/mg protein)
Eau (Contrôle)	1,19 ± 0,07	1,57 ± 0,2	0.75 ± 0,04
CuCl ₂ (250 µM)	1,56 ± 0,03	2.78 ± 0,35	0.57 ± 0,08
CuCl ₂ (500 µM)	1,61 ± 0,04	2,75 ± 0,19	0,59 ± 0,05
CuCl ₂ (1 mM)	1,63 ± 0,05	2,65 ± 0,28	0,62 ± 0,06
Urée (250 µM)	0,87 ± 0,03	1,76 ± 0,18	0,47 ± 0,10
Urée (500 µM)	1,14 ± 0,08	2,13 ± 0,26	0,55 ± 0,04
Urée (1 mM)	1,3 ± 0,06	2,13 ± 0,37	0,65 ± 0,13

Les résultats sont des moyennes de trois répétitions avec ± leurs écarts-types. *U une unité est la quantité d'enzyme catalysant l'oxydation de 1 µmol de putrescine par minute.



Témoin



Urée 1 mM



CuCl₂ 1 mM



Urée 500 µM



CuCl₂ 500 µM



Urée 250 µM



CuCl₂ 250 µM

Figure A.2 Comparaison de l'effet des nutriments avec l'eau comme témoin sur le pouvoir germinatif des pousses de CDC Amarillo.

ANNEXE B

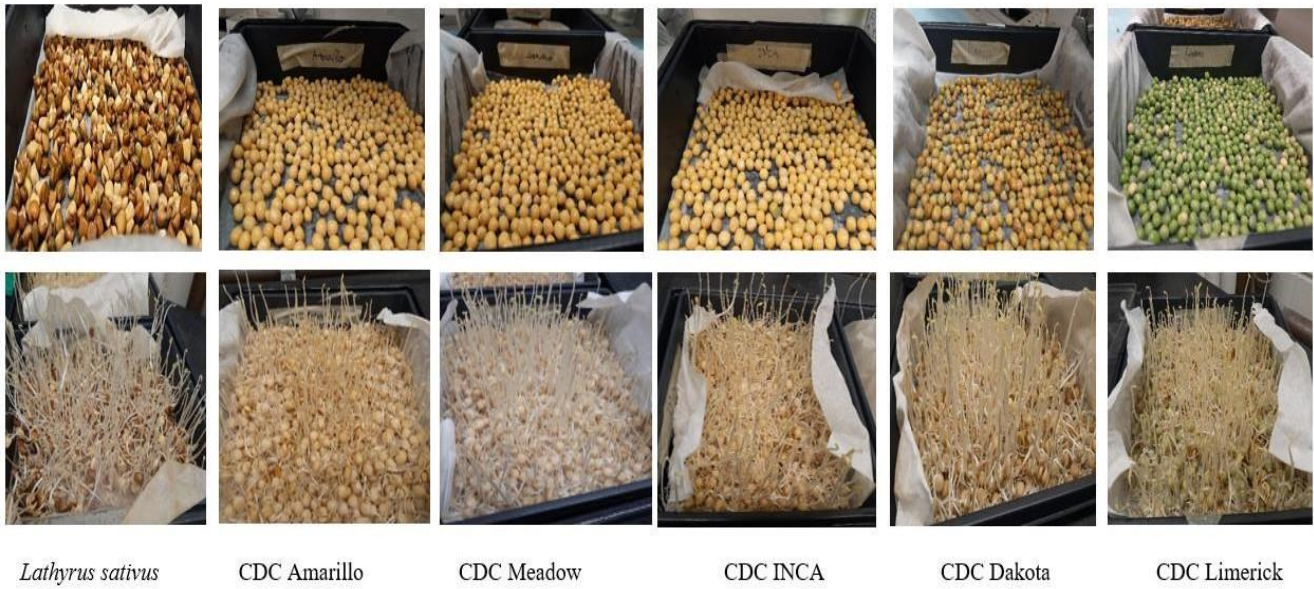


Figure B.1 Photos de germination des différents cultivars de *Pisum sativum* et de *Lathyrussativus*.

BIBLIOGRAPHIE

- Agostinelli E., Tempera G., Viceconte N., Saccoccio S., Battaglia V., Grancara S., Toninello A. et Stevanato R. (2010) Potential anticancer application of polyamine oxidation products formed by amine oxidase: a new therapeutic approach. *Amino acids*, 38, 353-368.
- Akalu G., Johansson G. et Nair B. M. (1998) Effect of processing on the content of β -N-oxalyl- α , β -diaminopropionic acid (gb-ODAP) in grass pea (*Lathyrus sativus*) seeds and flour as determined by flow injection analysis. *Food Chemistry*, 62, 233-237.
- Akdis C. A. et Blaser K. (2003) Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 15-22.
- Akdis C. A. et Simons F. E. R. (2006) Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *European journal of pharmacology*, 533, 69-76.
- Aletor V. A., El-Moneim A. A. et Goodchild A. V. (1994) Evaluation of the seeds of selected lines of three *Lathyrus* spp for β -N-oxalylamino-L-alanine (BOAA), tannins, trypsin inhibitor activity and certain in-vitro characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65, 143-151.
- Andersson K., Chen D., Mattsson H., Sundler F. et Håkanson R. (1998) Physiological significance of ECL-cell histamine. *The Yale journal of biology and medicine*, 71, 183.
- Arslan M., Oten M., ErKaymaz T., Tongur T., Kilic M., Elmasulu S. et Cinar A. (2017) β -N-oxalyl-L-2, 3-diaminopropionic acid, L-homoarginine, and asparagine contents in the seeds of different genotypes *Lathyrus sativus* L. as determined by UHPLC-MS/MS. *International journal of food properties*, 20, S108-S118.
- Aschenbach J. R., Schwelberger H. G., Ahrens F., Fürll B. et Gäbel G. (2006) Histamine inactivation in the colon of pigs in relationship to abundance of catabolic enzymes. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 41, 712-719.
- Bachrach U. (2018) Copper amine oxidases and amines as regulators of cellular processes. Dans *Structure and functions of amine oxidases*. CRC Press. Boca Raton.
- Bani D., Ballati L., Masini E., Bigazzi M. et Bani Sacchi T. (1997) Relaxin counteracts asthma-like reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pigs. *Endocrinology*, 138, 1909-1915.
- Banu Y. et Watanabe T. (1999) Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1 receptor signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 189, 673-682.
- Barrow M. V., Simpson C. F. et Miller E. J. (1974) Lathyrism: a review. *The Quarterly review of biology*, 49, 101-128.

- Baylin S. B., Stevens S. A. et Shakir K. M. (1978) Association of diamine oxidase and ornithine decarboxylase with maturing cells in rapidly proliferating epithelium. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 541, 415-419.
- Bazin T. et Lamarque D. (2018) La sécrétion acide: régulation, applications en clinique, actualités. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive*, 25, 342-352.
- Bento-Silva A., Gonçalves L., Mecha E., Pereira F., Vaz Patto M. C. et Bronze M. d. R. (2019) An Improved HILIC HPLC-MS/MS Method for the Determination of β -ODAP and Its α Isomer in *Lathyrus sativus*. *Molecules*, 24, 3043.
- Bessaguet F., de Bandt J.-P. et Desmoulière A. (2021) L'estomac. *Actualités Pharmaceutiques*, 60, 53-56.
- Best C. H. (1929) The disappearance of histamine from autolysing lung tissue. *The Journal of Physiology*, 67, 256.
- Bewley J. D. (1997) Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9, 1055.
- Borriello F., Iannone R. et Marone G. (2017) Histamine release from mast cells and basophils. *Histamine and histamine receptors in health and disease*, 241, 121-139.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Buckland K. F., Williams T. J. et Conroy D. M. (2003) Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H4 receptor. *British journal of pharmacology*, 140, 1117-1127.
- Burde R., Seifert R., Buschauerz A. et Schultz G. (1989) Histamine inhibits activation of human neutrophils and HL-60 leukemic cells via H2-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 340, 671-678.
- Buta M. B., Emire S. A., Posten C., Andrée S. et Greiner R. (2019) Reduction of β -ODAP and IP6 contents in *Lathyrus sativus* L. seed by high hydrostatic pressure. *Food Research International*, 120, 73-82.
- 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.
- Celanire S., Wijtmans M., Talaga P., Leurs R. et de Esch I. J. P. (2005) Keynote review: Histamine H3 receptor antagonists reach out for the clinic. *Drug Discovery Today*, 10, 1613-1627.

- Choudhary A. et Singh R. P. (2000) Cadmium-induced changes in diamine oxidase activity and polyamine levels in *Vigna radiata* Wilczek seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 156, 704-710.
- Clark R., Gallin J. I. et Kaplan A. P. (1975) The selective eosinophil chemotactic activity of histamine. *The Journal of experimental medicine*, 142, 1462-1476.
- Comas-Basté O., Latorre-Moratalla M. L., Sánchez-Pérez S., Veciana-Nogués M. T. et Vidal-Carou M. C. (2019) In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 7595-7602.
- Comas-Basté O., Sánchez-Pérez S., Veciana-Nogués M. T., Latorre-Moratalla M. et Vidal-Carou M. D. C. (2020) Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*, 10, 1181.
- Criado P. R., Criado R. F. J., Maruta C. W. et Machado Filho C. d. A. (2010) Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85, 195-210.
- Dahiya B. (1976) Seed morphology as an indicator of low neurotoxin in *Lathyrus sativus* L. *Qualitas Plantarum*, 25, 391-394.
- Dahiya B. S. et Jeswani L. M. (1975) Genotype x environment interaction for neurotoxic principle (BOAA) in grass-pea *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 45, 437-439.
- Dale H. H. et Laidlaw P. P. (1910) The physiological action of β -iminazolyethylamine. *The Journal of physiology*, 41, 318.
- Del Cura M. et Huertas R. (2009) Describing neurolathyrism. Physicians and the lathyrism epidemic in post-civil war Spain. *Revista de Neurologia*, 48, 265-270.
- Del Valle J. et Gantz I. (1997) Novel insights into histamine H₂receptor biology. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273, G987-G996.
- Delves P. J. et Roitt I. M. (1998) Encyclopedia of immunology. Dans. Academic Press. Cambridge, Massachusetts.
- Demoly P., Michel F. et Bousquet J. (1997) Mécanismes des tests cutanés. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 37, 843-846.
- Dimitriadou V., Rouleau A., Tuong M. D. T., Newlands G., Miller H., Luffau G., Schwartz J.-C. et Garbarg M. (1994) Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibres evidenced by histamine H₃-receptor modulation in rat lung and spleen. *Clinical science*, 87, 151-163.

- Doeun D., Davaatseren M. et Chung M. S. (2017) Biogenic amines in foods. *Food Science and Biotechnology* 26, 1463-1474.
- Dooley D. M., McGuirl M. A., Brown D. E., Turowski P. N., McIntire W. S. et Knowles P. F. (1991) A Cu (I)-semiquinone state in substrate-reduced amine oxidases. *Nature*, 349, 262-264.
- Dunford P. J., O'Donnell N., Riley J. P., Williams K. N., Karlsson L. et Thurmond R. L. (2006) The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *The Journal of immunology*, 176, 7062-7070.
- Dy M. et Lebel B. (1983) Skin allografts generate an enhanced production of histamine and histamine-producing cell-stimulating factor (HCSF) by spleen cells in response to T cell mitogens. *The Journal of Immunology*, 130, 2343-2347.
- Dy M., Lebel B., Kamoun P. et Hamburger J. (1981) Histamine production during the anti-allograft response. Demonstration of a new lymphokine enhancing histamine synthesis. *Journal of Experimental Medicine*, 153, 293-309.
- Dy M. et Schneider E. (2004) Histamine–cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine & growth factor reviews*, 15, 393-410.
- Ehrenshaft M. et Brambl R. (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiology*, 93, 295-304.
- Elmore B. O., Bollinger J. A. et Dooley D. M. (2002) Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7, 565-579.
- Emborg J. et Dalgaard P. (2006) Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *Journal of food protection*, 69, 897-906.
- Emerson M. R., Orentas D. M., Lynch S. G. et LeVine S. M. (2002) Activation of histamine H2 receptors ameliorates experimental allergic encephalomyelitis. *NeuroReport*, 13, 1407-1410.
- Ezeamuzie C. I. et Philips E. (2000) Histamine H2 receptors mediate the inhibitory effect of histamine on human eosinophil degranulation. *British journal of pharmacology*, 131, 482-488.
- Fabisiak A., Włodarczyk J., Fabisiak N., Storr M. et Fichna J. (2017) Targeting Histamine Receptors in Irritable Bowel Syndrome: A Critical Appraisal. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 23, 341-348.
- Federico R. et Angelini R. (1988) Distribution of polyamines and their related catabolic enzyme in etiolated and light-grown leguminosae seedlings. *Planta*, 173, 317-321.

- Fikre A., Korbu L., Kuo Y.-H. et Lambein F. (2008) The contents of the neuro-excitatory amino acid β -ODAP (β -N-oxalyl-L- α,β -diaminopropionic acid), and other free and protein amino acids in the seeds of different genotypes of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Food Chemistry*, 110, 422-427.
- Fincher G. B. (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Biology*, 40, 305-346.
- Floris G. et Mondovi B. (Eds.).(2009). Copper amine oxidases: structures, catalytic mechanisms and role in pathophysiology. Dans. CRC Press. Boca Raton.
- Gahl W. A. et Pitot H. C. (1978) Reversal by aminoguanidine of the inhibition of proliferation of human fibroblasts by spermidine and spermine. *Chemico-Biological Interactions*, 22, 91-98.
- Gantner F., Sakai K., Tusche M. W., Cruikshank W. W., Center D. M. et Bacon K. B. (2002) Histamine H4 and H2 receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8+ T cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 300-307.
- Gantz I., Schäffer M., DelValle J., Logsdon C., Campbell V., Uhler M. et Yamada T. (1991) Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 429-433.
- Ghosh B., Mitra J., Chakraborty S., Bhattacharyya J., Chakraborty A., Sen S. K. et Neerathilingam M. (2015) Simple detection methods for antinutritive factor β -ODAP present in *Lathyrus sativus* L. by high pressure liquid chromatography and thin layer chromatography. *Plos one*, 10, e0140649.
- Gonzaga V. E., Lescano A. G., Huamán A. A., Salmón-Mulanovich G. et Blazes D. L. (2009) Histamine levels in fish from markets in Lima, Peru. *Journal of Food Protection*, 72, 1112-1115.
- Grela E., Studzinski T. et Matras J. (2001) Antinutritional factors in seeds of *Lathyrus sativus* cultivated in Poland. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 2, 101-104.
- Halász A., Barath A., Simon-Sarkadi L. et Holzapfel W. (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5, 42-49.
- Hanbury C., Siddique K., Galwey N. et Cocks P. (1999) Genotype-environment interaction for seed yield and ODAP concentration of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. in Mediterranean-type environments. *Euphytica*, 110, 45-60.
- Hanbury C. D., White C. L., Mullan B. P. et Siddique K. H. M. (2000) A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 87, 1-27.

- He K. et Blaney L. (2015) Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 282, 96-105.
- Heap B. et Kiernan J. (1973) Histological, histochemical and pharmacological observations on mast cells in the stomach of the rat. *Journal of Anatomy*, 115, 315.
- Hernández-Jover T., Izquierdo-Pulido M., Veciana-Nogués M. T., Mariné-Font A. et Vidal-Carou M. C. (1997) Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 45, 2098-2102.
- Hesterberg R., Kusche J., Stahlknecht C. et Feussner K. (1981) The start of a programme for measuring diamine oxidase activity in biopsy specimens of human renal mucosa. *Agents and Actions*, 11, 33-37.
- Hrubisko M., Danis R., Huorka M. et Wawruch M. (2021) Histamine Intolerance—The More We Know the Less We Know. A Review. *Nutrients*, 13, 2228.
- Hungerford J. M. (2021) Histamine and Scombrottoxins. *Toxicon*, 201, 115-126.
- Jarisch R. et Wantke F. (1996) Wine and headache. *International archives of allergy and immunology*, 110, 7-12.
- Ji Y., Sakata Y., Li X., Zhang C., Yang Q., Xu M., Wollin A., Langhans W. et Tso P. (2013) Lymphatic diamine oxidase secretion stimulated by fat absorption is linked with histamine release. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304, G732-G740.
- Jiang J., Su M., Chen Y., Gao N., Jiao C., Sun Z., Li F. et Wang C. (2013) Correlation of drought resistance in grass pea (*Lathyrus sativus*) with reactive oxygen species scavenging and osmotic adjustment. *Biologia*, 68, 231-240.
- Jones B. et Kearns G. (2011) Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89, 189-197.
- Jutel M., Blaser K. et Akdis C. A. (2005) Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *International archives of allergy and immunology*, 137, 82-92.
- Jutel M., Watanabe T., Akdis M., Blaser K. et Akdis C. A. (2002) Immune regulation by histamine. *Current Opinion in Immunology*, 14, 735-740.
- Jutel M., Watanabe T., Klunker S., Akdis M., Thomet O. A., Malolepszy J., Zak-Nejmark T., Koga R., Kobayashi T., Blaser K., et al. (2001) Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*, 413, 420-425.
- Kivirand K. et Rincken T. (2007) Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 56, 164–171.

- Kjeldsen J. et De Muckadell O. S. (1993) Assessment of disease severity and activity in inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 28, 1-9.
- Klocker J., Perkmann R., Klein-Weigel P., Mörsdorf G., Drasche A., Klingler A., Fraedrich G. et Schwelberger H. G. (2004) Continuous administration of heparin in patients with deep vein thrombosis can increase plasma levels of diamine oxidase. *Vascular Pharmacology*, 40, 293-300.
- Kovacova-Hanuszkova E., Buday T., Gavliakova S. et Plevkova J. (2015) Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*, 43, 498-506.
- Kumar S., Bejiga G., Ahmed S., Nakkoul H. et Sarker A. (2011) Genetic improvement of grass pea for low neurotoxin (β -ODAP) content. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 589-600.
- Kuramasu A., Saito H., Suzuki S., Watanabe T. et Ohtsu H. (1998) Mast cell-/basophil-specific transcriptional regulation of human L-histidine decarboxylase gene by CpG methylation in the promoter region. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 31607-31614.
- Kusche J., Biegański T., Hesterberg R., Stahlknecht C.-D., Feussner K.-D., Stahlenberg I. et Lorenz W. (1980) The influence of carcinoma growth on diamine oxidase activity in human gastrointestinal tract. *Agents and Actions*, 10, 110-113.
- Kusche J., Menningen R., Leisten L. et Krakamp B. (1988) Large bowel tumor promotion by diamine oxidase inhibition: animal model and clinical aspects. Dans *Progress in Polyamine Research*. Vol 250. Springer. New York.
- La Bella V., Alexianu M., Colom L., Ionescu A., Mohamed A. et Appel S. H. (1996) Apoptosis induced by β -N-oxalylamino-L-alanine on a motoneuron hybrid cell line. *Neuroscience*, 70, 1039-1052.
- Labella V., Guarneri R. et Piccoli F. (1993) Effect of chronic oral intake of Lathyrus-sativus extract containing Beta-N-Oxaylamino-L-alanine, on 3H-glutamate binding in different areas of rat-brain *Neurodegeneration*, 2, 253-258.
- Lambein F., Haque R., Khan J. K., Kebede N. et Kuo Y.-H. (1994) From soil to brain: zinc deficiency increases the neurotoxicity of Lathyrus sativus and may affect the susceptibility for the motorneurone disease neurolathyrism. *Toxicon*, 32, 461-466.
- László V., Rothe G., Hegyesi H., Szeberényi J. B., Orsó E., Schmitz G. et Falus A. (2001) Increased histidine decarboxylase expression during in vitro monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflammation Research*, 50, 428-434.
- Lefèvre S., Astier C. et Kanny G. (2017) Intolérance à l'histamine ou fausses allergies alimentaires de mécanisme histaminique. *Revue Française d'Allergologie*, 57, 24-34.

- Leoutsakos A. et Pearce F. L. (1986) The effect of adenosine and its analogues on cyclic AMP changes and histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated by various ligands. *Biochemical pharmacology*, 35, 1373-1379.
- Leurs R., Bakker R. A., Timmerman H. et de Esch I. J. (2005) The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 4, 107-120.
- Leurs R., Hough L. B., Blandina P. et Haas H. L. (2012) Chapter 16 - Histamine. Dans *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*. Brady ST, Siegel GJ, Albers RW et Price DL, eds. Academic Press. New York.
- Lichtenstein L. M. et Gillespie E. (1975) The effects of the H1 and H2 antihistamines on "allergic" histamine release and its inhibition by histamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 192, 441-450.
- 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.
- Ling P., Ngo K., Nguyen S., Thurmond R. L., Edwards J. P., Karlsson L. et Fung-Leung W. P. (2004) Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *British journal of pharmacology*, 142, 161-171.
- Lippert U., Artuc M., Grützkau A., Babina M., Guhl S., Haase I., Blaschke V., Zachmann K., Knosalla M. et Middel P. (2004) Human skin mast cells express H2 and H4, but not H3 receptors. *Journal of investigative dermatology*, 123, 116-123.
- Luhova L., Lebeda A., Hedererová D. et Pec P. (2003) Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. *Plant Soil Environ*, 49, 151-157.
- Maccarrone M., Rossi A., Avigliano L. et Agro A. F. (1991) Activity and expression of diamine oxidase in lentil seedling under different growth conditions. *Plant Science*, 79, 51-55.
- MacGlashan D. (2003) Histamine: a mediator of inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, S53-S59.
- Maintz L., Benfadal S., Allam J.-P., Hagemann T., Fimmers R. et Novak N. (2006) Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 1106-1112.
- Maintz L. et Novak N. (2007) Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1185-1196.
- 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.

- Mander L. et Liu H.-w. (2010) *Comprehensive natural products II: chemistry and biology*. Dans Elsevier. Oxford.
- Mann R. D., Ferner R., Pearce G. L., Dunn N. et Shakir S. (2000) Sedation with “non-sedating” antihistamines: four prescription-event monitoring studies in general practice Commentary: reporting of adverse events is worth the effort. *British Medical Journal*, 320, 1184-1187.
- Marone G., Florio G., Petraroli A. et de Paulis A. (2001) Dysregulation of the IgE/Fc epsilon RI network in HIV-1 infection. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107, 22-30.
- Masini E., Bani D., Marzocca C., Mateescu M. A., Mannaioni P. F., Federico R. et Mondovì B. (2007) Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. *The Scientific World Journal*, 7, 888-902.
- Masini E., Di Bello M. G., Raspanti S., Sacchi T. B., Maggi E. et Mannaioni P. F. (1994) Platelet aggregation and histamine release by immunological stimuli. *Immunopharmacology*, 28, 19-29.
- Masini E., Fabbroni V., Giannini L., Vannacci A., Messerini L., Perna F., Cortesini C. et Cianchi F. (2005) Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage. *Inflammation Research*, 54, S80-S81.
- Masini E., Vannacci A., Giannini L., Befani O., Nistri S., Mateescu M. A., Mannaioni P. F., Mondovì B. et Federico R. (2004) Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. *European journal of pharmacology*, 502, 253-264.
- Masini E., Vannacci A., Marzocca C., Mannaioni P. F., Befani O., Federico R., Toma A. et Mondovì B. (2002) A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. *Biochemical and biophysical research communications*, 296, 840-846.
- Masini E, Pierpaoli S, Marzocca C, Mannaioni PF, Pietrangeli P, Mateescu MA, Zelli M, Federico R, Mondovì B. Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischaemia and reperfusion injury *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 309:432-439
- Maśliński C. (1975) Histamine and its metabolism in mammals part II: Catabolism of histamine and histamine liberation. *Agents and actions*, 5, 183-225.
- Máslínski C., Biegański T., Fogel W. A. et Kitler M. E. (2018) Diamine oxidase in developing tissues. Dans *Structure and Functions of Amine Oxidases*. CRC Press. Boca Raton.
- Matilla A., Garcia S. et Bueno M. (2002) Diamine oxidase activity during the germinative and post-germinative growth of the embryonic axis in chickpea seeds. *Biologia Plantarum*, 45, 551-556.
- Matsuzaki R., Fukui T., Sato H., Ozaki Y. et Tanizawa K. (1994) Generation of the topa quinone cofactor in bacterial monoamine oxidase by cupric ion-dependent autooxidation of a specific tyrosyl residue. *FEBS Letters*, 351, 360-364.

- Medda R., Padiglia A. et Floris G. (1995) Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 39, 1-9.
- Mehta T., Zarghami N. S., Parker A. J., Cusick P. K. et Haskell B. E. (1979) Neurotoxicity of orally or intraperitoneally administered L-3-oxalylamino-2-aminopropionic acid in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 48, 1-9.
- Mennigen R., Kusche J., Streffer C. et Krakamp B. (1990) Diamine oxidase activities in the large bowel mucosa of ulcerative colitis patients. *Agents and Actions*, 30, 264-266.
- Mihoub A., Chaoui A. et El Ferjani E. (2005) Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 328, 33-41.
- Milligan G., Bond R. A. et Lee M. (1995) Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends in pharmacological sciences*, 16, 10-13.
- Milovic V. (2001) Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 13, 1021-1025.
- Missbichler A., Bayer A. et Leitner R. (2012) Investigating the biochemical background for histamine intolerance: degradation capacity of mixtures of biogenic amines by human, porcine and bovine diamine oxidase. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 61, 330.
- Moguilevsky N., Varsalona F., Guillaume J. P., Noyer M., Gillard M., Daliers J., Henichart J. P. et Bollen A. (1995) Pharmacological and functional characterisation of the wild-type and site-directed mutants of the human H1 histamine receptor stably expressed in CHO cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 15, 91-102.
- Mondovi B., Fogel W. A., Federico R., Calinescu C., Mateescu M. A., Rosa A. C. et Masini E. (2013) Effects of amine oxidases in allergic and histamine-mediated conditions. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 7, 20-34.
- Mondovi B., Gerosa P. et Cavaliere R. (1982) Studies on the effect of polyamines and their products on Ehrlich ascites tumours. *Agents and Actions*, 12, 450-451.
- Mondovì B., Rotilio G. et Costa M. (1975) Proceedings: In vivo anti-histaminic activity of histaminase. *Agents and Actions*, 5, 460-460.
- Mondovi B., Rotilio G., Finazzi A. et Scioscia-Santoro A. (1964) Purification of pig-kidney diamine oxidase and its identity with histaminase. *Biochemical Journal*, 91, 408.
- Moya-Garcia A. A., Medina M. A. et Sánchez-Jiménez F. (2005) Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function. *Bioessays*, 27, 57-63.
- Mu D., Janes S. M., Smith A. J., Brown D. E., Dooley D. M. et Klinman J. P. (1992) Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 7979-7982.

- Mušič E., Korošec P., Šilar M., Adamič K., Košnik M. et Rijavec M. (2013) Serum diamine oxidase activity as a diagnostic test for histamine intolerance. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 125, 239-243.
- Nagai H., Teramachi H. et Tuchiya T. (2006) Recent advances in the development of anti-allergic drugs. *Allergology International*, 55, 35-42.
- Naila A., Flint S., Fletcher G., Bremer P. et Meerdink G. (2010) Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches. *Journal of food science*, 75, R139-R150.
- Nakamura T., Itadani H., Hidaka Y., Ohta M. et Tanaka K. (2000) Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochemical and biophysical research communications*, 279, 615-620.
- Neree A. T., Soret R., Marcocci L., Pietrangeli P., Pilon N. et Mateescu M. A. (2020) Vegetal diamine oxidase alleviates histamine-induced contraction of colonic muscles. *Scientific Reports*, 10, 21563.
- Nunn P. B., Seelig M., Zagoren J. C. et Spencer P. S. (1987) Stereospecific acute neuronotoxicity of 'uncommon' plant amino acids linked to human motor-system diseases. *Brain Research*, 410, 375-379.
- Nuutinen S. et Panula P. (2010) Histamine in neurotransmission and brain diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 709, 95-107.
- O'Mahony L., Akdis M. et Akdis C. A. (2011) Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128, 1153-1162.
- Oda T., Morikawa N., Saito Y., Masuho Y. et Matsumoto S.-i. (2000) Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 36781-36786.
- Omelchenko I. A., Jain R. K., Junaid M. A., Rao S. et Allen C. N. (1999) Neurotoxic Potential of Three Structural Analogs of β -N-oxalyl- α , β -Diaminopropanoic Acid (β -ODAP). *Neurochemical research*, 24, 791-797.
- Padiglia A., Cogoni A. et Floris G. (1991) Characterization of amine oxidases from *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus* and *Cicer*. *Phytochemistry*, 30, 3895-3897.
- Padmajaprasad V., Kaladhar M. et Bhat R. V. (1997) Thermal isomerisation of β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid, the neurotoxin in *Lathyrus sativus*, during cooking. *Food chemistry*, 59, 77-80.
- Paleacu D., Cohn D. et Rabey J. (1999) Cognitive evaluation of patients with chronic neurolathyrism. *Parkinsonism & Related Disorders*, 5, 55-58.

- Papageorgiou M., Lambropoulou D., Morrison C., Kłodzińska E., Namieśnik J. et Płotka-Wasyłka J. (2018) Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, 128-142.
- Parsons M. R., Convery M. A., Wilmot C. M., Yadav K. D. S., Blakeley V., Corner A. S., Phillips S. E. V., McPherson M. J. et Knowles P. F. (1995) Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure*, 3, 1171-1184.
- Pieters S., De Beer T., Kasper J. C., Boulpaep D., Waszkiewicz O., Goodarzi M., Tistaert C., Friess W., Remon J.-P. et Vervaeck C. (2012) Near-infrared spectroscopy for in-line monitoring of protein unfolding and its interactions with lyoprotectants during freeze-drying. *Analytical Biochemistry*, 84, 947-955.
- Pietrangeli P., Bellelli A., Fattibene P., Mondovì B. et Morpurgo L. (2012) Lathyrus cicera copper amine oxidase reactions with tryptamine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 109, 33-39.
- Pietrangeli P., Federico R., Mondovì B. et Morpurgo L. (2007) Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 997-1004.
- Raithel M., Matek M., Baenkler H. W., Jorde W. et Hahn E. G. (1995) Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergic enteropathy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 108, 127-133.
- Rao S. L., Adiga P. R. et Sarma P. S. (1964) The isolation and characterization of beta-N-oxalyl-L-alpha, beta-diaminopropionic acid: a neurotoxin from the seeds of *Lathyrus sativus*. *Biochemistry*, 3, 432-436.
- Reese I., Ballmer-Weber B., Beyer K., Fuchs T., Kleine-Tebbe J., Klimek L., Lepp U., Niggemann B., Saloga J., Schäfer C., et al. (2017) German guideline for the management of adverse reactions to ingested histamine. *Allergo Journal International*, 26, 72-79.
- Rosenthal G. (2012). Dans *Plant nonprotein amino and imino acids: biological, biochemical, and toxicological properties*. Academia press. London.
- Ross S. M., Roy D. N. et Spencer P. S. (1989) β -N-oxalylamino-L-alanine action on glutamate receptors. *Journal of neurochemistry*, 53, 710-715.
- Sampson H. A. (2003) 9. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, S540-S547.
- San Mauro Martin I., Brachero S. et Garicano Vilar E. (2016) Histamine intolerance and dietary management: A complete review. *Allergologia et Immunopathologia*, 44, 475-483.
- Sattler J., Häfner D., Klotter H.-J., Lorenz W. et Wagner P. (1988) Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and Actions*, 23, 361-365.

- Sattler J. et Lorenz W. (1990) Intestinal diamine oxidases and enteral-induced histaminosis: studies on three prognostic variables in an epidemiological model. Dans *Amine Oxidases and Their Impact on Neurobiology*. Riederer P et Youdim MBH, eds. Springer Vienna. Vienna.
- Saxena S. P., Brandes L. J., Becker A. B., Simons K. J., LaBella F. S. et Gerrard J. M. (1989) Histamine is an intracellular messenger mediating platelet aggregation. *Science*, 243, 1596-1599.
- Scalet M., Federico R. et Angelini R. (1991) Time Courses of Diamine Oxidase and Peroxidase Activities, and Polyamine Changes after Mechanical Injury of Chick-pea Seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 137, 571-575.
- Schmidt 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. et Enko D. (2021) Histamine Intolerance Originates in the Gut. *Nutrients*, 13, 1262.
- 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., Arrang J.-M., Garbarg M., Pollard H. et Ruat M. (1991) Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiological reviews*, 71, 1-51.
- Schwelberger H. (2007) The origin of mammalian plasma amine oxidases. *Journal of neural transmission*, 114, 757-762.
- Schwelberger H. G. et Bodner E. (1997) Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1340, 152-164.
- Serrano V. M., Cardoso A. R., Diniz M. et Sales M. G. F. (2020) In-situ production of Histamine-imprinted polymeric materials for electrochemical monitoring of fish. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 311, 127902.
- Shahid M., Walker G., Zorn S. et Wong E. (2009) Asenapine: a novel psychopharmacologic agent with a unique human receptor signature. *Journal of psychopharmacology*, 23, 65-73.
- Shinomol G. K. et Muralidhara (2007) Differential induction of oxidative impairments in brain regions of male mice following subchronic consumption of Khesari dhal (*Lathyrus sativus*) and detoxified Khesari dhal. *NeuroToxicology*, 28, 798-806.
- Singh M. et Singh G. (1952) Lathyrism; a neurological and economic problem in India. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 116, 923-932.

- Smith M. et Garrett R. (2005) A heretofore undisclosed crux of eosinophilia-myalgia syndrome: compromised histamine degradation. *Inflammation Research*, 54, 435-450.
- Smolinska S., Jutel M., Cramer R. et O'Mahony L. (2014) Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy*, 69, 273-281.
- Springuel P. et Vu D. (2002) Convulsions with newer-generation antihistamines. *WHO Drug Information*, 16, 287.
- Steinhoff M., Griffiths C., Church M., Luger T., Burns T., Breathnach S. et Cox N. (2004) Histamine. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, eds *Rook's textbook of dermatology* Oxford, United Kingdom: Blackwell Science, 9, 50-52.
- Stratton J. E., Hutkins R. W. et Taylor S. L. (1991) Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of food protection*, 54, 460-470.
- Tabor H. et Tabor C. W. (1964) Spermidine, spermine, and related amines. *Pharmacological Reviews*, 16, 245-300.
- Takahashi K., Lin J.-S. et Sakai K. (2006) Neuronal activity of histaminergic tuberomammillary neurons during wake-sleep states in the mouse. *Journal of Neuroscience*, 26, 10292-10298.
- Tarade K. M., Singhal R. S., Jayaram R. V. et Pandit A. B. (2007) Kinetics of degradation of ODAP in *Lathyrus sativus* L. flour during food processing. *Food Chemistry*, 104, 643-649.
- Thurmond R. L., Gelfand E. W. et Dunford P. J. (2008) The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nature reviews Drug discovery*, 7, 41-53.
- Tipton K. et Boyce S. (2000) History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, 16, 34-40.
- Toyota H., Dugovic C., Koehl M., Laposky A. D., Ngo K., Wu Y., Lee D. H., Yanai K., Sakurai E. et Watanabe T. (2002) Behavioral characterization of mice lacking histamine H3 receptors. *Molecular pharmacology*, 62, 389-397.
- Triggiani M., Gentile M., Secondo A., Granata F., Oriente A., Tagliabatella M., Annunziato L. et Marone G. (2001) Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H1 receptors. *The Journal of Immunology*, 166, 4083-4091.
- Turowski P. N., McGuirl M. A. et Dooley D. (1993) Intramolecular electron transfer rate between active-site copper and topa quinone in pea seedling amine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 17680-17682.
- Unander D. (2002) Grass Pea. *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, Vol. 18. *Economic Botany*, 56, 105-105.

- Van Nassauw L., Adriaensen D. et Timmermans J.-P. (2007) The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Autonomic Neuroscience*, 133, 91-103.
- Vaz Patta M. C. et Rubiales D. (2014) Lathyrus diversity: available resources with relevance to crop improvement—*L. sativus* and *L. cicera* as case studies. *Annals of botany*, 113, 895-908.
- Visciano P., Schirone M. et Tofalo R. (2012) Suzzi G. 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood *Front Microbiol*, 3, 10.
- Wagner N., Dirk D., Peveling-Oberhag A., Reese I., Rady-Pizarro U., Mitzel H. et Staubach P. (2017) A Popular myth—low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria—fact or fiction? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31, 650-655.
- Wantke F., Götz M. et Jarisch R. (1993) Histamine-free diet: treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches. *Clinical & Experimental Allergy*, 23, 982-985.
- Wantke F., Götz M. et Jarisch R. (1994) The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model for food intolerance. *Allergy and Asthma Proceedings*, 15, 27-32.
- Warkentin T., Tar'an B., Banniza S., Vandenberg A., Bett K., Arganosa G., Barlow B., Ife S., Horner J. et de Silva D. (2017) CDC Inca yellow field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 98, 218-220.
- Warkentin T., Vandenberg A., Tar'an B., Banniza S., Arganosa G., Barlow B., Ife S., Horner J., de Silva D. et Thompson M. (2014) CDC Amarillo yellow field pea. *Canadian journal of plant science*, 94, 1539-1541.
- Warkentin T., Vandenberg A., Tar'an B., Barlow S. et Ife S. (2007) CDC Meadow field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 87, 909-910.
- Warren B. A., Patel S. A., Nunn P. B. et Bridges R. J. (2004) The Lathyrus excitotoxin β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid is a substrate of the L-cystine/L-glutamate exchanger system xc⁻. *Toxicology and applied pharmacology*, 200, 83-92.
- Wechsler J., Schroeder H., Byrne A., Chien K. et Bryce P. (2013) Anaphylactic responses to histamine in mice utilize both histamine receptors 1 and 2. *Allergy*, 68, 1338-1340.
- Welbaum G., Bradford K., Yim K.-O., Booth D. et Oluoch M. (1998) Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Science Research*, 8, 161-172.
- Wöhrl S., Hemmer W., Focke M., Rappersberger K. et Jarisch R. (2004) Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy & Asthma Proceedings*, 25, 305-311.

- Woldeamanuel Y. W., Hassan A. et Zenebe G. (2012) Neurolathyrism: two Ethiopian case reports and review of the literature. *Journal of Neurology*, 259, 1263-1268.
- Wu X., Yoshida A., Sasano T., Iwakura Y. et Endo Y. (2004) Histamine production via mast cell-independent induction of histidine decarboxylase in response to lipopolysaccharide and interleukin-1. *International Immunopharmacology* 4, 513-520.
- Xing S. G., Jun Y. B., Hau Z. W. et Liang L. Y. (2007) Higher accumulation of γ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 560-566.
- Xu Q., Liu F., Chen P., Jez J. M. et Krishnan H. B. (2017) β -N-Oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid (β -ODAP) content in *Lathyrus sativus*: the integration of nitrogen and sulfur metabolism through β -cyanoalanine synthase. *International journal of molecular sciences*, 18, 526.
- Yacoub M.-R., Ramirez G. A., Berti A., Mercurio G., Breda D., Saporiti N., Burastero S., Dagna L. et 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.
- Yamauchi K., Sekizawa K., Suzuki H., Nakazawa H., Ohkawara Y., Katayose D., Ohtsu H., Tamura G., Shibahara S. et Takemura M. (1994) Structure and function of human histamine N-methyltransferase: critical enzyme in histamine metabolism in airway. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 267, L342-L349.
- Yan Z. Y., Spencer P. S., Li Z. X., Liang Y. M., Wang Y. F., Wang C. Y. et Li F. M. (2006) *Lathyrus sativus* (grass pea) and its neurotoxin ODAP. *Phytochemistry*, 67, 107-121.
- Yang R., Chen H. et Gu Z. (2011) Factors influencing diamine oxidase activity and γ -aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11616-11620.
- Yongmei L., Xiaohong C., Mei J., Xin L., Rahman N., Mingsheng D. et Yan G. (2009) Biogenic amines in Chinese soy sauce. *Food Control*, 20, 593-597.
- Zhang Q., Mashima Y., Noda S., Imamura Y., Kudoh J., Shimizu N., Nishiyama T., Umeda S., Oguchi Y., Tanaka Y., et al. (2003) Characterization of AOC2 gene encoding a copper-binding amine oxidase expressed specifically in retina. *Gene*, 318, 45-53.