

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA STABILITÉ DE LA DIAMINE OXYDASE VÉGÉTALE EN PRÉSENCE DE
CRYOPROTECTEURS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
MERIEM MEGOURA

MARS 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

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche Professeur Mircea Alexandru Mateescu de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche, d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenue, encourager tout au long de ma maîtrise. Je tiens aussi à lui exprimer ma gratitude pour le partage de son savoir, son dévouement et sa patience.

Merci à Dre. Pompilia Ispas-Szabo pour sa gentillesse, son soutien et son support surtout pour la gestion du projet DAO. Merci aussi à Dr. Cahn Tien Le pour sa gentillesse et ses encouragements.

Nous souhaitons exprimer nos remerciements au Pr David Dewez et Pr Laurent Cappadocia d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Je voudrais remercier aussi tous les membres du département de Chimie, Mme Mylène Lacharité, Pascale Beauchemin. À Dr. Gwenaël Chamouloud pour sa patience, son attention et son assistance à NanoQam et aussi à Julien Gogot pour son assistance avec la microscopie électronique à balayage (MEB)

Dans le cadre des collaborations avec Neptune Solution bien être je tiens à remercier mes collègues passés et présents au département R&D: Déborah, Erick, Susmitha, pour leur support, soutien et encouragements au quotidien. Un grand merci à Sibel pour l'opportunité, l'appui et le soutien durant cette période.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues qui sans eux ce projet n'aurait pas vu le jour, merci pour l'ambiance au sein du laboratoire. Merci à Armelle d'avoir facilité mon intégration au sein du laboratoire, de m'avoir soutenue et encouragé, un grand merci à Paul mon partenaire depuis le début de notre maîtrise et aussi mon binôme de laboratoire pour ta présence et nos bons moments de partage de et motivations, Mariella, Rym, Rimaz, Aly et Marc-André. Je tiens à remercier en particulier Salma ma collègue de bureau, mon amie, pour sa présence, son soutien, son aide et son encouragement au quotidien. Merci pour tout ma chérie!

Enfin, je tiens à remercier toute personne ayant contribué de prêt ou de loin à la réalisation de ce projet.

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier de la Fondation Courtois pour la subvention du projet de recherche DAO.

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à ma *Maman et ma Mami*,

À mon père,

À mon frère Youcef et ma petite sœur Amina,

À ma famille,

À mes amis

Qui m'ont encouragé et soutenu tout au long de ce parcours

Meriem

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xi
RÉSUMÉ.....	xiii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Histamine : synthèse, métabolisme et dysfonctions	1
1.1.1 Histamine	1
1.1.2 Origine de l’histamine.....	1
1.1.3 Rôle de l’histamine	3
1.1.4 Métabolisme de l’histamine	4
1.1.5 Dysfonctions liées à l’histamine	6
1.1.5.1 L’intolérance à l’histamine (HIT)	7
1.1.5.2 Maladie inflammatoire de l’intestin (MII)	8
1.1.5.3 Syndrome de l’intestin irritable (SII)	9
1.1.5.4 Le cancer colorectal (CCR).....	10
1.2 Les amines oxydases.....	10
1.2.1 Classification des amines oxydases	10
1.2.1.1 Amines oxydase à FAD.....	10
1.2.1.1.1 Les monoamines oxydases (MAOs).....	11
1.2.1.1.2 Les polyamines oxydases (PAOs).....	13
1.2.1.2 Amines oxydase à Cuivre (CuAOs).....	15
1.2.2 Applications thérapeutiques de la diamine oxydase	17
1.3 Lyophilisation et conservation des protéines.....	19
1.3.1 Principe de la lyophilisation.....	19
1.3.2 Processus de lyophilisation	21
1.3.2.1 Sublimation	21
1.3.2.2 Séchage primaire	22
1.3.2.3 Séchage secondaire	22
1.3.3 Application de la lyophilisation dans l’industrie pharmaceutique.....	23
1.3.4 Impact de la lyophilisation sur les protéines	23
1.3.4.1 Stress à basse température.....	24
1.3.4.2 Effet de concentration	25
1.3.4.3 Formation de l’interface glace-eau.....	25
1.3.4.4 Le changement du pH pendant la congélation.	25

1.3.4.5	Séparation de phase pendant la congélation.....	25
1.3.4.6	Stress de déshydratation.....	25
1.3.5	Stabilisateurs pour la cryo- et la lyoprotection des protéines	26
1.3.5.1	Les polymères	26
1.3.5.2	Les acides aminés (AAs).....	26
1.3.5.3	Les surfactants ou agents tensioactifs	27
1.3.5.4	Sucres ou polyols	28
1.3.5.5	Autres excipients	29
1.3.6	Mécanisme de stabilisation des protéines	29
1.3.6.1	Hypothèse de substitution de l'eau.....	30
1.3.6.2	Hypothèse de la vitrification	30
CHAPITRE 2 PRÉSENTATION DU PROJET.....		32
CHAPITRE 3 ARTICLE SCIENTIFIQUE		36
3.1	Résumé	38
3.2	Abstract.....	38
3.3	Introduction.....	39
3.4	Results and discussion	42
3.4.1	vDAO Activity after lyophilization	42
3.4.2	Thermal properties of the freeze-dried formulations	43
3.4.3	Characterization of vDAO powders.....	44
3.4.4	vDAO activity after long-term storage at different temperatures	45
3.4.5	Behavior of the enzyme formulations in tablet forms.....	47
3.4.5.1	Stability of vDAO in the dry tablets.....	47
3.4.5.2	<i>In vitro</i> dissolution tests	49
3.4.5.3	Commercial products	51
3.5	Materials and Methods	52
3.5.1	Materials.....	52
3.5.2	Preparation of Enzyme Formulation and Lyophilization.....	53
3.5.3	vDAO Activity Measuring.....	53
3.5.3.1	Specific activity: DCHBS-AAP-HRP method.....	53
3.5.3.2	Protein quantification	54
3.5.4	Scanning electron microscopy (SEM)	54
3.5.5	Thermogravimetric analysis (TGA).....	54
3.5.6	DSC (Differential Scanning Calorimetry) Measurements	54
3.5.7	Preparation of monolithic tablets	55
3.5.7.1	Characterization of dry tablets	55
3.5.7.2	<i>In vitro</i> dissolution tests	55
3.5.8	Statistical analysis	56
3.6	Conclusion.....	56
3.7	Acknowledgements.....	56
3.8	Supplementary Data.....	57

CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE.....	58
CONCLUSION	65
APPENDICE A CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE À LA RÉDACTION ET LA PUBLICATION D’UN ARTICLE SCIENTIFIQUE DURANT LE PROJET DE MAÎTRISE ...	66
APPENDICE B CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE À LA RÉDACTION ET LA PUBLICATION D’UN ARTICLE SCIENTIFIQUE DURANT LE PROJET DE MAÎTRISE ...	68
APPENDICE C CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE À LA RÉDACTION ET LA PUBLICATION D’UN ARTICLE SCIENTIFIQUE DURANT LE PROJET DE MAÎTRISE ...	70
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Synthèse de l'histamine par décarboxylation de son précurseur l'histidine.	1
Figure 1.2 Principales cellules productrices d'histamine.	2
Figure 1.3 Fonctions inflammatoires et régulatrices de l'histamine sur différents sites corporels...4	
Figure 1.4 Détails des réactions conduisant à la formation et à l'inactivation de l'histamine.	6
Figure 1.5 Maladies intestinales liées à l'histamine.	7
Figure 1.6 Dégradation intestinale de l'histamine.	8
Figure 1.7 Maladies inflammatoires de l'intestin.	9
Figure 1.8 La réaction des monoamines oxydases.	11
Figure 1.9 Structure de la MAO-B humaine.	12
Figure 1.10 Oxydation de la spermidine et de la spermine catalysée par les PAOs.	14
Figure 1.11 Structure tridimensionnelle de la diamine oxydase.	15
Figure 1.12 Schéma général représentant les principaux composants d'un lyophilisateur.	21
Figure 1.13 Différents types de stress liés à la lyophilisation des protéines thérapeutiques.	24
Figure 1.14 Structures moléculaires de perspective de disaccharides.	28
Figure 2.1 Schéma hypothétique du mécanisme de stabilisation de la DAO par les disaccharides.	33
Figure 2.2 Procédé expérimental de la première phase du projet.	34
Figure 2.3 Procédé expérimental de la deuxième phase du projet.	35
Figure 3.1 Effect of lyophilization on vDAO enzymatic activity in the presence or absence of Sucrose (SUC) or Trehalose (TRE) as cryoprotectants.	42
Figure 3.2 The morphology of vDAO lyophilized samples.	45
Figure 3.3 Time course of the residual humidity of vDAO powder formulations stored at different temper-atures: (A) at 4 °C; (B) at -20 °C.	46
Figure 3.4 . Effect of storage temperature on normalized vDAO activity stored at (A) 4 °C and (B) at -20 °C.	47

Figure 3.5 Enzymatic activity of vDAO in dry tablets of vDAO lyophilized with or without disaccharides as cryoprotectants during 6-months storage at 4 °C.	49
Figure 3.6 Release profiles of vDAO with and without cryoprotectants from monolithic tablets stored for 6 months at 4 °C.	51
Figure 3.7 Release profile of vDAO from two commercial products (tablet and capsule forms).	52
Figure 3.8 Comparison of behavior for tablets obtained with our preparations (Left) versus commercial tablet and capsule (Right).....	57
Figure 3.9 Detection of vDAO activity with the DCHBS-AAP method.	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Distribution et spécificité de substrat des isoformes A et B des MAOs.	13
Tableau 1.2 Différents cryoprotecteurs utilisés pour la stabilisation des protéines durant la lyophilisation.....	27
Table 3.1 Thermal properties of vDAO lyophilized in the absence or the presence of cryoprotectants.	43
Table 3.2 Summary of the physical properties of tablets.....	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AAP	4-Aminoantipyrine
AO	Amine Oxydase
BSA	Albumine de sérum bovin
CCR	Cancer colorectal
CU	Colite ulcéreuse
Cu-AO	Amine Oxydase à Cuivre
DAO	Diamine Oxydase
DCHBS	Acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonique
DSC	Calorimétrie à balayage différentiel
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAD-AO	Amine Oxydase à Flavine Adénine Dinucléotide
HR	Récepteur histaminique
HRP	Horseradish peroxidase
HDC	Histidine Décarboxylase
HNMT	Histamine N-méthyltransférase
ImAA	Imidazole acétaldéhyde
HIT	Intolérance à l'histamine
LO	Lysyl Oxydase

MAO	Monoamine Oxydase
MC	Maladie de Lesniowski-Crohn
MII	Maladie inflammatoire de l'intestin
PAO	Polyamine Oxydase
PBS	Tampon Phosphate Salin
pkDAO	Diamine Oxydase de rein de porc
PLP	Pyridoxal Phosphate
PsDAO	Diamine oxydase provenant du <i>Pisum sativum</i>
SII	Syndrome de l'intestin irritable
SNC	Système Nerveux Central
TGA	Thermogravimétric Analysis (<i>Analyse thermogravimétrique</i>)
TNF-alpha	Tumor necrosis factor (<i>Facteur de nécrose tumorale</i>)
TPQ	2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone
VAP-1	Protéine d'adhésion vasculaire -1

RÉSUMÉ

La Diamine oxydase végétale (vDAO) a été proposée comme agent thérapeutique pour le traitement des dysfonctions liées à l'histamine. L'une des principales limites à l'utilisation des protéines dans le domaine pharmaceutique est leur instabilité en milieu liquide. La lyophilisation est l'une des méthodes les plus fiables pour l'obtention de protéine en poudre. Le cycle de lyophilisation génère différents types de stress, tels que la variation du pH, l'agrégation des protéines, la cristallisation. C'est pourquoi l'ajout des cryoprotecteurs comme les disaccharides (sucrose et tréhalose) dans la formulation vont générer des liaisons hydrogène avec l'enzyme (en remplaçant celles établies avec l'eau) permettant de stabiliser sa conformation et ainsi préserver son activité durant le séchage et le stockage à long terme. L'objectif principal était d'investiguer l'effet des disaccharides sur la stabilité de la vDAO de *Pisum sativum* durant le séchage et l'entreposage. L'effet des cryoprotecteurs sur l'activité enzymatique a été principalement investigué par la méthode spectrophotométrique DCHBS-AAP-HRP pour le dosage du peroxyde d'hydrogène comme produit de réaction. Les propriétés thermiques des poudres, notamment la température de transition vitreuse et le contenu en humidité ont été évalués par calorimétrie à balayage différentiel (DSC) et par analyse thermogravimétrique (TGA), respectivement. Par la suite, les poudres issues de la stabilité ont été formulées en comprimés monolithiques, suivi par la caractérisation de l'activité de l'enzyme en phase sèche et en milieux gastro-intestinaux. La présente étude a révélé le potentiel des disaccharides saccharose et tréhalose pour protéger la vDAO du stress de lyophilisation, du stockage à long terme et des fluides gastro-intestinaux simulés. Sous forme de poudre, le saccharose et le tréhalose ont un effet similaire sur la vDAO, et ont permis de maintenir une teneur minimale en humidité de 4% avec une activité enzymatique atteignant 60% après 18 mois de stockage à 4 °C. Le stockage à -20 °C affecte considérablement l'activité de la vDAO, avec ou sans additif, atteignant 40%. Dans les fluides gastro-intestinaux simulés, le saccharose a montré une meilleure protection de l'activité enzymatique et la libération a atteint 80% de l'activité totale, 70% pour le tréhalose et 20% dans le témoin. Privilégier un stockage à température ambiante pourrait être une excellente alternative pour conserver une meilleure activité enzymatique, et aussi réduire les coûts de stockage et transport.

Mots clés : Diamine oxydase, Cryoprotecteurs, Lyophilisation, Sucrose, Tréhalose.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Histamine : synthèse, métabolisme et dysfonctions

1.1.1 Histamine

L'histamine (2-[4-imidazolyl] éthylamine) est une simple substance chimique ayant une masse moléculaire de 111 Da (Jarisch *et al.*, 2015). C'est une amine biogène découverte en 1910 par Dale et Laidlaw (Dale et Laidlaw, 1910). En 1932, elle a été identifiée comme médiateur des réactions anaphylactiques (Steinhoff M. *et al.*, 2008). L'histamine est synthétisée (Fig. 1.1) à partir de l'acide aminé histidine par l'enzyme histidine décarboxylase (HDC) (EC 4.1.1.22) en présence du pyridoxal 5-phosphate (PLP) comme cofacteur (Maintz et Novak, 2007). C'est un médiateur important de nombreux processus biologiques, notamment l'inflammation, la sécrétion d'acide gastrique, la neuromodulation et la régulation de la fonction immunitaire (Falus *et al.*, 2004). En raison de sa puissante activité pharmacologique même à de très faibles concentrations, la synthèse, le transport, le stockage, la libération et la dégradation de l'histamine doivent être soigneusement régulés pour éviter des réactions indésirables (Schwelberger *et al.*, 2013).

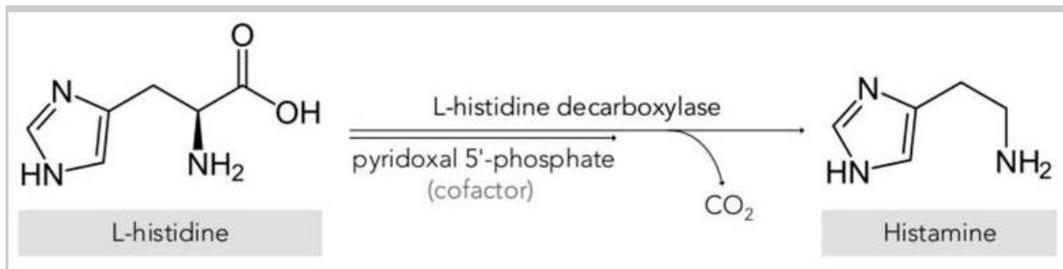


Figure 1.1 Synthèse de l'histamine par décarboxylation de son précurseur l'histidine. D'après (Comas-Basté *et al.*, 2019b).

1.1.2 Origine de l'histamine

L'histamine est produite par la majeure partie des cellules (Fig. 1.2). Les principales sources cellulaires d'histamine sont les mastocytes et les basophiles (Panula *et al.*, 2015). Une fois formée, l'histamine est ensuite stockée dans les granules cytoplasmiques avec d'autres amines (par exemple, la sérotonine), des protéases, des protéoglycanes, des cytokines/chimiokines et des facteurs

angiogéniques et libérée après sensibilisation et dégranulation de la cellule (Borriello *et al.*, 2017). L'histamine peut également être synthétisée et libérée par d'autres types de cellules par exemple, les cellules entérochromaffines gastriques (EC like), les neurones histaminergiques, les cellules dendritiques (CD), les lymphocytes T, les plaquettes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales (Comas-Basté *et al.*, 2020b; Huang *et al.*, 2018; Maintz et Novak, 2007).

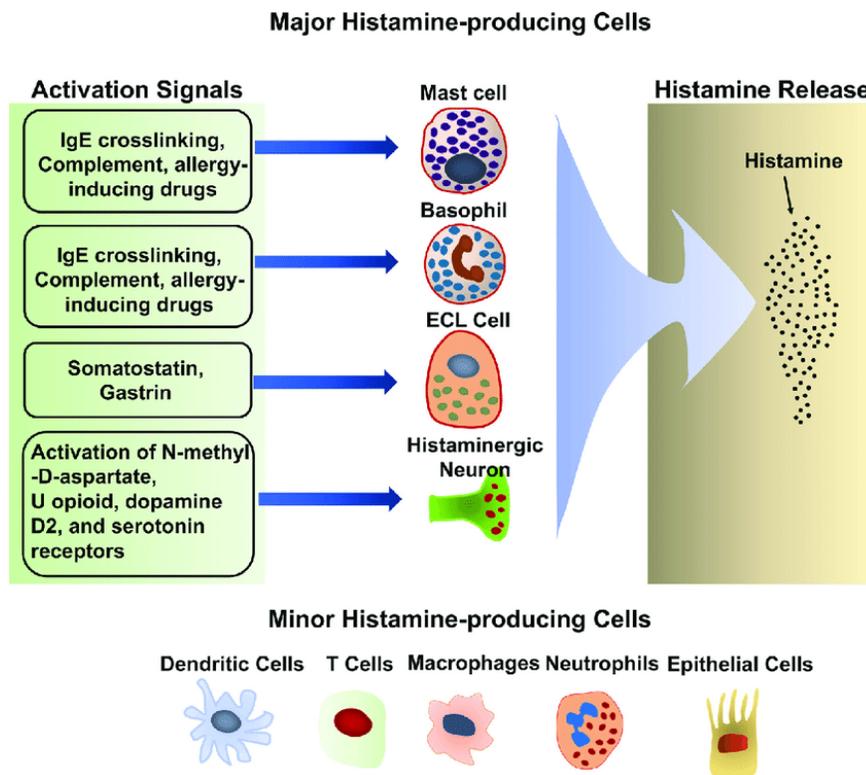


Figure 1.2 Principales cellules productrices d'histamine. D'après (Huang *et al.*, 2018).

L'histamine peut aussi être apportée par voie orale après ingestion d'aliments ou de boissons contenant de l'histamine (Jarisch *et al.*, 2015). On estime qu'environ 5% de l'histamine totale pénètre dans l'organisme avec de la nourriture ou est produite par des microorganismes intestinaux. Après absorption intestinale, l'histamine atteint la circulation sanguine (Landete *et al.*, 2006). Les conditions de formation des amines biogènes dans les aliments sont la disponibilité d'acides aminés libres, la présence de microorganismes produisant la décarboxylase ainsi que les conditions permettant la croissance des bactéries et l'activité de la décarboxylase. L'histidine est produite principalement dans des processus autolytiques ou bactériens. Par conséquent, des concentrations

élevées d'histamine se trouvent principalement dans les produits de fermentation microbienne (Zhao *et al.*, 2022), tels que : les vins, la bière, le lait, les fromages, la charcuterie, la choucroute, le jambon. On le retrouve aussi dans les poissons scombridés, les sardines, les anchois, les cornichons, et certains fruits en raison d'un processus de fermentation ou d'un stockage inapproprié (Mateescu *et al.*, 2017; Neree *et al.*, 2018). Le microbiote intestinal est également une source importante d'histamine. Il a été démontré que la production d'histamine par des bactéries dans l'intestin humain influence la réponse immunitaire.

Un apport d'histamine peut aussi avoir lieu par inhalation, comme lors d'une provocation à l'histamine pour l'investigation d'un asthme bronchique, ou injectée dans la peau lors d'un test dit de piqûre ou intradermique connu pour provoquer des papules ou un érythème (rougeur de la peau), semblable à une piqûre de moustique (Jarisch *et al.*, 2015).

1.1.3 Rôle de l'histamine

L'histamine joue un rôle important dans la santé humaine : c'est un médiateur chimique impliqué dans la régulation de plusieurs processus physiopathologiques. Ces vastes effets physiologiques se produisent par l'activation des récepteurs membranaires exprimés à la surface de différentes cellules, dont 4 sous-types ont été identifiés (H1, H2, H3 et H4), couplés à la protéine G. Selon le type de récepteur histaminique prédominant et le système expérimental étudié, l'histamine peut avoir des effets pro- ou anti-inflammatoires (Fig. 1.3).

Le récepteur H1 de l'histamine (RH1) est exprimé à la surface d'une grande variété de types de cellules, y compris les cellules épithéliales, vasculaires lisses, endothéliales vasculaires, immunitaires, gliales et neuronales. Le RH1 est surtout connu sur le plan thérapeutique pour son rôle dans les réactions allergiques et anaphylactiques ainsi que dans les nausées dues au mal des transports. Le récepteur H2 de l'histamine (RH2) se trouve sur les neurones, les cellules épithéliales, endothéliales, immunitaires et gastriques et est impliqué dans la régulation de la sécrétion d'acide gastrique, de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. Le récepteur H3 de l'histamine (RH3) est principalement exprimé dans le système nerveux central (SNC) et lié à divers processus neurophysiologiques, y compris le cycle veille-sommeil, la régulation du poids et l'homéostasie. En outre, le RH3 est également exprimé dans la périphérie, comme par exemple le système

cardiovasculaire et le tractus gastro-intestinal. Le récepteur H4 de l’histamine (RH4) s’exprime largement dans les tissus et les cellules qui sont impliqués dans les réponses immunitaires par exemple, le poumon, la rate, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et les leucocytes (Comas-Basté *et al.*, 2019b; Hrubisko *et al.*, 2021; Lefèvre *et al.*, 2017; Mocking *et al.*, 2016; Shahid *et al.*, 2009).

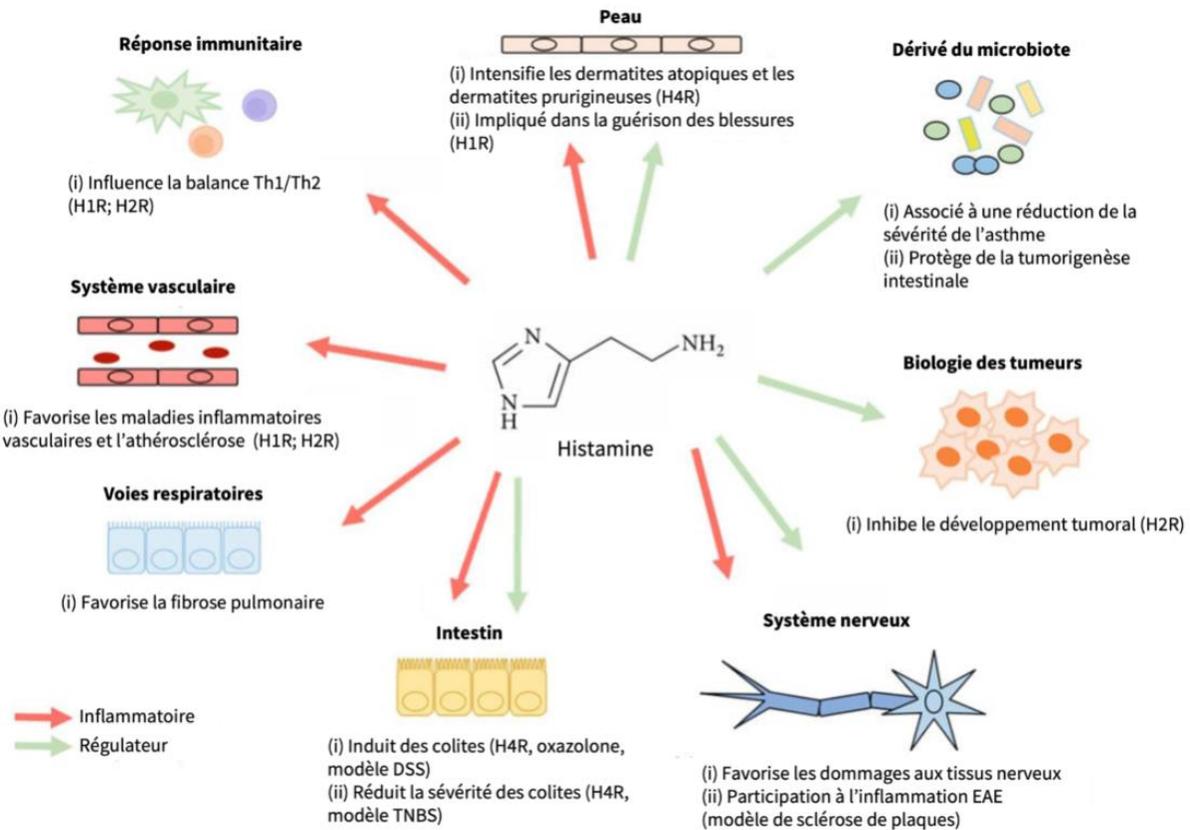


Figure 1.3 Fonctions inflammatoires et régulatrices de l'histamine sur différents sites corporels. L'histamine joue une double fonction selon le type cellulaire et le récepteur. Les flèches rouges indiquent une action pro-inflammatoire ; les flèches vertes indiquent l'action régulatrice de l'histamine. D’après (Castelo Branco *et al.*, 2018).

1.1.4 Métabolisme de l’histamine

Chez l’être humain, deux principales voies métaboliques (extra et intracellulaire) de l’histamine sont connues : par désamination oxydative impliquant la DAO (aussi appelée Histaminase aussi connue comme *amiloride-binding protein* EC 1.4.3.22) ou par méthylation

catalysée l'histamine-N-méthyltransférase (HNMT). Ces mécanismes dépendent de la localisation de l'histamine et génèrent différents produits finaux (Fig. 1.4).

La désamination oxydative de l'histamine par la DAO produit l'imidazole-4-acétaldehyde (ImAA) qui à son tour sera transformé en imidazole acétate par l'aldéhyde déshydrogénase. L'imidazole acétate est ensuite conjugué avec un ribose puis le composé est éliminé par l'urine. La protéine DAO, stockée dans des structures vésiculeuses, se lie à la membrane plasmique des cellules et est libérée en circulation après stimulation. Elle est responsable de la dégradation de l'histamine extracellulaire (Schwelberger *et al.*, 1998). La plus grande activité de DAO est enregistrée dans l'intestin grêle, le côlon, le placenta et les reins. Inversement, la HNMT, la deuxième enzyme la plus importante inactivant l'histamine, est une protéine cytosolique, qui ne peut convertir l'histamine que dans l'espace intracellulaire des cellules (Kovacova-Hanusikova *et al.*, 2015; Maintz et Novak, 2007; Mateescu *et al.*, 2017). L'expression la plus élevée de la HNMT se produit dans les reins et le foie ainsi que dans la rate, le côlon, la prostate, les ovaires, les cellules de la moelle épinière, les bronches et la trachée (Maintz et Novak, 2007). Une petite partie de l'histamine est convertie en N-méthylhistamine par l'action de la HNMT ; environ 2 à 3 % de l'histamine est excrétée (Comas-Basté *et al.*, 2020b; Schwelberger *et al.*, 1998). La HNMT a une affinité légèrement plus élevée pour l'histamine [constante de Michaelis (Km): 6–13 $\mu\text{mol/L}$] comparée à la DAO [Km : 20 $\mu\text{mol/L}$] (Maintz et Novak, 2007).

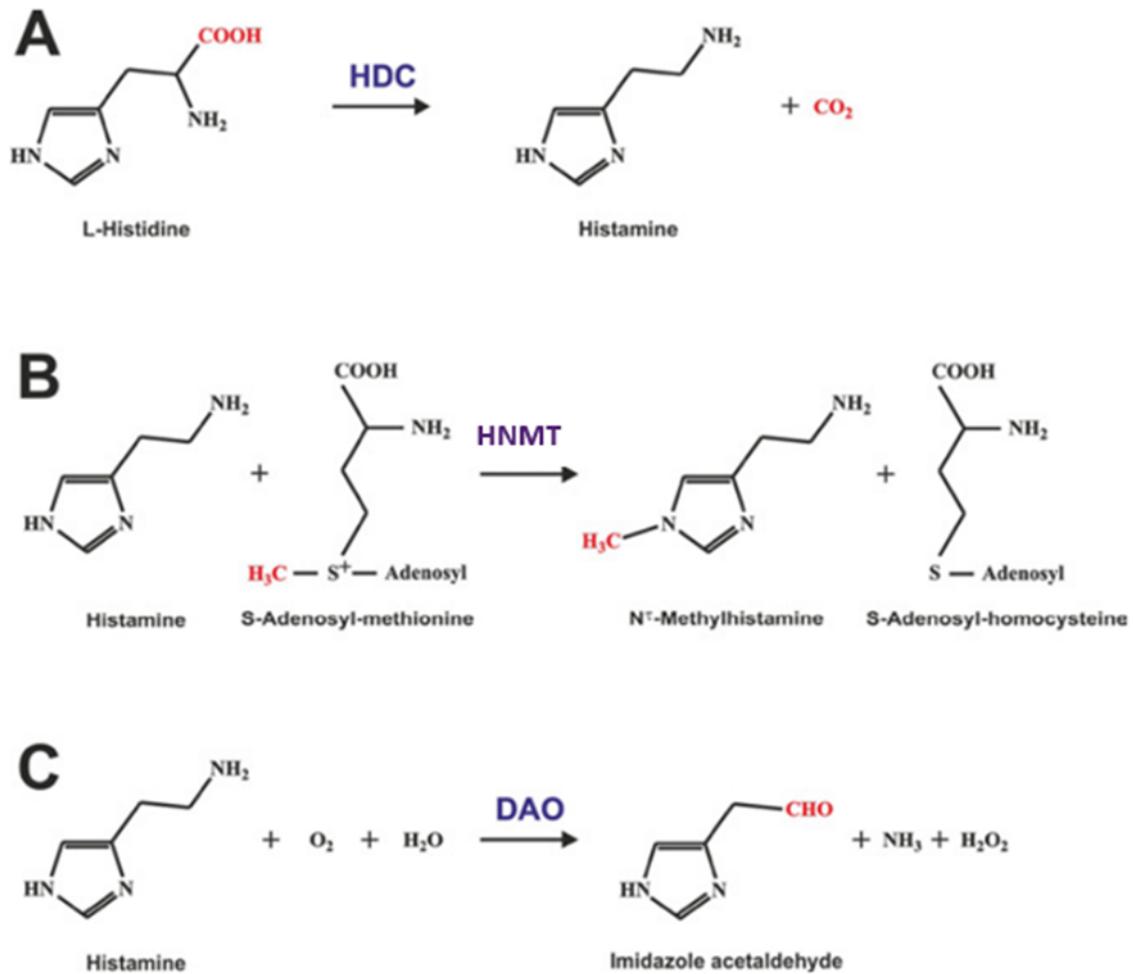


Figure 1.4 Détails des réactions conduisant à la formation et à l'inactivation de l'histamine. La formation de l'histamine catalysée par (A) l'histidine décarboxylase (HDC), les réactions d'inactivation de l'histamine catalysées par (B) l'histamine N-méthyltransférase (HNMT) et (C) la diamine oxydase (DAO) sont représentées avec tous les cosubstrats et co-produits. D'après (Schwelberger *et al.*, 2013).

1.1.5 Dysfonctions liées à l'histamine

L'histamine est bien reconnue pour ses effets dans la réponse d'hypersensibilité de type immédiat. Cependant, l'augmentation des niveaux d'histamine modifie les interactions immunitaires de l'hôte avec le microbiote et entraîne une rupture de l'homéostasie, provoquant le développement de nombreuses maladies intestinales difficiles à gérer (Fig.1.5). Les symptômes

peuvent être désagréables, voire graves incluant : maux de tête, rhinite, eczéma, urticaire, malaises gastro-intestinaux (colique, diarrhée) et dans des cas extrêmes, des crises d'asthme (Maintz et Novak, 2007) et même le décès.

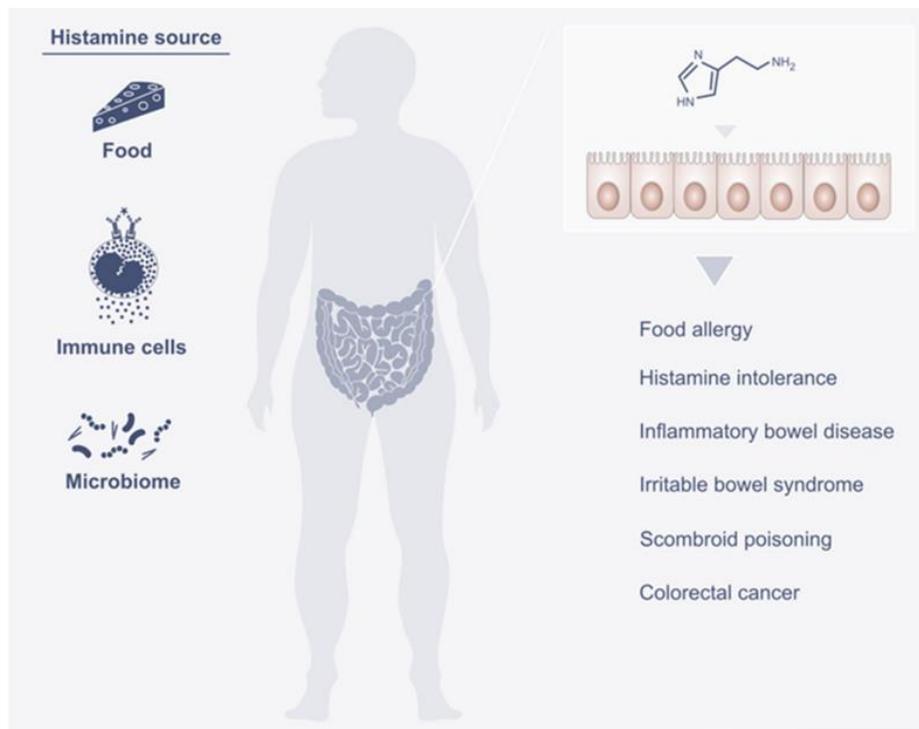


Figure 1.5 Maladies intestinales liées à l’histamine. D’après (Smolinska *et al.*, 2022).

1.1.5.1 L’intolérance à l’histamine (HIT)

L’intolérance à l’histamine (HIT) est définie comme une condition causée par un déséquilibre entre l’histamine libérée par les aliments et la capacité de l’organisme à dégrader une telle quantité (Fig.1.6) (Comas-Basté *et al.*, 2020b). Le terme HIT est utilisé de la même manière que le concept d’intolérance au lactose (qui se produit en raison d’un manque de l’enzyme lactase), car il est présumé que les symptômes de HIT sont liés à un manque ou à une diminution de l’activité de l’enzyme DAO. Chez les patients en bonne santé, les cellules épithéliales intestinales ont une barrière enzymatique créée par DAO et HMNT. Cette barrière empêche la résorption excessive de l’histamine exogène dans la circulation sanguine. Si ces enzymes sont inhibées ou réduites, des symptômes d’intolérance à l’histamine peuvent survenir après avoir consommé même une petite quantité d’histamine (Schwelberger, 2009). Le déficit en diamine oxydase (DAO) conduit à une

homéostasie défectueuse et à une absorption systémique plus élevée de l’histamine. L’activité altérée de DAO peut avoir une origine génétique, pharmacologique ou pathologique. La diminution de l’activité DAO peut être causée par des dommages aux entérocytes au cours de maladies gastro-intestinales (par exemple, maladies inflammatoires de l’intestin, infections). D’autres amines biogènes, des médicaments et de l’alcool peuvent inhiber l’action de la DAO (Smolinska *et al.*, 2022).

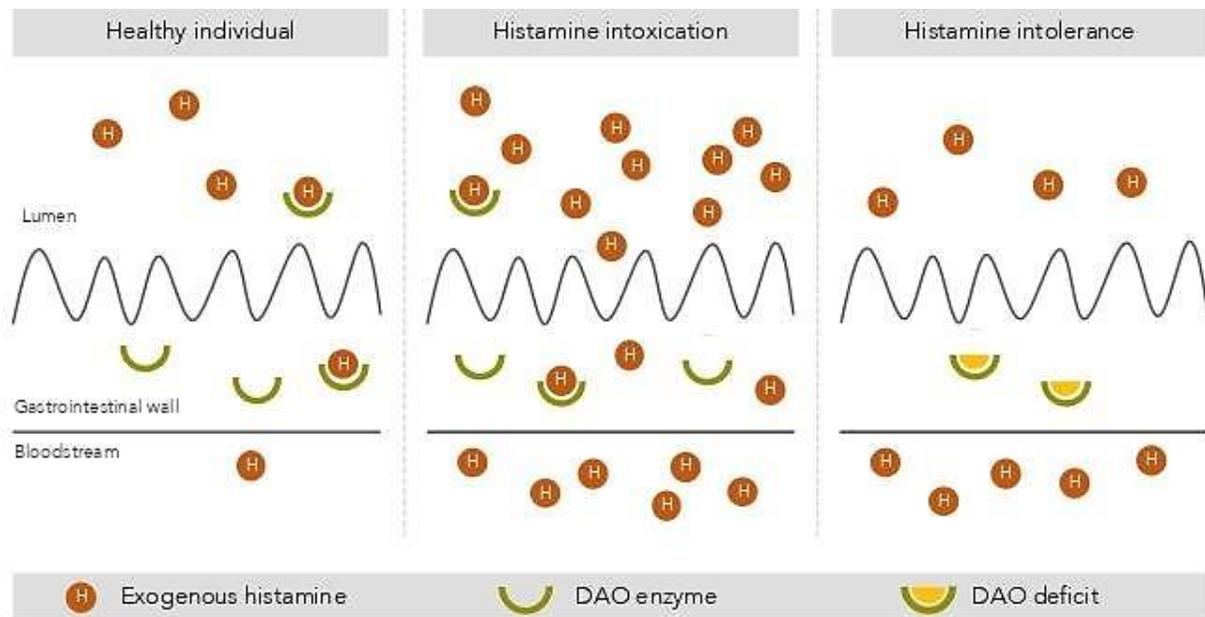


Figure 1.6 Dégradation intestinale de l’histamine. (À gauche) Individu en bonne santé, (au milieu) avec intoxication à l’histamine et (à droite) avec intolérance à l’histamine. D’après (Comas-Basté *et al.*, 2019b).

1.1.5.2 Maladie inflammatoire de l’intestin (MII)

Les maladies inflammatoires de l’intestin (MII) sont des maladies idiopathiques chroniques et récurrentes de l’intestin. Leurs deux principales manifestations, la colite ulcéreuse (CU) et la maladie de Lesniowski-Crohn (MC), diffèrent par leur aspect clinique, endoscopique et histologique (Fig. 1.7). Dans la MC, l’inflammation apparaît dans des lésions diffuses qui peuvent être trouvées partout dans le tube digestif et pénètre profondément dans la paroi intestinale, affectant éventuellement toutes les couches. En revanche, les lésions inflammatoires dans la colite ulcéreuse commencent dans le rectum, remontent, mais ne dépassent pas le côlon et restent superficielles au niveau de la muqueuse (Smolinska *et al.*, 2022). La maladie de Lesniowski-Crohn

entraîne une inflammation transmurale dans tout le tractus gastro-intestinal, mais se caractérise par un schéma discontinu. Contrairement à la colite ulcéreuse où l'inflammation est superficielle, les ulcérations se limitent principalement à la muqueuse du côlon. Les MII diminuent la qualité de vie des patients et, non traitées, peuvent mettre la vie en danger. Les deux manifestations présentent des symptômes similaires (par ex. lésions des muqueuses, ulcères, œdème, diarrhée, selles sanglantes, douleurs abdominales). Les patients atteints de MII sont traités avec des anti-inflammatoires, des stéroïdes, des antibiotiques, des aminosalicyles, ou une thérapie biologique avec l'utilisation d'infliximab (anti-TNF- α). Dans de nombreux cas, la seule option pour obtenir un état de rémission est la chirurgie, où les zones enflammées sont découpées. Potentiellement, l'utilisation d'un antagoniste de H1R et H4R avec l'utilisation simultanée de l'agoniste H2R peut être bénéfique pour les patients atteints de MII (Smolinska *et al.*, 2016).

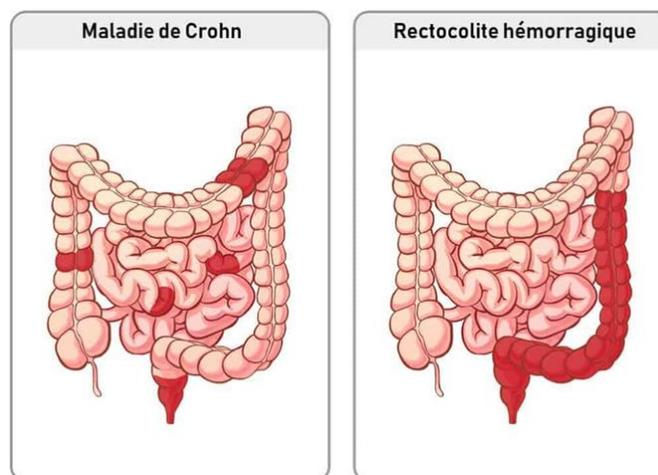


Figure 1.7 Maladies inflammatoires de l'intestin. Maladie de Crohn (à gauche) : l'inflammation aiguë (couleur rouge) sur tout le tube digestif et Colite Ulcéreuse (à droite) : l'inflammation du côlon ascendant. D'après (www.istockphoto.com).

1.1.5.3 Syndrome de l'intestin irritable (SII)

Le syndrome de l'intestin irritable (SII ou *IBS* : *Irritable Bowel Syndrome*) est un trouble chronique du tractus gastro-intestinal, caractérisé par des douleurs abdominales et des altérations des habitudes intestinales (Smolinska *et al.*, 2016), où la nourriture consommée est un déclencheur de symptômes plus graves. Il n'y a pas de traitement spécifique pour le SII ; des médicaments qui diminuent l'inflammation sont utilisés.

1.1.5.4 Le cancer colorectal (CCR)

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent et la troisième cause de mortalité liée au cancer. Les patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin ont un risque accru de CCR au cours de leur vie par rapport à la population générale. Ce risque peut être réduit par le traitement de la colite avec suppression de l'inflammation intestinale. Des microbes intestinaux spécifiques et leurs métabolites peuvent contribuer à la cause du CCR (Jess *et al.*, 2012). Il a été démontré que le déficit en histidine décarboxylase favorise le cancer colorectal associé à l'inflammation (Garcia-Caballero *et al.*, 1988).

1.2 Les amines oxydases

Les amines oxydases (AOs) sont des enzymes régulatrices importantes qui catalysent l'oxydation d'une large gamme d'amines biogènes : mono-, di- et polyamines (Parsons *et al.*, 1995). L'oxydation de ces amines peut à son tour générer d'autres molécules biologiquement actives, telles que des aldéhydes, l'ammoniac et le peroxyde d'hydrogène. Elles sont ubiquitaires, on les retrouve chez les mammifères, plantes et microorganismes. Les AOs sont divisées en deux catégories principales, selon le(s) cofacteur(s) redox qu'ils utilisent : ceux contenant de la flavine-adénine-dinucléotide (FAD; EC 1.4.3.4), comme cofacteur, à savoir l'enzyme cytosolique polyamine oxydase (PAO) et la monoamine oxydase mitochondriale (MAO). La deuxième classe (EC 1.4.3.6) est représentée par des enzymes ayant un ion Cu^{2+} étroitement lié et un groupe prosthétique organique identifié comme 2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (TPQ ou TOPA) sur le site actif (Agostinelli *et al.*, 2004; Floris et Agrò, 2004; Sugawara *et al.*, 2015).

1.2.1 Classification des amines oxydases

1.2.1.1 Amines oxydase à FAD

Cette classe est caractérisée par la présence de flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur redox. Les enzymes appartenant à cette classe sont subdivisées en monoamines oxydases (MAOs) et polyamines oxydases (PAOs).

1.2.1.1.1 Les monoamines oxydases (MAOs)

Les monoamines oxydases (EC 1.4.3.4) sont des flavoprotéines impliquées dans plusieurs fonctions, incluant la dégradation des amines biogènes et xénobiotiques, l'homéostasie des neurotransmetteurs (comme la dopamine, norépinéphrine et sérotonine), le stress oxydatif et la régulation de la signalisation mitochondriale impliquée dans l'apoptose et la neuroprotection. Les MAOs sont ubiquitaires dans les cellules de la plupart des mammifères (à l'exception des érythrocytes) et sont étroitement associés à la membrane externe des mitochondries (Huang *et al.*, 2016; Vinel *et al.*, 2021; Weyler, 1994).

Ces flavoenzymes catalysent (Fig. 1.8) la désamination oxydative des substrats aminés (amines acycliques primaires, secondaires et tertiaires) pour former une imine intermédiaire, avec la réduction simultanée de la flavine en FADH₂. L'imine est ensuite hydrolysée en aldéhyde correspondant et en ammoniac, et le FADH₂ est oxydé en FAD par l'oxygène avec la formation de peroxyde d'hydrogène (Floris et Finazzi Agrò, 2013; Huang *et al.*, 2019)

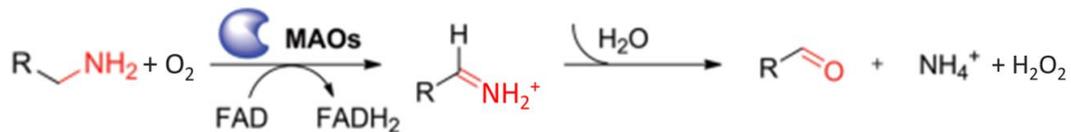


Figure 1.8 La réaction des monoamines oxydases. D'après (Huang *et al.*, 2019).

La structure des MAOs comprend deux sous-unités reliées par un pont disulfure, chacun relié au cofacteur FAD de façon covalente (Figure 1.9). On retrouve deux isoformes : MAO-A et MAO-B. Ces dernières sont codées par deux gènes situés sur le chromosome X chez l'être humain.

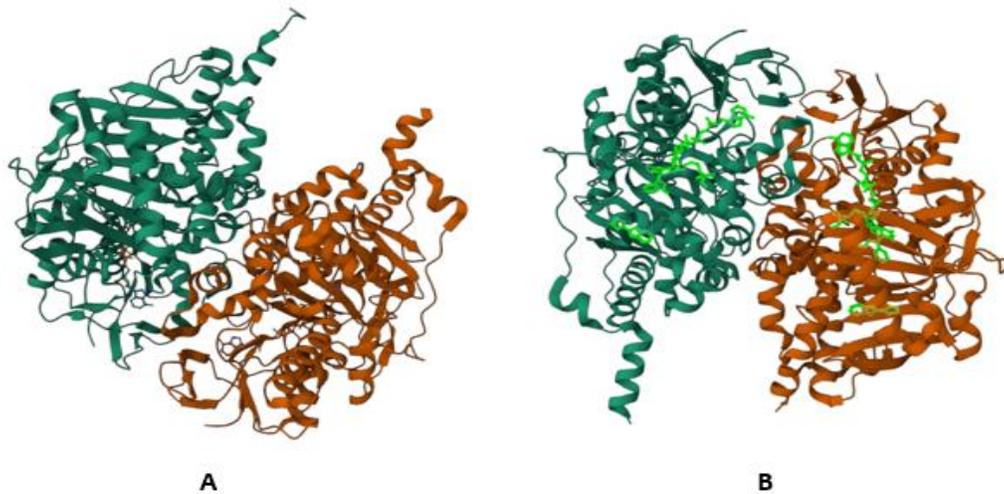


Figure 1.9 Structure de la MAO-B humaine. (A) Dimère de hMAO-B, les deux sous-unités sont orange et vertes (PDB:1GOS); (B) Structure de la hMAO-B en complexe avec FAD (en vert fluorescent sur chaque monomère ; PDB:2XCG). D'après (Binda *et al.*, 2002; Bonivento *et al.*, 2010).

Les deux enzymes partagent 70 % de similitude en acides aminés et contiennent toutes deux un cofacteur FAD lié par covalence attaché à une cystéine via le 8 α -méthylène du cycle isoalloxazine (Gaweska et Fitzpatrick, 2011). Chaque isoenzyme peut être distinguée par certains facteurs tels que la spécificité du substrat, la distribution anatomique et la sensibilité à des inhibiteurs spécifiques (Tableau 1.1).

Les MAO-A se retrouvent principalement dans les neurones sympathiques et catécholaminergiques avec une spécificité à la Sérotonine (5-Hydroxytryptamine) comme substrat principal, tandis que les MAO-B sont abondamment exprimées dans les cellules Gliales et les neurones avec une spécificité à la dopamine, la phényléthylamine comme substrat. L'adrénaline, la tyramine et la tryptamine sont des substrats communs aux MAO-A et B (Chan, 2019; Huang *et al.*, 2016; Tong *et al.*, 2013).

La différence de localisation ainsi que la spécificité de substrat des deux isoformes revient à la différence des fonctions physiologiques. En effet, les MAO-A et B agissent comme stabilisateurs de l'humeur. La perte des MAOs chez l'humain peut causer des troubles psychiatriques et neurologiques tels que la dépression et la maladie de Parkinson, respectivement (Agostinelli *et al.*, 2004; Checkoway *et al.*, 1998).

Tableau 1.1 Distribution et spécificité de substrat des isoformes A et B des MAOs.

Monoamine oxydase	MAO-A	MAO-B
Localisation	<ul style="list-style-type: none"> • SNC*: neurones sympathiques et catécholaminergiques • Foie • Endothélium pulmonaire • Tractus Gastrointestinal • Placenta 	<ul style="list-style-type: none"> • SNC* : cellules Gliales, neurones sérotoninergiques • Thrombocytes
Substrats spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> • Sérotonine (5-hydroxy tryptamine) • Mélatonine • Epinéphrine • Norépinephrine (NE) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dopamine • Phényléthylamine (PEA) • Benzylamine
Substrats communs pour MAO-A et MAO-B	Adréraline, Kynuramine, Tyramine, Tryptamine	

*SNC : système nerveux central; Adapté de (Chan, 2019; Floris et Finazzi Agrò, 2013; Huang *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2019).

1.2.1.1.2 Les polyamines oxydases (PAOs)

Les polyamines oxydases [N1-acetylspermidine:oxidoreductase] (EC 1.5.3.11) sont des enzymes monomériques avec une masse molaire allant de 53 à 63 kDa, portant une molécule de FAD comme cofacteur. Contrairement aux MAOs, le FAD n'est pas lié de façon covalente. Les PAOs sont des enzymes intracellulaires retrouvés principalement chez les plantes et les vertébrés (Angelini *et al.*, 2010; Cona *et al.*, 2006). Elles catalysent l'oxydation de la spermine (Spm), la spermidine (Spd) et/ou leurs dérivés acétylés au niveau des groupes aminés secondaires donnant différents produits selon l'organisme considéré. Le mécanisme catalytique des PAOs peut être divisé en deux demi-réactions : la réduction de la flavine lors de l'oxydation de la polyamine suivie de la réoxydation de la flavine par l'oxygène moléculaire. Les PAOs des mammifères (M) oxydent préférentiellement l'acétyl spermine et l'acétyl spermidine donnant la putrescine et la spermidine, respectivement avec le 3-aminopropanal, le peroxyde d'hydrogène et le 1-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal comme produit de réaction. Le 1-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal se cyclise

spontanément en 1-(3-aminopropyl)pyrrolinium qui subit d'autres réarrangements spontanés en 1,5-diazobicyclo[4.3.0.]nonane (Fig. 1.10 : (3, 4)). L'oxydation de la spermidine par les PAOs végétales (P) donne du 1,3-diaminopropane, du peroxyde d'hydrogène et du 4-aminobutanal. Ce dernier se transforme en 1-pyrroline par cyclisation spontanée (Fig. 1.10 : (1, 2)). Contrairement à la réaction des MAOs et des AOs à cuivre/TPQ, l'oxydation des polyamines par les PAOs ne libère pas d'ammoniac (Floris et Agrò, 2004; Rinaldi et al., 1985).

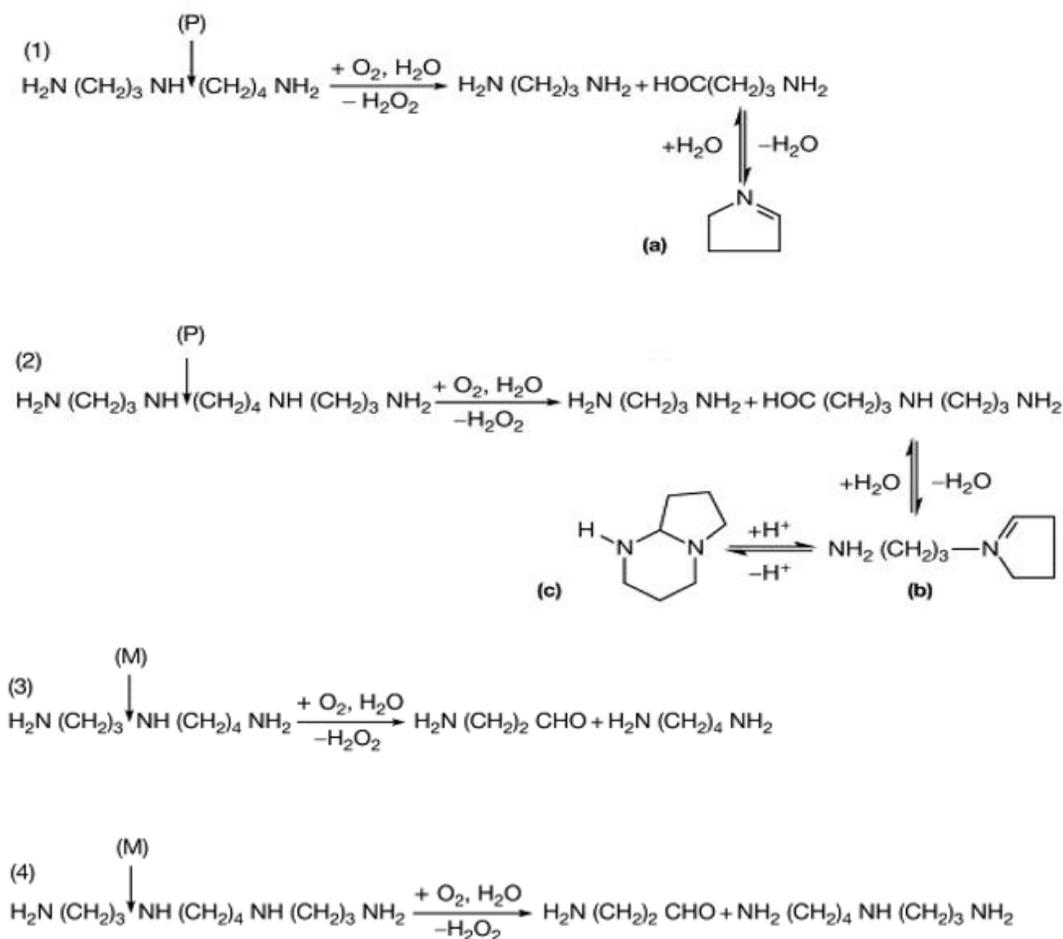


Figure 1.10 Oxydation de la spermidine et de la spermine catalysée par les PAOs. PAOs végétales (plantes : P) et PAOs animale (mammifères :M) (1, 3) Spermidine; (2, 4) Spermine; (a) 1-pyrroline; (b) 1-(3-aminopropyl)-pyrrolinium; et (c) 1,5-diazobicyclo[4.3.0.]nonane. Les flèches indiquent le clivage des polyamines. D'après (Floris et Finazzi Agrò, 2013).

1.2.1.2 Amines oxydase à Cuivre (CuAOs)

Les amines oxydases à cuivre (EC 1.4.3.6) sont des enzymes ubiquitaires : on les retrouve chez les bactéries, les champignons, les plantes et les mammifères. Ils ont divers rôles biologiques, allant du métabolisme des nutriments chez les procaryotes à une implication dans la signalisation et le développement dans les organismes supérieurs (Dawkes et Phillips, 2001). Les CuAOs catalysent la désamination oxydative des amines primaires en aldéhydes correspondants, avec en parallèle la réduction de l'oxygène moléculaire en peroxyde d'hydrogène (équation 1.1 du mécanisme de réaction général des CuAOs).



Ces enzymes sont des dimères de sous-unités identiques de 70 à 90 kDa (Fig. 1.11) liés par des liaisons disulfure formées par des résidus de cystéine conservés. Les protéines DAO de différentes espèces et tissus présentent une variation de poids moléculaire considérable en raison de la glycosylation hétérogène (Schwelberger, 2004). Chaque monomère contient un ion de cuivre et un cofacteur lié par covalence formé par la modification post-traductionnelle d'une chaîne latérale de tyrosine en 2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (topaquinone, TPQ) (Kumar *et al.*, 1996; Parsons *et al.*, 1995).

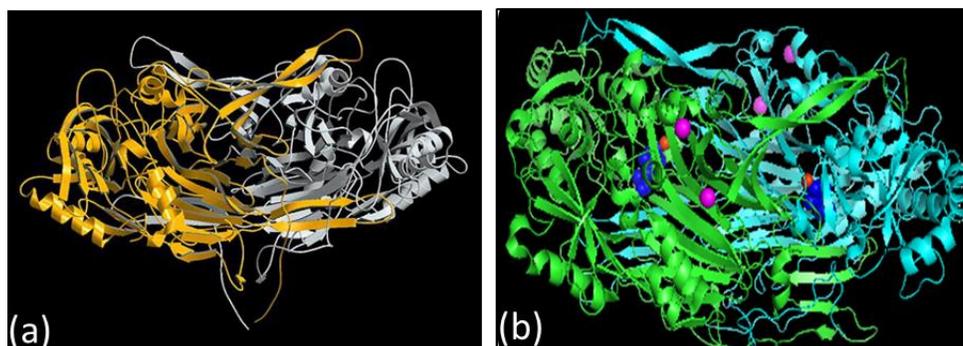
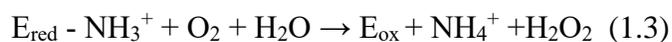


Figure 1.11 Structure tridimensionnelle de la diamine oxydase. (a) Dimère de l'AO de *Pisum sativum* (PSAO) vu perpendiculairement à l'axe de la dyade moléculaire. Les deux sous-unités sont orange et blanches (PDB 1W2Z). (b) Diamine oxydase humaine (hDAO). La DAO présente une structure dimérique (un monomère en turquoise et l'autre en vert) avec un atome de cuivre (sphère rouge), une molécule de TPQ (bleu) et deux ions de calcium par monomère (mauve) (PDB 3HI7) (Kumar *et al.*, 1996; McGrath *et al.*, 2010).

Les Cu/TPQ amines oxydases catalysent la désamination oxydative des groupes amines primaires de mono-, di- et polyamines, en extrayant deux électrons des amines et en les transférant à l'oxygène moléculaire, pour former l'aldéhyde correspondant, l'ammoniac et le peroxyde d'hydrogène comme produit de réaction. Tout comme pour les MAOs, et pour les PAOs le mécanisme catalytique des CuAOs peut être divisé en deux demi-réactions : réduction de l'enzyme au niveau du cofacteur TPQ ($\text{TPQ} \rightarrow \text{TPQH}_2$) par le substrat (équation 1.2) suivie par sa réoxydation par l'oxygène moléculaire (équation 1.3) (Mura *et al.*, 2006).



Les amines oxydase à cuivre se divisent en 4 sous-classes : (i) les AOs intracellulaires, également appelées diamine oxydases (DAO) en raison de leur préférence pour les diamines comme substrat; (ii) les AOs associées à la surface intracellulaire : protéine d'adhésion vasculaire, VAP-1, souvent indiquées comme des amines oxydases sensibles au semicarbazide; (iii) les AOs circulantes de mammifères, appelées AOs plasmatiques ou sériques (SAO), ou benzylamine oxydases en raison de leur activité préférentielle *in vitro* vis-à-vis de ce substrat non physiologique; (iv) la lysyl oxydase (LO) catalyse la maturation et le vieillissement du collagène et de l'élastine par l'oxydation des résidus amine (lysyl) dans ces protéines fibreuses (Mura *et al.*, 2006).

Les amines oxydases intracellulaires, aussi appelées diamine oxydase (EC 1.4.3.22) sont des enzymes ubiquitaires retrouvées chez les plantes, les microorganismes (bactéries et champignons) et les mammifères. Le rôle de la DAO est difficile à définir, car cette classe comprend plusieurs enzymes avec des localisations et substrats différents. Chez les bactéries et les levures, les amines sont utilisées comme source d'azote et de carbone par la réaction des amines oxydases. La DAO végétale (vDAO) joue un rôle dans la croissance cellulaire en régulant les niveaux intracellulaires des di- et polyamines et les aldéhydes comme produits de réaction jouent un rôle clé dans la biosynthèse de certains alcaloïdes. Chez les mammifères, la diamine oxydase a une fonction plus diversifiée. L'activité de la DAO se retrouve dans plusieurs tissus. L'expression la plus élevée se retrouve dans le placenta, les cellules épithéliales tubulaires rénales et dans les cellules épithéliales

intestinales, permettant de former une barrière afin d'empêcher l'entrée des di- et polyamines extracellulaires dans la circulation.

En raison de sa localisation intestinale, la DAO est l'enzyme clé dans la dégradation de l'histamine ingérée. L'histamine a diverses fonctions : c'est un médiateur qui est principalement reconnu en raison de son rôle dans l'induction des symptômes allergiques, mais il est également impliqué dans les réactions inflammatoires non allergiques (Smolinska *et al.*, 2022). En particulier, c'est l'agent étiologique des pseudo-allergies et des intolérances alimentaires qui se caractérisent par une grande variété de symptômes gastro-intestinaux et extra-intestinaux non spécifiques, dus à la distribution des quatre récepteurs de l'histamine au long des différents tissus et systèmes de l'organisme (Comas-Basté *et al.*, 2020b). De plus, l'histaminose alimentaire caractérisée par des symptômes similaires à ceux induits par des facteurs allergènes, pour lesquels il n'existe actuellement aucun traitement (Jones et Kearns, 2011). Les dysfonctions liées à l'histamine sont plus fréquentes chez les personnes ayant un faible taux d'histaminase (Diamine oxydase) intestinale. Une activité DAO plus faible a été discutée comme un indicateur potentiel de lésions de la muqueuse intestinale dans les maladies inflammatoires et néoplasiques et chez les personnes subissant une chimiothérapie (Maintz et Novak, 2007). L'activité réduite de la DAO peut être d'origine génétique ou acquise, avec plusieurs causes capables de compromettre de façon permanente ou ponctuelle soit l'expression ou l'activité de la DAO (Comas-Basté *et al.*, 2020a).

1.2.2 Applications thérapeutiques de la diamine oxydase

Durant cette dernière décennie, plusieurs recherches ont été focalisées sur les maladies liées à l'histamine ainsi que sur les traitements qui peuvent traiter ces différents troubles. Aucun traitement pharmaceutique n'est actuellement disponible pour contrôler le niveau d'histamine intestinale. Diverses approches thérapeutiques ont été suggérées :

- a) Un régime pauvre en histamine dont le principe repose sur le choix d'aliment faible en amine biogènes et histamine. Ce régime conduit à une amélioration du système digestif et même à l'augmentation du taux de la DAO.

- b) Les agents antihistaminiques : Les agents antihistaminiques ciblant les récepteurs de l'histamine peuvent aider à soulager les dysfonctionnements entériques induits par l'histamine.

Le traitement des histaminoses alimentaires avec des antihistaminiques est empirique. Il n'existe pas d'essais cliniques randomisés qui prouvent la contribution de cette thérapie dans les intolérances à l'histamine. Les dosages thérapeutiques et le choix du type d'antihistaminique (H1 / H2) dépendent des symptômes manifestés (gastro-intestinaux, neurologiques, dermatologiques). Les bloqueurs H2 pourraient être utilisés chez les patients présentant des symptômes gastro-intestinaux dominants. Pourtant, ces antagonistes des récepteurs de l'histamine peuvent également provoquer des effets secondaires tels qu'une éruption cutanée, une sécheresse de la bouche, une rétention urinaire, de la somnolence et du délire. Le traitement avec des antihistaminiques doit être concis et limité dans le temps (Hrubisko *et al.*, 2021).

- c) Apport de supplément exogène de la DAO : l'administration orale des CuAOs (DAO), une enzyme catabolique pour diverses amines biogènes, a été suggérée comme utile pour diminuer le niveau d'amines biogéniques contenues dans les aliments. En particulier, la DAO du rein de porc (pkDAO) a été indiquée comme une enzyme efficace pour cataboliser l'histamine (Hrubisko *et al.*, 2021).

Divers produits commerciaux existent sur le marché visant à soulager les symptômes liés à l'histamine, mais la faible activité de la diamine oxydase en provenance de rein de porc limite son utilisation. Des suppléments de DAO végétale administrés par voie orale ont été suggérés pour remplacer celle en provenance de rein de porc en vue de son efficacité et son acceptabilité par les personnes suivant des régimes alimentaires (végétariens, végétans ou autre) et aussi par les personnes ayant des restrictions religieuses par rapport à la consommation de porc.

Calinescu *et al.*, (2012) ont proposé la formulation de la DAO extraite à partir de pois verts (PSDAO ; DAO de *Pisum sativum*) en présence de catalase à différentes concentrations, avec comme excipient le carboxyméthyl amidon avec le chitosan (CMS:chitosan) (Calinescu *et al.*, 2012). Une autre étude récente sur la DAO végétale (vDAO) seule ou en association avec la catalase, a montré que l'H₂O₂ produit par la DAO et l'histamine à des concentrations supérieures à 1 mM est toxique pour les cellules Caco-2 et qu'en présence de catalase, l'augmentation de la

toxicité de l’histamine induite par le DAO a été abolie. Les derniers travaux de Neree *et al.*, (2020) ont permis de tester le potentiel thérapeutique de la vDAO en se concentrant sur l’effet bien connu de l’histamine sur la motilité intestinale et ont révélé que la vDAO est plus puissante que les médicaments antihistaminiques commerciaux pour inhiber la contraction induite par l’histamine des muscles distaux du côlon murins, et ce, en utilisant des tests *ex vivo* et *in vitro*. De plus, ils ont découvert que la vDAO administrée par voie rectale peut être retenue sur la muqueuse intestinale et rester active. Ces observations font de l’administration de la vDAO dans la lumière intestinale un traitement alternatif valide pour les dysfonctionnements intestinaux induits par l’histamine (Neree *et al.*, 2020).

1.3 Lyophilisation et conservation des protéines

La formulation des enzymes thérapeutiques et leur utilisation dans le traitement des différentes maladies nécessite des produits en poudre. L’état solide est aussi le choix préféré pour le stockage des protéines thérapeutiques afin de prolonger la stabilité et de préserver l’activité biologique en diminuant la dégradation physique et chimique associée aux formulations de protéines liquides. La lyophilisation est une méthode de séchage efficace pour pallier les problèmes d’instabilité des protéines et aussi faciliter les manipulations, le transport et le stockage.

1.3.1 Principe de la lyophilisation

La lyophilisation ou *freeze-drying* est un procédé connu depuis l’Antiquité, depuis 1250 av. J.-C., pour préserver le matériau en déshydratant l’échantillon. Le processus de lyophilisation comprend d’abord la congélation de l’échantillon puis le séchage à très basse température sous vide (ou à basse pression) (Varshney et Singh, 2015). La lyophilisation se produit parfois dans la nature mais elle est assez rare, car elle nécessite des conditions extrêmes : la substance (matière) doit être maintenue gelée dans une atmosphère très sèche en même temps que l’énergie nécessaire pour créer le changement de phase du solide à la vapeur soit fournie. De telles conditions peuvent se produire par temps froid, mais ensoleillé. La condition préalable est de maintenir la pression partielle de vapeur d’eau basse (Fissore *et al.*, 2019; Snowman, 1997).

Un lyophilisateur comprend un certain nombre de composants essentiels incluant : une chambre de produit (qui peut abriter un certain nombre d’étagères à température contrôlée), un

condenseur de processus (également connu sous le nom de piège à froid) dans lequel la solution peut être refroidie à la température requise et une pompe à vide (généralement une pompe à palettes rotatives). Une autre exigence est un moyen de chauffer la matière congelée, afin de sublimer la glace et d'éliminer l'eau résiduelle non gelée, piégée dans le produit solidifié. Enfin, un condenseur est nécessaire pour éliminer et condenser la vapeur d'eau de la proximité du produit solidifié pendant le processus de séchage. D'autres caractéristiques peuvent varier en fonction de la taille et des exigences opérationnelles du système et des approches choisies par les fabricants d'équipement (Franks et Auffret, 2008; Ward et Matejtschuk, 2021b). Un schéma représentant les principaux éléments composant un lyophilisateur est présenté dans la Figure 1.12.

Les équipements modernes comprennent également des systèmes de contrôle et de surveillance informatisés grâce auxquels un programme de cycle de séchage souhaité peut être pré-réglé. La solution à lyophiliser (sécher) est généralement contenue dans des flacons ou des ampoules, reposant sur les étagères du lyophilisateur ou parfois dans des seringues. Alternativement, comme dans le cas de la fabrication à grande échelle d'enzymes ou de bactéries, la solution peut être versée dans des plateaux ouverts qui sont ensuite placés sur les étagères du lyophilisateur. Le système d'échange de chaleur est alimenté par une pompe qui circule le fluide à travers les étagères. Le système de circulation doit être capable de maintenir la température de l'étagère aux valeurs souhaitées. (Ward et Matejtschuk, 2021b).

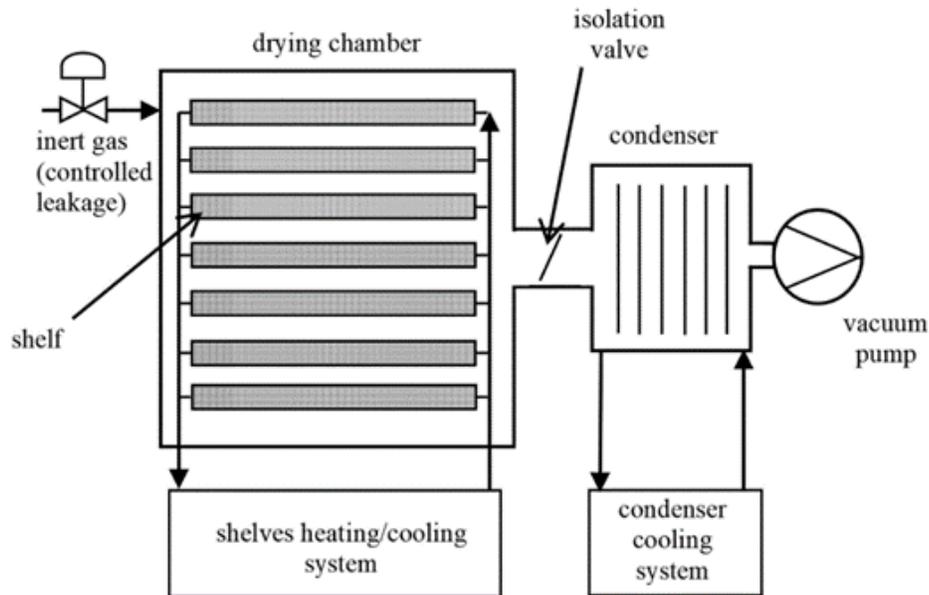


Figure 1.12 Schéma général représentant les principaux composants d'un lyophilisateur. D'après (Fissore *et al.*, 2019).

1.3.2 Processus de lyophilisation

Le cycle de lyophilisation consiste en une séquence de trois processus distincts : (i) refroidissement en dessous de la température de congélation (T_f) afin de maximiser la teneur en glace ; (ii) sublimation (aussi appelée chauffage primaire) de la glace à une certaine température de sous-congélation, généralement effectuée sous pression réduite; et enfin, (iii) le chauffage secondaire qui consiste à l'élimination de l'eau résiduelle non congelée de la solution solidifiée (Franks et Auffret, 2008).

1.3.2.1 Sublimation

Dans le processus de congélation, le solvant (généralement l'eau) forme des cristaux de glace, en raison de son état en surfusion et se sépare du soluté. Au fur et à mesure que le processus de congélation se poursuit, le soluté devient très concentré et est appelé concentré de congélation. La formation de cristaux de glace et leur taille dépendent grandement du degré de surfusion, de la température de nucléation et de la vitesse de refroidissement (Butreddy *et al.*, 2021). L'étape de la congélation induit un stress aux protéines, ce qui les déstabilise, incluant : l'augmentation de la concentration en protéines, le changement de pH, la formation d'une interface glace-eau,

l'augmentation de la force ionique et la séparation de phase. Les différents types de stress seront détaillés dans la section 1.3.4.

1.3.2.2 Séchage primaire

Après l'étape de congélation, l'évaporation du solvant de la glace se produit par sublimation. L'étape de séchage primaire consiste à élever la température de la plate-forme du lyophilisateur en dessous de la température critique (transition vitreuse : T_g , température de fusion : T_m et température d'effondrement : T_c) du produit congelé en utilisant la pression de la chambre, qui doit être inférieure à la pression de vapeur de la glace à la température cible. Cette différence entre la pression de la chambre et la pression de vapeur de glace sert de force motrice pour la sublimation de la glace. En général, la lyophilisation des protéines est effectuée à une température inférieure à la T_g ou à la T_c car le taux de déploiement des protéines est lent (en dessous de la T_g). Les paramètres du procédé tels que la température et la durée de séchage primaire, la vitesse de rampe de chauffage, la pression de la chambre peuvent influencer la qualité du produit protéique lyophilisé (Butreddy *et al.*, 2021; Ward et Matejtschuk, 2021a).

1.3.2.3 Séchage secondaire

Après séchage primaire, une bonne quantité d'humidité résiduelle (humidité liée) qui peut être: de l'eau de cristallisation; de l'eau dispersée au hasard dans un matériau vitreux; l'eau intracellulaire; ou l'eau absorbée présente dans la phase de soluté, est éliminée par désorption lors du séchage secondaire (Snowman, 1997). La température de conservation et la pression de la chambre dans le séchage secondaire sont respectivement plus élevées et plus basses que celles utilisées pour le séchage primaire (Butreddy *et al.*, 2021). L'élimination de l'eau résiduelle augmente la température de transition vitreuse (T_g) des solides non cristallins. Pendant les deux périodes de séchage primaire et séchage secondaire initiale, la température et la vitesse de chauffage ne doivent pas être trop élevées en raison de problèmes de stabilité tels que la biodégradation ou la polymérisation des protéines (Izutsu, 2018). Une température élevée et un temps court sont généralement recommandés car ils réduisent la durée du processus. La température, la pression de la chambre et la durée du séchage secondaire doivent être optimisées en tenant compte de la teneur en humidité cible du produit lyophilisé final ; le niveau d'humidité dans le produit séché est essentiel car il influence la structure protéique (Butreddy *et al.*, 2021).

1.3.3 Application de la lyophilisation dans l'industrie pharmaceutique

La lyophilisation offre un format stable et robuste avec un poids considérablement réduit pour faciliter le stockage et l'expédition; elle assure la stabilisation des matériaux qui ne sont pas facilement stabilisés par les technologies de séchage conventionnelles, qui ont tendance à utiliser des températures plus élevées. Le produit peut être scellé sous vide ou sous un gaz inerte, ce qui peut réduire la dénaturation oxydative des produits (Ward et Matejtschuk, 2021a).

Les protéines deviennent une classe importante de médicaments dans les soins de santé humaine. Cependant, leur stabilité marginale présente encore des défis dans leur utilisation à des fins pharmaceutiques et industrielles (Liu et Zhou, 2021). La lyophilisation est une technique de séchage largement utilisée dans le développement des protéines thérapeutiques en forme solide. Les protéines en solution ont des problèmes d'instabilité, tels que l'agrégation, la dénaturation et la solubilisation des protéines thermodynamiquement instables. De plus, les formulations solides de protéines offrent souvent une stabilité physique et chimique améliorée par rapport à leurs homologues en solution et peuvent surmonter les problèmes de stabilité pendant le stockage et simplifier le transport et la distribution. La nature délicate des protéines combinée avec la faible stabilité en solution durant le stockage font de la lyophilisation une méthode fiable pour le séchage des protéines à usage thérapeutique (Butreddy *et al.*, 2021; Izutsu, 2018; Mutukuri *et al.*, 2021).

La lyophilisation est largement utilisée dans les industries biotechnologiques, pharmaceutiques et biomédicales. Dans l'industrie pharmaceutique, la lyophilisation est utilisée pour déshydrater ou concentrer des produits chimiques ou pharmaceutiques réactifs. La lyophilisation est utilisée pour conserver et stocker des produits de grande valeur tels que des vaccins, des cytostatiques, des antibiotiques, des produits biologiques (des virus, des bactéries, des levures, des liposomes, sérum sanguin), des hormones, des ingrédients actifs et des réactifs (composants et/ou réactifs utilisés pour la réaction en chaîne par polymérase (PCR)), des collagènes, et des électrolytes. (Varshney et Singh, 2015; Ward et Matejtschuk, 2021a).

1.3.4 Impact de la lyophilisation sur les protéines

Le processus de lyophilisation génère une variété de contraintes pouvant dénaturer les protéines. Inclut : le stress à basse température, les contraintes de congélation, y compris la

formation de cristaux de glace dendritiques, l'augmentation de la force ionique, la modification du pH, la séparation de phase et le stress de séchage (élimination de la coquille d'hydratation des protéines) (Chang et Pikal, 2009; Hansen *et al.*, 2015; Liu et Zhou, 2021; Wang, 2000). La figure 1.13 résume les différents types de stress sur les protéines due à la lyophilisation.

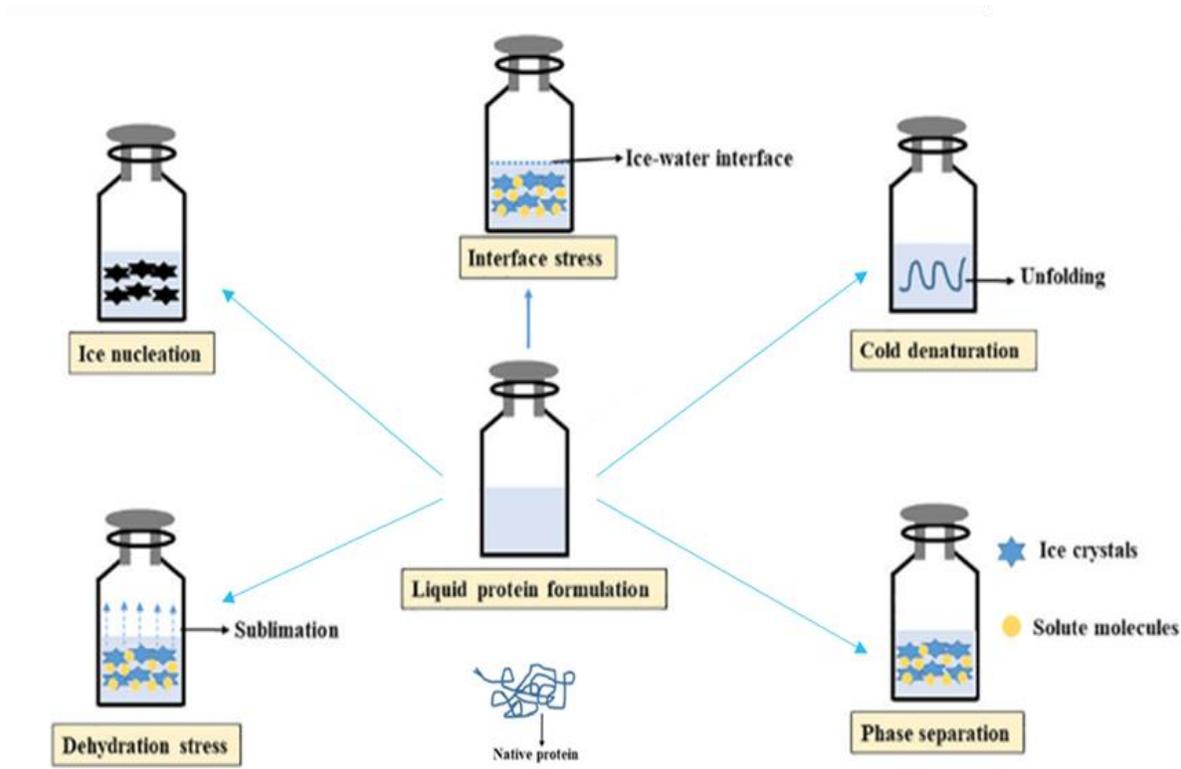


Figure 1.13 Différents types de stress liés à la lyophilisation des protéines thérapeutiques. Adapté de (Butreddy *et al.*, 2021).

1.3.4.1 Stress à basse température

Plusieurs études ont montré que les basses températures peuvent engendrer la dénaturation des protéines, aussi appelé la dénaturation à froid. Les protéines ont une température de stabilité optimale. Des températures au-dessus ou en dessous de celle-ci peuvent déstabiliser la protéine et ainsi la dénaturer.

1.3.4.2 Effet de concentration

La congélation d'une solution protéique augmente rapidement la concentration de tous les solutés en raison de la formation de glace. Ainsi, toutes les propriétés physiques liées à la concentration peuvent changer, telles que la force ionique et la composition relative des solutés en raison de la cristallisation sélective. Ces changements peuvent potentiellement déstabiliser une protéine. Généralement, l'abaissement de la température réduit le taux de réactions chimiques. Cependant, ces dernières peuvent en fait s'accélérer dans une solution aqueuse partiellement congelée en raison de l'augmentation de la concentration de soluté.

1.3.4.3 Formation de l'interface glace-eau.

La congélation d'une solution protéique génère une interface glace-eau. Les protéines peuvent être adsorbées à l'interface, desserrant le repliement natif des protéines et entraînant une dénaturation induite par la surface. Le refroidissement rapide génère une grande interface glace-eau, tandis qu'une interface plus petite est induite par un refroidissement lent.

1.3.4.4 Le changement du pH pendant la congélation.

De nombreuses protéines ne sont stables que dans une plage de pH étroite. À des pH extrêmes, une répulsion électrostatique accrue entre les groupes chargés dans les protéines a tendance à provoquer le déploiement ou la dénaturation des protéines.

1.3.4.5 Séparation de phase pendant la congélation.

La congélation des solutions de polymères peut provoquer une séparation de phase en raison de la solubilité altérée des polymères à basse température et créer un excès important d'interface, dénaturant la protéine.

1.3.4.6 Stress de déshydratation.

Une protéine entièrement hydratée a une monocouche d'eau couvrant la surface de la protéine, appelée coquille d'hydratation. Durant la lyophilisation cette coquille est partiellement éliminée avec le reste de l'eau en solution, ce qui peut perturber l'état natif d'une protéine et provoquer une dénaturation. Une protéine hydratée, lorsqu'elle est exposée à un environnement pauvre en eau pendant la déshydratation, a tendance à transférer des protons aux groupes carboxyles ionisés et

abolit ainsi autant de charges que possible dans la protéine. La diminution de la densité de charge peut faciliter l'interaction hydrophobe protéine-protéine, provoquant ainsi leur agrégation (Chang et Pikal, 2009; Hansen *et al.*, 2015; Liu et Zhou, 2021; Wang, 2000).

1.3.5 Stabilisateurs pour la cryo- et la lyoprotection des protéines

Chaque étape du processus de lyophilisation incluant la congélation et le séchage (déshydratation) peut induire la dénaturation des protéines. Afin de protéger une protéine durant la congélation (cryoprotection) et/ou la déshydratation (lyoprotection) de la dénaturation et préserver l'activité protéique, un ou plusieurs stabilisateurs protéiques peuvent être utilisés. Ces stabilisants sont également appelés additifs chimiques, co-solvants ou excipients (Wang, 2000) ou encore agents cryoprotecteurs (ACPs) (Butreddy *et al.*, 2021). Le tableau 1.2 résume quelques exemples de cryoprotecteurs communément utilisés pour la stabilisation des protéines.

1.3.5.1 Les polymères

Les polymères sont utilisés comme agents protecteurs car ils peuvent augmenter la température de transition vitreuse de la solution à lyophiliser. Généralement, les agents protecteurs de type polymère présentent les caractéristiques suivantes : ils se cristallisent en premier pendant le processus de congélation, ont une activité de surface plus élevée, augmentent la viscosité de la solution et la température de transition vitreuse (T_g) (Hua *et al.*, 2010).

1.3.5.2 Les acides aminés (AAs)

Un acide aminé est une molécule contenant à la fois des groupes fonctionnels amine et carboxyle. Il peut prévenir les changements de pH de la solution pendant le stockage à basse température et la lyophilisation des protéines (Hua *et al.*, 2010; Liu et Zhou, 2021). Les AA sont généralement utilisés avec du saccharose ou du tréhalose et ont rarement été utilisés seuls dans les formulations lyophilisées. Ceci est probablement dû à leur effet stabilisateur inférieur à celui des sucres. Cependant, dans presque toutes ces études, l'ajout d'AA à la formulation a permis de renforcer l'effet stabilisateur des sucres, ce qui en fait un stabilisateur secondaire approprié dans la formulation (Thakral *et al.*, 2021).

Tableau 1.2 Différents cryoprotecteurs utilisés pour la stabilisation des protéines durant la lyophilisation. D'après (Liu et Zhou, 2021).

Classe	Nom	Formule chimique	Poids moléculaire (g/mol)
Sucres et polyols	Glucose Galactose Mannose Fructose	$C_6H_{12}O_6$	180,156
	Sucrose Lactose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,3
	Maltose monohydrate	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	360,32
	Tréhalose-dihydrate	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$	378,34
	Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	182,17
	Glycérol	$C_3H_8O_3$	92,09
	Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	182,17
Polymères	Polyethylene glycol (PEG)	$H[OCH_2CH_2]_nOH$	$2-400 \times 10^2$
	Dextran	$[C_6H_{10}O_5]_n$	$1-200 \times 10^4$
Surfactants	Tween 80	$C_{64}H_{124}O_{26}$	1310
	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	244,33
Acide aminés	Proline	$HN(CH_2)_3CHCOOH$	115,13
	Glycine	$H_2N(CH_2)COOH$	75,05
	Acide Glutamique	$H_2N(CH_2)_2(COOH)_2$	147,13
	Histidine	$NHCHNCHCCH_2CH(NH_2)COOH$	155,16
	Lysine L-Serine	$H_2N(CH_2)_4CH(NH_2)COOH$ $HOCH_2CH(NH_2)COOH$	146,19 105,09

1.3.5.3 Les surfactants ou agents tensioactifs

Les surfactants ou agents tensioactifs sont composés de groupes hydrophiles et oléophiles qui peuvent réduire la tension superficielle d'un liquide et réduire la tension interfaciale entre deux liquides. Ils sont solubles dans l'huile à cause des chaînes $(CH-CH)_n$ et soluble dans l'eau à cause

des groupes polaires (-COOH, -OH). Lorsque ces molécules sont situées à une interface air-eau ou huile-eau, les groupes hydrophiles font face à la phase aqueuse, tandis que les groupes oléophiles pointent vers la phase gazeuse et huileuse. Dans la lyophilisation des protéines, les agents tensioactifs peuvent réduire la dénaturation pendant la congélation et la déshydratation (Fissore *et al.*, 2019; Izutsu, 2018).

1.3.5.4 Sucres ou polyols

De nombreux sucres ou polyols sont utilisés comme stabilisants protéiques en solution, à l'état congelé, lors de la lyophilisation, ou du stockage du produit (Chang *et al.*, 2005a). Le niveau de stabilisation accordé dépend de leur concentration. Généralement, un rapport pondéral de sucre par rapport aux protéines d'au moins 1:1 est nécessaire pour une bonne stabilité (Thakral *et al.*, 2021). Les sucres non réducteurs tels que saccharose et tréhalose (Fig.1.14) sont les cryoprotecteurs les plus utilisés pour stabiliser les protéines. Les petites molécules de sucre flexibles sont capables de couvrir la surface des protéines, formant des liaisons hydrogène avec les molécules de protéines. Les deux disaccharides forment des matrices amorphes, qui sont essentielles pour la stabilisation des protéines. Ainsi, ils agissent à la fois comme cryo- et lyoprotectants (Fissore *et al.*, 2019). Les sucres réducteurs tels que le lactose et le maltose doivent être évités dans les formulations protéiques en raison des implications, y compris la réaction de Maillard et la glycation des protéines.

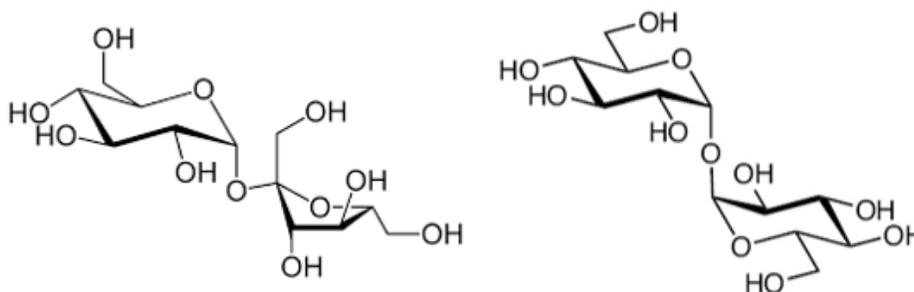


Figure 1.14 Structures moléculaires de perspective de disaccharides. À gauche Sacrose et à droite tréhalose.

Ces sucres réducteurs peuvent interagir avec la chaîne latérale des acides aminés de la molécule de protéine et provoquer une altération de la structure chimique de la protéine (Butreddy *et al.*, 2021). Le mannitol et le sorbitol sont utilisés comme agents de charge, et le glycérol est utilisé comme agent cryoprotecteur (Liu et Zhou, 2021).

1.3.5.5 Autres excipients

Les agents de charge sont des substances qui peuvent empêcher les composants efficaces de la formulation de s'échapper avec la vapeur d'eau et favoriser leur fixation dans le matériau. Les composés de charge typiques sont le mannitol, le lactose et la gélatine. L'ajout d'agents de charge (faciles à cristalliser) dans la formulation des produits lyophilisés a des fonctions supplémentaires telles que : (1) fournir un soutien mécanique adéquat pour les produits lyophilisés finaux, (2) améliorer l'apparence des produits lyophilisés, (3) augmenter la solubilité des solutés et (4) empêcher les produits lyophilisés de s'effondrer ou de déborder. Les antioxydants, tels que la vitamine D, la vitamine E, certains hydrolysats de protéines et l'hyposulfite de sodium, sont utilisés pour prévenir l'oxydation pendant la lyophilisation et le stockage. Les agents tampons et chélatants, tels que l'acide phosphorique, les acides aminés et l'EDTA, régulent la valeur du pH du matériau et séquestrent les ions (Hua *et al.*, 2010; Liu et Zhou, 2021).

1.3.6 Mécanisme de stabilisation des protéines

Chaque étape du processus de lyophilisation, passant du remplissage à la reconstitution du produit final peut affecter la stabilité des protéines. Ainsi, l'inclusion de composants de formulation et l'optimisation du processus de lyophilisation est nécessaire pour inhiber la dégradation et préserver l'activité des protéines lors des étapes de congélation, de séchage et de réhydratation.

Les principaux mécanismes responsables de la stabilisation des protéines au cours de la lyophilisation comprennent : (i) le remplacement de l'eau, (ii) la vitrification (Butreddy *et al.*, 2021; Cicerone *et al.*, 2015; Izutsu, 2018). Les autres mécanismes de stabilisation comprennent : l'interaction excipient-protéine via un proton aminé, la formation d'une sphère d'hydratation structurellement similaire et uniforme à celle de la protéine native, la liaison au ligand et l'accumulation d'excipients autour de types d'acides aminés spécifiques (Butreddy *et al.*, 2021).

1.3.6.1 Hypothèse de substitution de l'eau

La théorie du remplacement de l'eau décrit la stabilisation d'un point de vue thermodynamique (Mensink *et al.*, 2017). La stabilité thermodynamique est conférée en décalant l'équilibre entre les états natifs et dépliés en faveur de l'état primaire. L'instabilité thermodynamique permet le déploiement des protéines, ce qui est quelque peu similaire à un changement de phase. Les contraintes de congélation ou de séchage peuvent modifier la stabilité thermodynamique et peuvent induire ou faciliter le déploiement des protéines qui non seulement peut conduire à une dénaturation irréversible de la protéine, mais peut également réduire la stabilité de stockage dans le solide séché (Chang et Pikal, 2009).

La stabilisation par le mécanisme de remplacement ou de substitution de l'eau implique la formation de liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyles (-OH) de stabilisants (sucres) et les groupes polaires des molécules de protéines en remplaçant la liaison hydrogène entre les molécules d'eau et les composants protéiques pendant le processus de séchage (Butreddy *et al.*, 2021; Kawai et Suzuki, 2007; Mensink *et al.*, 2017). La structure native est maintenue pendant le traitement par stabilisation thermodynamique de la conformation native. La préservation de la structure native pendant le traitement joue un rôle important dans la stabilité du stockage à l'état solide (Chang et Pikal, 2009).

1.3.6.2 Hypothèse de la vitrification

La vitrification est basée sur l'immobilisation des molécules de protéines par la matrice de stabilisateurs amorphes, empêchant ainsi l'interaction protéine-protéine et protégeant la structure native des protéines contre le stress lors de la lyophilisation. Le mécanisme de vitrification représente la stabilisation cinétique, qui est liée à la température de transition vitreuse (T_g) caractéristique d'une matrice vitreuse contenant un stabilisateur amorphe et une protéine (Butreddy *et al.*, 2021). De plus, la cristallisation de petites molécules telles que le sucre peut se produire lorsque le système est à l'état caoutchouteux (c'est-à-dire quand la température de la molécules est au-dessus de la T_g), ce qui peut avoir des effets néfastes sur les protéines (Mensink *et al.*, 2017).

Les deux théories de stabilisation des protéines à savoir : la substitution de l'eau et la vitrification permettent toutes deux de préserver la structure de la protéine, en empêchant la

mobilité moléculaire et en empêchant les changements dans la structure des protéines, respectivement.

CHAPITRE 2

PRÉSENTATION DU PROJET

Considérant l'intérêt croissant pour l'utilisation des formulations orales à base de diamine oxydase comme agent thérapeutique pour le traitement des histaminoses alimentaires et autres dysfonctions liées à l'histamine, ce projet de maîtrise vise l'étude de la stabilité de la diamine végétale (vDAO) en provenance de *Pisum sativum*. En raison de sa structure complexe et suite à l'extraction en produit liquide, la vDAO est sujette à l'inactivation et au déploiement durant le processus de production et/ou stockage.

La formulation et la conservation des enzymes thérapeutiques en forme liquide présentent un grand défi. Alors que les formulations liquides sont généralement préférées pour les protéines thérapeutiques injectables (en ce qui concerne la commodité pour l'utilisateur final et de facilité de préparation pour le fabricant), cette forme n'est pas toujours réalisable étant donné la susceptibilité des protéines à la dénaturation et à l'agrégation sous des contraintes telles que le chauffage, la congélation, les changements de pH et l'agitation, qui pourraient tous entraîner une perte d'activité biologique. De plus, l'eau médie l'hydrolyse et la désamidation ; ces réactions ainsi que d'autres voies de dégradation chimique, telles que l'oxydation, sont accélérées dans des conditions aqueuses, ce qui rend la formulation impropre au stockage à long terme. Les formulations solides de protéines offrent souvent une stabilité physique et chimique améliorée par rapport à leurs homologues en solution, bien que cette stabilité dépend du type d'excipient, du rapport protéine-excipient, de la concentration en protéines et de la méthode de séchage. La lyophilisation, ou freeze drying, est souvent utilisée pour augmenter la stabilité et la durée de conservation des produits pharmaceutiques. Toutefois, ce processus cause des contraintes liées à la congélation et à la déshydratation des protéines, ce qui peut entraîner une altération de la structure de la DAO et une certaine perte de son activité enzymatique pendant la procédure de séchage.

Des excipients tels que des disaccharides (saccharose, tréhalose), des polyols, des acides aminés, des agents tensioactifs sont couramment utilisés dans les formulations pour maintenir la structure des protéines et améliorer leur stabilité. L'utilisation de ces excipients a fait l'objet de plusieurs études approfondies. Le saccharose (communément appelé sucrose) et le tréhalose sont

couramment utilisés dans les formulations des protéines thérapeutiques; ils vont agir comme cryoprotecteurs pendant la congélation et comme lyoprotecteurs pendant les étapes de séchage pour préserver la structure des protéines et améliorer leur stabilité durant le stockage.

Dans le cadre de ce projet, le sucrose et le tréhalose ont été utilisés en vue du processus de lyophilisation pour stabiliser la diamine oxydase végétale extraite des pois verts. Le mécanisme de stabilisation des protéines par les sucres repose sur la théorie de la substitution de l'eau. Grâce à leurs groupes hydroxyles, les disaccharides vont établir des liaisons type hydrogènes (Fig. 2.1) en remplaçant celles établies entre la protéine et l'eau, ce qui va permettre de stabiliser la conformation de l'enzyme et contribuera à préserver son activité tout au long du séchage et du stockage.

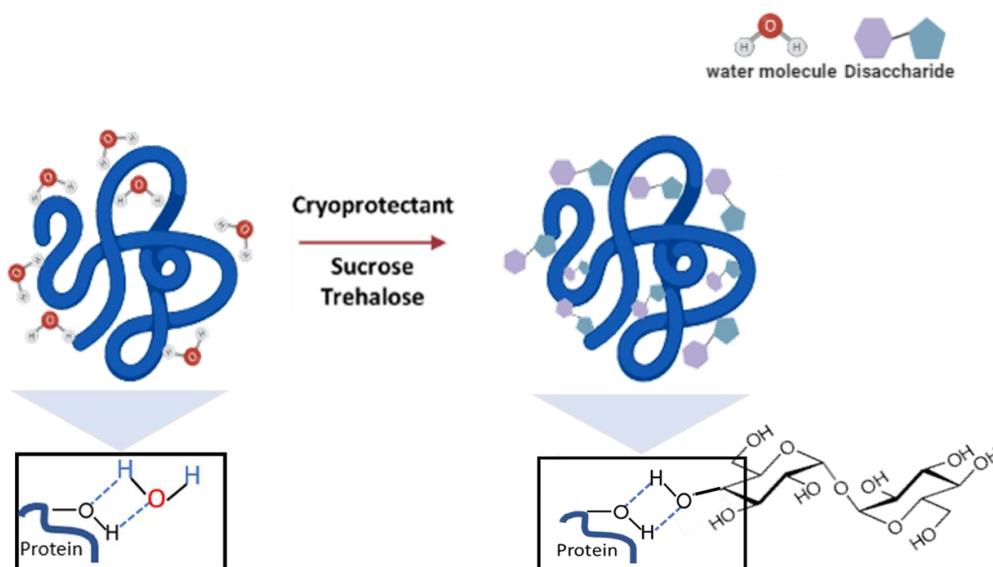


Figure 2.1 Schéma hypothétique du mécanisme de stabilisation de la DAO par les disaccharides.

Ce projet se divise en deux parties principales :

La première est l'étude des propriétés morphologiques, physico-chimiques, cinétiques, et aussi la stabilité de la DAO après lyophilisation (Fig. 2.2). Afin de comparer les paramètres morphologiques caractéristiques des lyophilisats en présence et en absence des cryoprotecteurs, une observation en microscopie électronique à balayage a été réalisée. Les propriétés thermiques de l'enzyme sont analysées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et par analyse

thermogravimétrie (TGA). L'activité de l'enzyme est suivie et mesurée au cours du temps à deux conditions de stockage différentes : (-20 °C) et (4 °C).

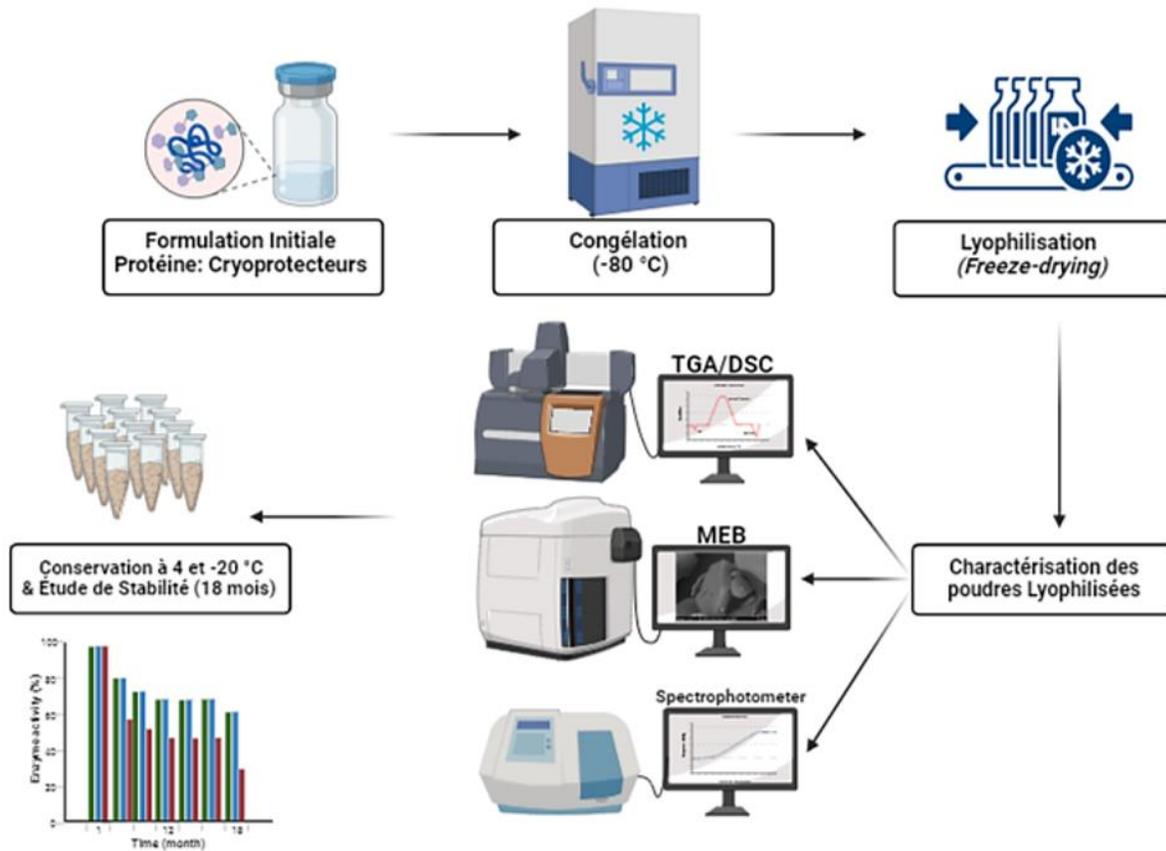


Figure 2.2 Procédé expérimental de la première phase du projet.

La deuxième partie du projet (Fig. 2.3) met l'accent sur l'étude de la stabilité de l'enzyme végétale après formulation en comprimés monolithiques et sur l'étude de l'effet des cryoprotecteurs ajoutés avant la lyophilisation sur son comportement *in vitro* dans le milieu gastrique et intestinal simulés.

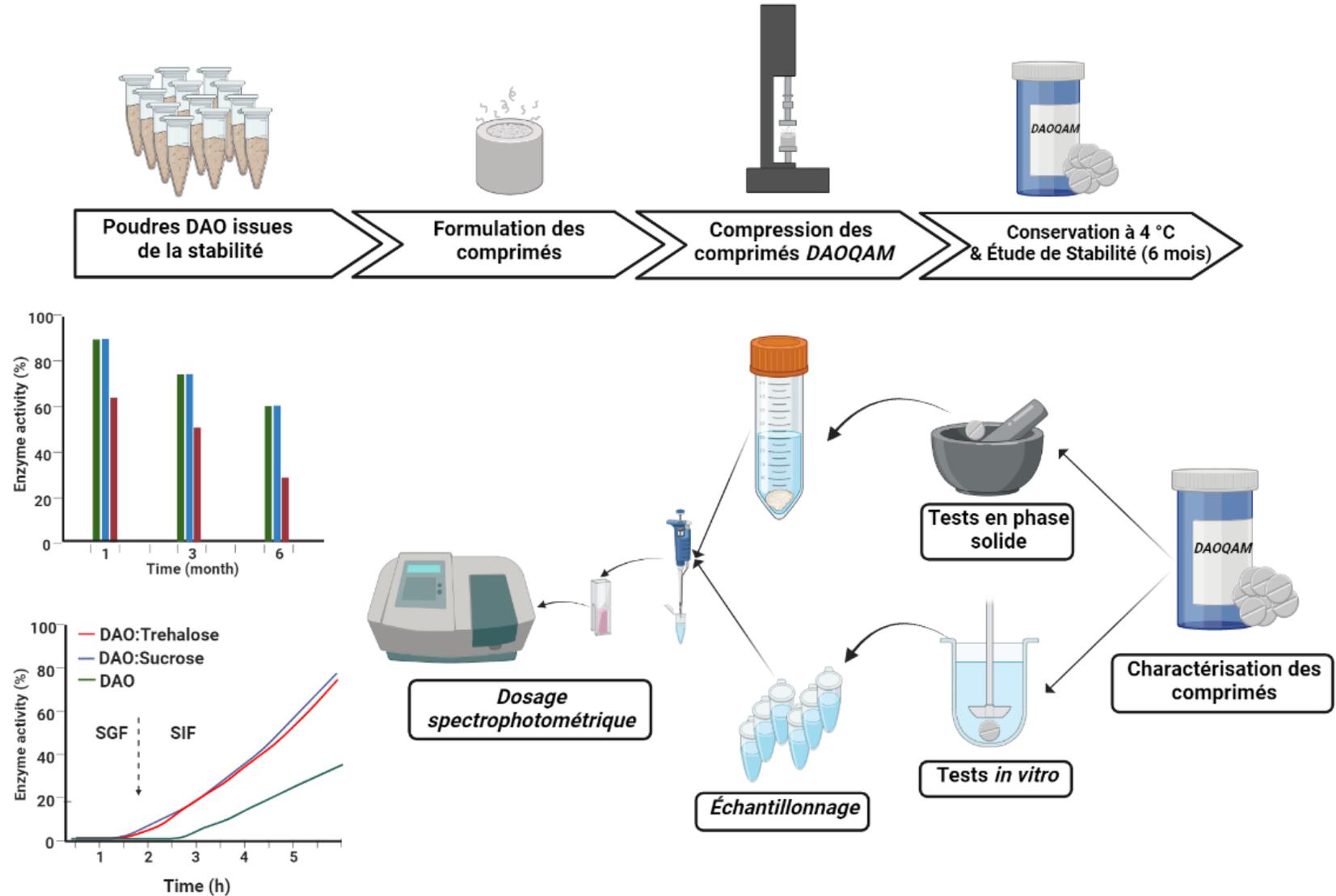


Figure 2.3 Procédé expérimental de la deuxième phase du projet.

CHAPITRE 3
ARTICLE SCIENTIFIQUE

ENHANCED STABILITY OF VEGETAL DIAMINE OXIDASE WITH TREHALOSE AND
SUCROSE AS CRYOPROTECTANTS: MECHANISTIC INSIGHTS

Meriem Megoura, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Research Chair on Enteric Dysfunctions “*Allerdys*”
& CERMO-FC Centre, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Branch A, Montreal, QC H3C
3P8, Canada.

Cet article a été publié dans le journal *Molecules*, 2023, 28(3), 992.

DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28030992>

This article belongs to the Section *Medicinal Chemistry*.

*Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu

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

Phone: +1 (514) 987 4319

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

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Meriem Megoura a participé à l'élaboration du concept du projet; était responsable de toutes les parties expérimentales et de la rédaction de la première version du manuscrit. Elle était chargée de la préparation des protocoles, du traitement des résultats et de la recherche bibliographique.

Pompilia Ispas-Szabo a participé à l'élaboration du concept et la coordination du projet. Elle a participé à la rédaction et à la correction du manuscrit.

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

3.1 Résumé

Les dysfonctions entériques sont courantes dans divers troubles intestinaux liés à l'histamine. La diamine oxydase végétale (vDAO), une enzyme capable de décomposer l'histamine et donc de réduire les dysfonctions liées à l'histamine, a été formulée sous forme de comprimés gastro-résistants pour administration orale comme complément alimentaire et éventuellement comme agent thérapeutique. La stabilité des protéines constitue un enjeu majeur pour leur utilisation dans le domaine pharmaceutique. Dans cette étude, le vDAO a été lyophilisé en l'absence ou en présence de sucrose ou de tréhalose comme cryoprotecteurs puis formulé sous forme de comprimés. La stabilité des préparations obtenues a été suivie pendant le stockage à 4°C et -20°C pendant 18 mois. Avec les poudres de vDAO formulées sous forme de comprimés, des tests de dissolution *in vitro* ont été effectués dans des fluides gastriques et intestinaux simulés. Les comprimés obtenus avec de la poudre de vDAO lyophilisée avec des cryoprotecteurs de saccharose ou de tréhalose offraient une meilleure protection de l'activité enzymatique. De plus, la libération de vDAO lyophilisée avec des cryoprotecteurs était d'environ 80% de l'activité totale chargée (unités enzymatiques) contre 20% pour le témoin (poudre de vDAO préparée sans cryoprotecteurs). Cette étude a révélé le potentiel des cryoprotecteurs de sucrose et de tréhalose pour protéger la vDAO du stress de la lyophilisation et pendant le stockage, et également pour améliorer nettement les performances de libération de la vDAO des comprimés obtenus avec les poudres préparées.

Mots clés : Diamine oxydase végétale; dysfonctions entériques ; histamine; gastro-protection; lyophilisation; stabilité; sucrose; tréhalose.

3.2 Abstract

Enteric dysfunctions are common for various histamine-related intestinal disorders. Vegetal diamine oxidase (vDAO), an enzyme able to decompose histamine and thus alleviate histamine-related dysfunctions, was formulated in gastro-resistant tablet forms for oral administration as a food supplement and possible therapeutic agent. A major challenge for the use of proteins in the pharmaceutical field is their poor stability. In this study, vDAO was freeze-dried in the absence or in the presence of sucrose or trehalose as cryoprotectants and then formulated as tablets by direct compression. The stability of the obtained preparations was followed during storage at 4 °C and -20 °C for 18 months. *In vitro* dissolution tests with the vDAO powders formulated as tablets were

performed in simulated gastric and in simulated intestinal fluids. The tablets obtained with the powder of the vDAO lyophilized with sucrose or trehalose cryoprotectants offered better protection for enzyme activity. Furthermore, the release of the vDAO lyophilized with the cryoprotectants was around 80% of the total loaded activity (enzyme units) compared to 20% for the control (vDAO powder prepared without cryoprotectants). This report revealed the potential of sucrose and trehalose as cryoprotectants to protect vDAO from freeze-drying stress and during storage, and also to markedly improve the vDAO release performance of tablets obtained with vDAO powders.

Keywords: Histamine; enteric dysfunction; vegetal diamine oxidase; freeze-drying; gastro-protection; stability studies; sucrose; trehalose.

3.3 Introduction

Various pathological conditions such as gut mastocytosis (Potts *et al.*, 2016), severe falciparum malaria (Enwonwu *et al.*, 2000), inflammatory bowel disease (Hodges et Kelly, 2020), recognized as global diseases, are associated with high levels of plasma histamine. In this context, the role of histamine at the level of the intestinal mucosa is of particular awareness. Acting as a “*friend and foe*”, histamine plays a protective role in maintaining a healthy gut (Smolinska *et al.*, 2022) but also produce severe dysfunctions such as enhancement of intestinal permeability, allergic symptoms, altered host-microbiota immune interactions, and disruption of homeostasis, that can lead to severe bowel disorders. The intestinal microbiome is composed of up to 1000 different bacterial species (Pugin *et al.*, 2017). A large range of bacterial strains in the human gut can produce histamine, generating an imbalance of the histamine level. Intestinal histamine-producing bacteria would enhance histamine accumulation in the colon, followed by its absorption into the plasma and the development of several related diseases (Sánchez-Pérez *et al.*, 2022). Furthermore, high levels of histamine are also present in some fermented food (Bodmer *et al.*, 1999), wine (Landete *et al.*, 2005), scombroid fish, and some vegetables (Lavizzari *et al.*, 2007), leading to food intoxication (histaminoses) and frequently related pseudo-allergies (Benly, 2015).

Vegetal diamine oxidase (vDAO) was proposed as an oral enzymatic therapy to treat histamine-related intestinal dysfunctions (Calinescu *et al.*, 2012; Jumarie *et al.*, 2017; Mateescu *et al.*, 2017). Diamine oxidase (EC 1.4.3.22) is a copper amine oxidase (Brazeau *et al.*, 2004) that

catalyzes the oxidative deamination of primary amines such as histamine, tyramine, cadaverine (Boyce *et al.*, 2009), into corresponding aldehydes, ammonia, and hydrogen peroxide (from the concomitant reduction of molecular oxygen) (Mennigen *et al.*, 1990). The enzyme is constituted of dimers of identical subunits from 70 to 90 kDa, each containing a single copper ion and a cofactor covalently bound formed by the post-translational modification of a tyrosine side chain to 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone (Topaquinone, TPQ) (Brazeau *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 1996; Parsons *et al.*, 1995). The DAO was mainly produced and commercialized using pig kidneys (Porcine kidney DAO; pkDAO). More recently, vDAO from *Pisum sativum* supplementation was proposed in capsules and tablet forms. Exogenous DAO supplementation has improved histamine-related symptoms in clinical studies (Hrubisko *et al.*, 2021). Compared to DAO from animal origin (pkDAO), the vDAOs were found to have higher activity in terms of enzyme units (Befani *et al.*, 1995; Pietrangeli *et al.*, 2007), and are safer in terms of side effects. In addition, some sociocultural requirements may limit the consumption of pig components in dietary supplements (Neree *et al.*, 2018). DAO from *Lathyrus sativus* was also reported to reduce histamine toxicity in vitro and was shown to alleviate symptoms in patients suffering from histamine sensitivity (Schnedl *et al.*, 2019).

vDAO is currently obtained as an extract and the enzyme should be dried to obtain oral dosage forms (tablets obtained by direct compression of powders) for oral administration. Proteins in solution may have physical and chemical instability related to aggregation, denaturation, solubilization, oxidation, deamidation, and hydrolysis (Butreddy *et al.*, 2021; Chi *et al.*, 2003). Protein stability is a particularly relevant aspect in the pharmaceutical field and will continue to be more significant as more therapeutic protein products are under investigation (Chi *et al.*, 2003). Freeze-drying, or lyophilization, is a common technique in developing solid-state therapeutic proteins (Fissore *et al.*, 2019; Kawai et Suzuki, 2007; Mutukuri *et al.*, 2021). The process consists of three steps: freezing the protein solution, sublimating the water in primary drying (ice sublimation), and removing additional moisture by secondary drying (Mutukuri *et al.*, 2021). During lyophilization, proteins are subjected to various types of stress (rate of temperature change, osmotic pressure, and pH changes) (Arakawa *et al.*, 2001). The proper choice of excipients and process controls are critical to protect proteins during the freeze-drying process. Various cryoprotective excipients, including disaccharides, polyols, and amino acids, can be added before freeze-drying (Chang *et al.*, 2005a; Izutsu, 2018). Among these, trehalose (TRE) and sucrose (SUC)

disaccharides are often used as stabilizers to protect proteins against the stress of drying and during storage (Cicerone *et al.*, 2015; Mensink *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2009; Wang, 2000). It was hypothesized that these sugars may substitute water around polar residues during drying preventing destabilization of macromolecular assemblies. Consequently, proteins may preserve a certain stability, even without certain amounts of water (Crowe *et al.*, 1998). The prominent mechanistic hypotheses for the phenomena occurring during freeze-drying are: i) water substitution and ii) vitrification (glass dynamics hypothesis) (Chang *et al.*, 2005a; Cicerone *et al.*, 2015; Grasmeyer *et al.*, 2013; Mensink *et al.*, 2017). The concept of water replacement (i) can be classified as a "specific interaction mechanism" (Wang *et al.*, 2009), stating that stabilizers can form hydrogen bonds at specific sites on the protein surface and replace the thermodynamic stabilization function of water lost at drying (Chang *et al.*, 2005a). The vitrification theory (ii) suggests a stabilizer matrix able to induce a kind of immobilization to the protein structures (Mensink *et al.*, 2017). Vitrification prevents undesirable protein-protein interactions and protects the native structure of proteins from damage during lyophilization (Crowe *et al.*, 1998). The kinetic stability of the vitrification process is described by the characteristic glass transition temperature T_g of the glassy matrix comprising the amorphous stabilizer and the protein (Butreddy *et al.*, 2021; Grasmeyer *et al.*, 2013). The stabilization of protein structure during lyophilization does not ensure its stability during long-term storage (Starciuc *et al.*, 2020). It is recommended that the storage temperature should be at least 20 degrees below the glass transition temperature of the solid amorphous matrix (Carpenter *et al.*, 2002). The glass transition temperature is not the only parameter affecting the effectiveness of cryoprotectants. It was suggested that residual moisture may have a decisive influence on the long-term stability of proteins (Carpenter *et al.*, 2002; Tang et Pikal, 2004).

This report is aimed to evaluate the stability of vegetal diamine oxidase during freeze-drying, the long-term storage of powders and tablets, and the behavior of vDAO-tablets obtained with vDAO extracted from *Pisum sativum* seedlings lyophilized with two different disaccharides as cryoprotectants. The morphologic properties, the water content, and T_g of the freeze-dried powders were assayed by scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA), and differential scanning calorimetry (DSC), respectively. The enzyme catalytic activity during the storage period was used as control parameter to evaluate the preparations in both powder and tablet forms.

3.4 Results and discussion

3.4.1 vDAO Activity after lyophilization

The vDAO activity was measured before and after freeze-drying. The remaining activity of the formulations after freeze-drying was 75% for control and slightly higher with sucrose 81%, and 83% with trehalose (Fig. 3.1). The protection was independent of the type of disaccharide.

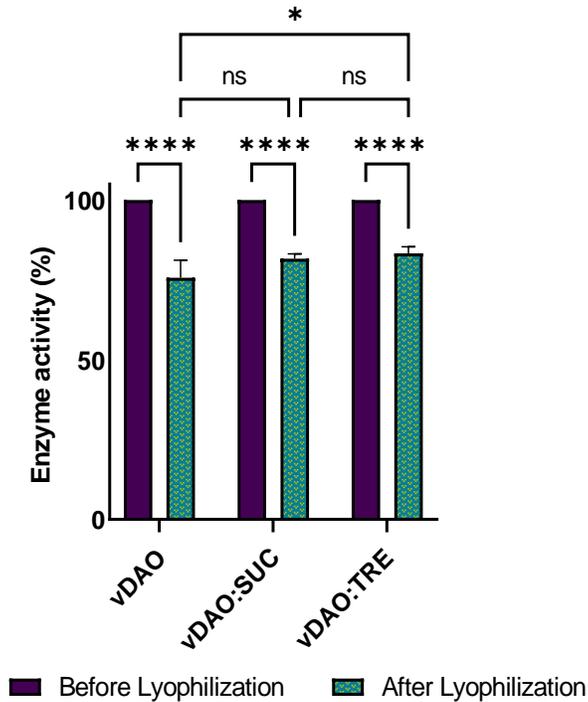


Figure 3.1 Effect of lyophilization on vDAO enzymatic activity in the presence or absence of Sucrose (SUC) or Trehalose (TRE) as cryoprotectants. vDAO activity was assayed by the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values are the mean \pm standard deviation (SD); $n=3$ different experiments; * $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns: not significant; Two-way ANOVA multiple comparisons.

In this study, the activities of vDAO formulated either with sucrose (SUC) or with trehalose (TRE) were almost similar with a slight difference of 2%. Similar results were observed in previous studies on lyophilization proteins with sugars. For instance, xanthine oxidase (Srirangsan *et al.*, 2010), lactate dehydrogenase (Kawai et Suzuki, 2007; Nema et Kenneth, 1993) maintained good activity and BSA (Imamura *et al.*, 2003) preserved its structural features after freeze-drying in the presence of disaccharides as cryoprotectants. These results may be attributed to optimal

lyophilization parameters and to the chemical and physical properties of disaccharides, such as high T_g and molecular mobility below its T_g (Kawai et Suzuki, 2007) and their ability to form hydrogen bonds with the protein during the freeze-drying process.

3.4.2 Thermal properties of the freeze-dried formulations

The moisture content of the freeze-dried formulations was calculated at 105 °C from thermogravimetric analysis done up to 300 °C. The DSC analysis allowed the determination of glass transition temperatures. The thermal properties of the lyophilized samples are summarized in table 3.1.

Table 3.1 Thermal properties of vDAO lyophilized in the absence or the presence of cryoprotectants.

Formulation	T_g (°C)¹	T_c (°C)¹	Residual humidity¹ (%)
vDAO	41.5 ± 7.7	152.1 ± 3.1	8.45 ± 0.82
vDAO-SUC	22.4 ± 3.1	n/a	3.27 ± 0.65
vDAO-TRE	34.9 ± 4.1	n/a	3.26 ± 0.71

¹ T_g (Glass transition), T_c (Crystallization temperature), and RH (Residual humidity, % w/w). All experiments were done in triplicate; the reported values are the mean ± standard deviation (SD).

The vDAO (control) showed crystallization at 152 °C (about 110°C above the T_g value), whereas the formulations with the disaccharides as cryoprotectants remained amorphous (no crystallization observed in the studied temperature range). With a similar moisture content in the presence of cryoprotectants, the formulations containing trehalose had a higher T_g value than those containing sucrose. Among the disaccharides, trehalose has been reported to have a T_g higher than that of sucrose (Wolkers et Oldenhof, 2021). Some studies reported that sucrose tended to crystallize before trehalose (Srirangsan *et al.*, 2010). In the case of xanthine oxidase samples freeze-dried with sucrose, T_c was 132 °C, within the same temperature range. Considering that DAO is a glycoprotein (Mu *et al.*, 1994), it may be possible that disaccharide cryoprotectants could also interact with the carbohydrate moiety of vDAO and prevent crystallization. It is worth to note that the moisture content of vDAO without cryoprotectants was higher compared to samples with sucrose or trehalose. Previous studies have shown negative consequences at high moisture and temperature values on the structural integrity and stability of freeze-dried biologics (Duralliu *et al.*,

2019; Franks, 1994). The increase in the moisture content can reduce the T_g due to its plasticizing effect (Duralliu *et al.*, 2020). The presence of cryoprotectants provided a smooth appearance with skeletal structures to the lyophilizates. It is supposed that this morphology could be the key to the low residual humidity in freeze-dried samples with sucrose or trehalose, and thus protecting the vDAO from the decrease of the activity during storage time.

3.4.3 Characterization of vDAO powders

The morphology of the lyophilized samples with or without cryoprotectants agents (CPAs) was characterized by SEM (Fig. 3.2).

The vDAO lyophilizate without cryoprotectants have a very porous appearance (Fig. 3.2 A), clearly differing from the vDAO lyophilized in the presence of sucrose (Fig. 3.2B) or of trehalose (Fig. 3.2C) both showing smoother surfaces. Freeze-dried disaccharides lyophilized alone under the same conditions (control) also exhibited a smooth appearance with "skeletal" structures (Fig. 3.2D and E). The freeze-drying of vDAO in absence of cryoprotectants significantly increases the number of pores on the surface of the dry enzyme. Indeed, after the solidification of all solutes and water, the temperature of the platform increases providing energy for sublimation, and ice vapor is evacuated; thus, begins primary drying. The removal of ice crystals by sublimation would probably create an open network of pores, which are pathways for further advanced water removal from vDAO. The freezing step can affect the morphological characteristics of the freeze-dried cake (Kasper et Friess, 2011), such as the size of the ice crystals, the surface of the proteins and the porosity of the final cake (Fig. 3.2A). In the presence of disaccharide cryoprotectants, the smooth, non-porous appearance of vDAO is probably due to the interaction disaccharides:disaccharides or disaccharides:protein during lyophilization. The enzyme appears to be incorporated in predominant carbohydrate matrices. Imamura *et al.* (Imamura *et al.*, 2003), reported that when a protein solution is freeze-dried in the presence of sugars, amorphous matrices of sugars are formed, which could integrate protein macromolecules (Imamura *et al.*, 2003). The incorporation of protein molecules into amorphous sugar matrices may prevent the conformational changes in the protein during dehydration and prevent the water access during the storage due to the interactions between protein and sugar molecules (Chang *et al.*, 2005b; Imamura *et al.*, 2003).

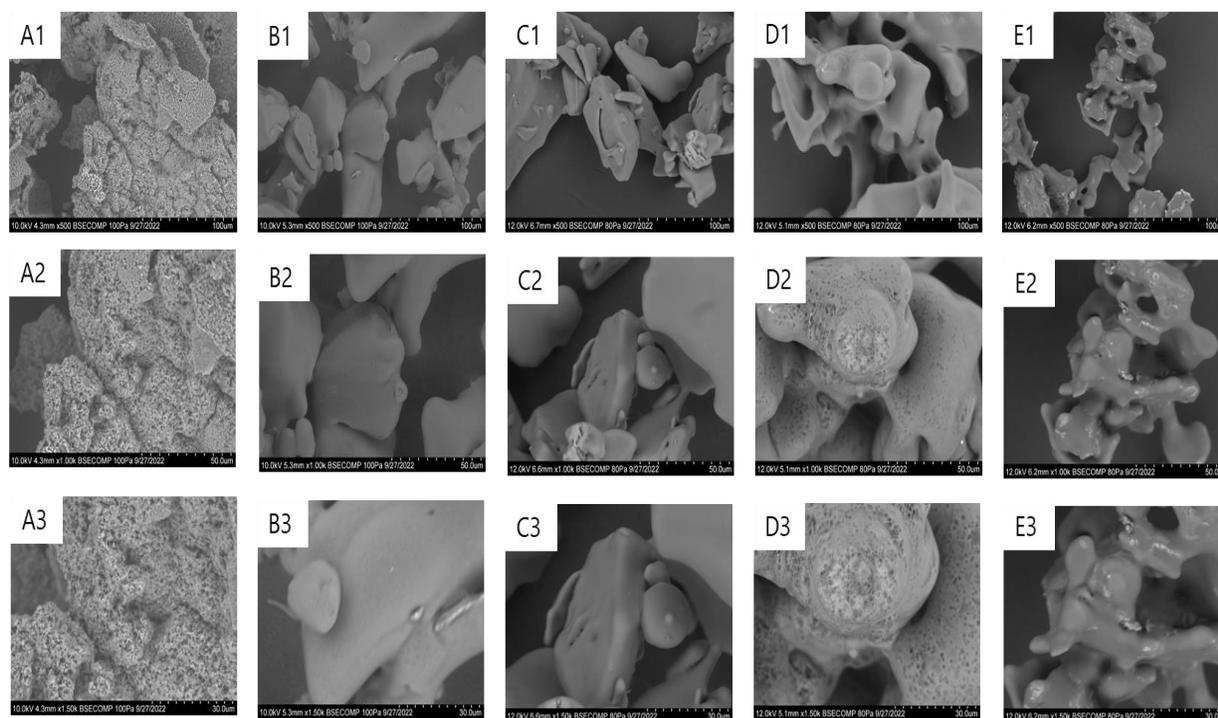


Figure 3.2 The morphology of vDAO lyophilized samples. (A) vDAO, (B) vDAO-SUC, (C) vDAO-TRE, (D) SUC alone, (E) TRE alone. SEM magnification (1) $\times 500$, (2) $\times 1000$, (3) $\times 1500$.

3.4.4 vDAO activity after long-term storage at different temperatures

A protein-to-sugar weight ratio of 1:1 is suitable for optimal stabilization (Gutka, 2018). In this study, the enzyme:sugar ratio (calculated as w/w mg protein:mg disaccharide) was intentionally increased to 1:10 to prevent protein collapse during lyophilization (Carpenter *et al.*, 2002).

The residual humidity of the freeze-dried samples was calculated at 105 °C from sample weight measurements taken after thermogravimetric analysis during storage period (18 months) at 4 °C and -20 °C (Figure 3.3).

After 18 months of storage, vDAO samples without disaccharides (control) showed a significant increase in moisture content, reaching 16 % and 17 % at 4 °C and -20 °C, respectively. The moisture content may be attributed to the eventual remaining traces of salts (i.e., Phosphates) used during the extraction procedure of the vDAO, which can retain humidity. The vDAO is a glycoprotein with an N-linked carbohydrate content (3-14 % in vegetal DAOs) (Moosavi-Movahedi *et al.*, 2007). The carbohydrate moiety of the enzyme can be destabilized during drying and storage and this impacts the conformation of vDAO and decreases its efficiency.

The presence of sucrose or trehalose as CPAs significantly reduced the moisture content, allowing the preservation of a low RH content of vDAO formulations. This could be explained by the interaction of disaccharides with protein structure (possibly via the carbohydrate moiety) by hydrogens bonds, which stabilize the enzyme conformation and have a positive impact on the preservation of vDAO activity.

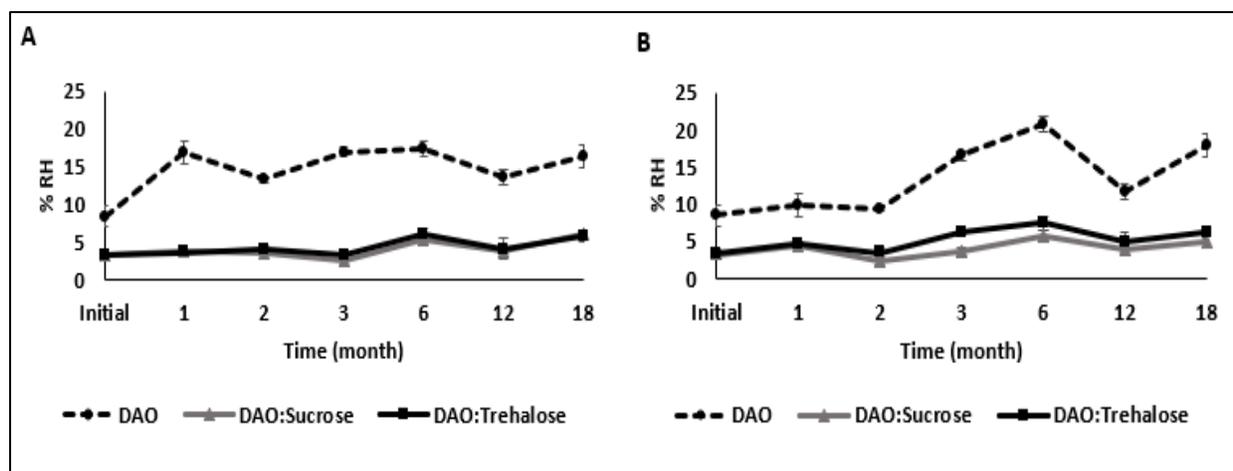


Figure 3.3 Time course of the residual humidity of vDAO powder formulations stored at different temperatures: (A) at 4 °C; (B) at -20 °C. The reported values are the mean \pm standard deviation (SD); n=3 different experiments.

The values of vDAO activity after 18 months of storage (Figure 3.4) showed a gradual decrease at 4 °C. Practically, the enzyme without cryoprotectants retained only 43%, whereas the remaining enzyme activity for both formulations containing cryoprotectants was 60 % at the end of the storage period. The remaining activities for samples stored at -20 °C were around 40 % for three formulations (the vDAO with or without CPAs). Unexpectedly, the activity of the enzyme was higher at 4 °C than at -20 °C 18 months. This can be explained by the storage temperatures being lower than the T_g of the samples. Keeping proteins stored below their T_g is important but not sufficient to ensure long-term enzyme stability (Chang *et al.*, 1996).

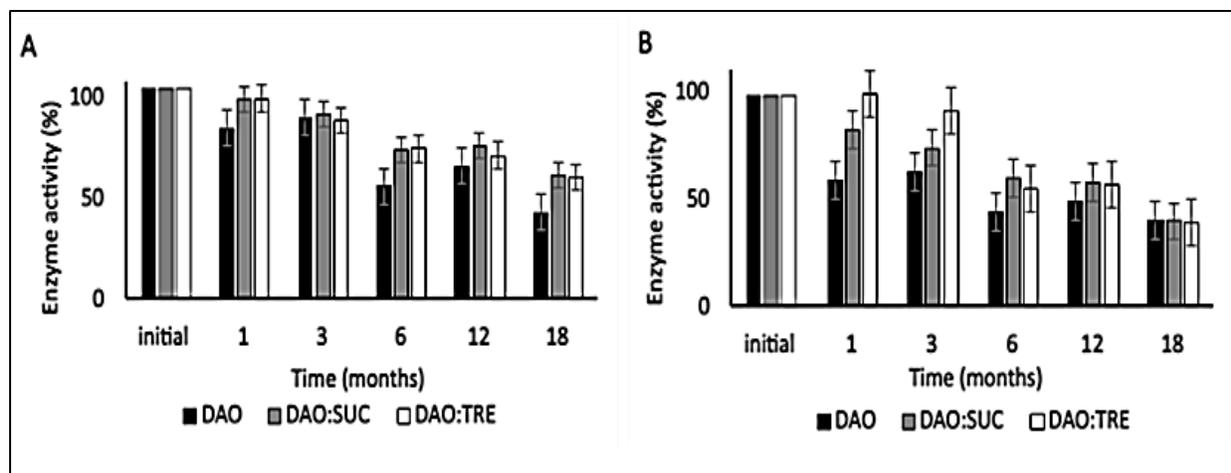


Figure 3.4 . Effect of storage temperature on normalized vDAO activity stored at (A) 4 °C and (B) at -20 °C. vDAO activity was assayed by the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values are the mean \pm standard deviation (SD); n =3 different experiments.

In the absence of a cryoprotectant agent, the protein conformation can be damaged during the lyophilization process. During the secondary drying, the excess moisture is removed, including the water from the surface of the protein and this can destabilize the protein conformation, making it more sensitive to environmental factors. In fact, at 4 °C and -20 °C, the moisture content of the vDAO powder lyophilized without CPAs reached 16%, meaning that the interaction of the enzyme with water affects its stability during long-term storage (Figure 3.3). Adding CPAs reduced the moisture content in both formulations (with sucrose or trehalose) and maintained 70% of the total activity after a storage period of 18 months at 4 °C. This value was higher than the retained activities at -20 °C.

3.4.5 Behavior of the enzyme formulations in tablet forms

3.4.5.1 Stability of vDAO in the dry tablets

Tablets with DAO powders formulated with sucrose or with trehalose as cryoprotectants were prepared and their physical properties are summarized in Table 3.2. Formulations based on vDAO and vDAO lyophilized with sucrose generated harder tablets than those formulated with Trehalose.

The stability of vDAO activity in dry tablets was also investigated by measuring the enzymatic activity (Figure 3.5) after one, three and six months of storage at 4 °C that appeared to allow better stability of vDAO powders (*section 3.5.3*).

Table 3.2 Summary of the physical properties of tablets.

Formulation	Weight (mg)	Dimensions of dry tables			Time for complete dissolution in SIF**
		Diameter* (mm)	Thickness* (mm)	Hardness* (N)	
vDAO	300	9.60 ± 0.01	3.37 ± 0.03	12.03 ± 1.10	4-5 h
vDAO:Sucrose	300	9.59 ± 0.01	3.37 ± 0.03	12.13 ± 0.50	4-5 h
vDAD:Trehalose	300	9.61 ± 0.02	3.36 ± 0.03	9.53 ± 0.47	4-5 h

*All experiments were done in triplicate; the reported values are the mean ± standard deviation (SD)

** After 2h in SGF.

The activity of vDAO decreased gradually but the loss of activity was lower in the case of the tablets obtained with powders of vDAO lyophilized with disaccharides as cryoprotectants. After 6 months of storage at 4 °C, the remaining activity was 76% for tablets of vDAO freeze-dried with sucrose and 71% for tablets of vDAO freeze-dried with trehalose, whereas the activity of vDAO freeze-dried without cryoprotectants (control) was 64% of the initial activity. The decrease in enzyme activity may be related to moisture absorption. A decrease in the hardness of the tablets was also observed for the mentioned period (data not presented).

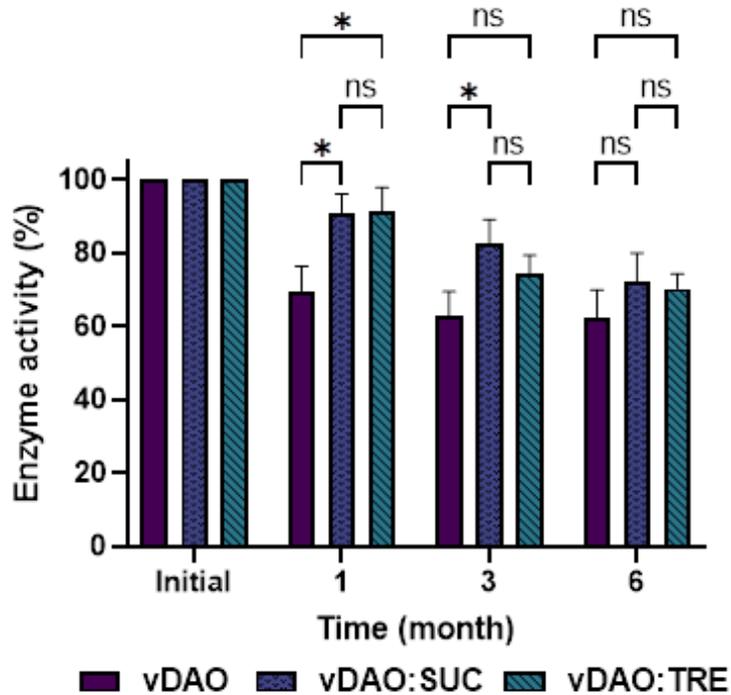


Figure 3.5 Enzymatic activity of vDAO in dry tablets of vDAO lyophilized with or without disaccharides as cryoprotectants during 6-months storage at 4 °C. vDAO activity was assayed by the DCHBS-AAP-HRP method. (mean \pm SD; n = 3; * P < 0.05, ns: not significant; Two-way ANOVA multiple comparisons.

3.4.5.2 *In vitro* dissolution tests

The dissolution patterns of various vDAO preparations (freeze-dried with and without cryoprotectants) formulated in tablet forms, in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluids (SIF) are presented in Figure 3.6.

The tablets were incubated first in SGF for two hours (time recommended by US Pharmacopeia to simulate stomach transit). No release of vDAO activity was detected during the 2h of incubation in SGF. Tablets have then been transferred into the SIF where the tablets containing vDAO-SUC, and vDAO-TRE were released in a controlled manner 80 % and 70%, respectively, of the total loaded enzyme activity (in terms of enzyme units) after 5 h of incubation (2 h in SGF and 3 h in SIF) showing good protection of vDAO against the gastric acidity and the intestinal proteolytic enzymes (pancreatin), whereas from tablets obtained with cryoprotectants-free vDAO powder only 20% of the loaded enzymatic activity was found in the dissolution medium.

During 6 months of storage, the dissolution profiles (Fig. 3.6) showed the same trends of enzyme release patterns: 80% of vDAO activity was found for tablets with vDAO:SUC, and 70% for vDAO:TRE, whereas 25% of activity was found for tablets loaded with vDAO (control).

The vDAO activity was better preserved in tablet form than in powder form. This was probably due to the excipients used for tablet preparation, which provided extra protection to the enzyme during storage. It is known that the enzymatic activity is dependent on the pH of surrounding media (Calinescu *et al.*, 2012; Neree *et al.*, 2018). The fact that there was no vDAO detected in SGF can be related to the Carboxymethylcellulose (CMC) excipient. In gastric acidity, the carboxylic groups of CMC can be protonated, forming an outer compact gel preventing the liberation of vDAO, as well as the gastric acid entering the tablet and the enzyme denaturation.

The presence of SUC or TRE cryoprotectants not only protected the vDAO during the lyophilization and the storage, but their presence in the formulation of vDAO tablets allowed a better release of the enzyme than the control (vDAO lyophilized without CPAs). The high amount of 70 and 80 % vDAO released from tablets formulated with the enzyme freeze-dried with cryoprotectants is of interest, showing that the sucrose and trehalose may act as modulators of vDAO release. The slightly higher percentage of vDAO liberation from tablets with vDAO:SUC when compared to tablets with vDAO:TRE can be explained by the higher solubility of sucrose (200g/100mL) compared to that of trehalose (68.9g/100mL). Consequently, sucrose may behave as a kind of "swelling" accelerator, favoring the enzyme liberation. In addition, the release time of 5h is optimal, considering the 5-6h transit-time of an orally taken tablet to reach the colon.

The gastrointestinal tract is considered a difficult environment for the enzyme due to the effects of pH and proteolytic enzymes (pepsin, pancreatin). A previous study shows that vDAO is sensitive to pH variations and could be inactivated in harsh environmental conditions (Neree *et al.*, 2018). The additional carbohydrates matrices offered by the CPAs may provide additional protection of vDAO activity in simulated gastric and intestinal fluids by limiting the direct contact between the enzyme and the external medium (i.e., the exposure to proteolytic enzymes such as intestinal trypsin, chymotrypsin), thus allowing a higher release of the formulated enzyme in tablets. This may be explained by the fact that the presence of sucrose and trehalose allows more flexibility for the formation of hydrogen bonds with the protein. Due to these more flexible bonds, sucrose or

trehalose may interact with the surface of the enzyme and with the external media (gastric or intestinal) at the same time (Fonte *et al.*, 2012).

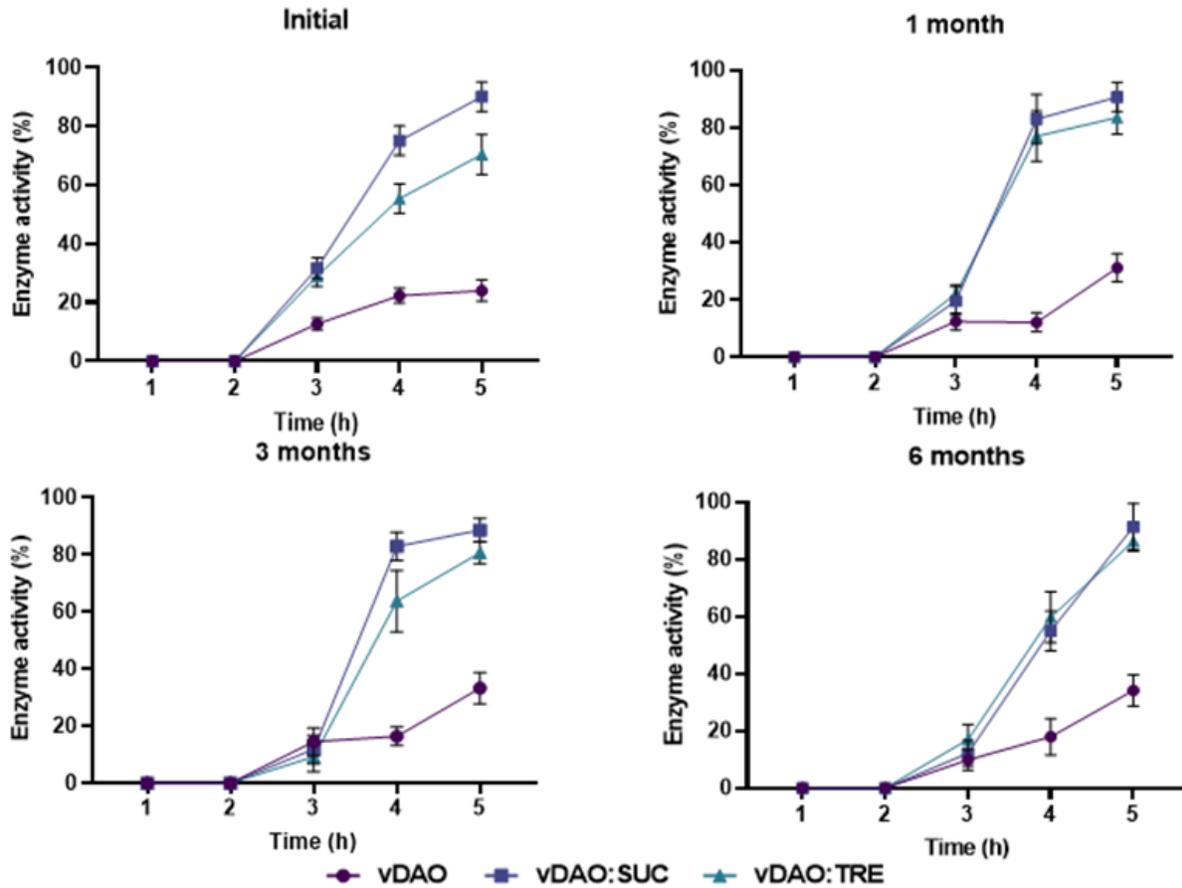


Figure 3.6 Release profiles of vDAO with and without cryoprotectants from monolithic tablets stored for 6 months at 4 °C. For the dissolution patterns, tablets were incubated at 37 °C 100 rpm in SGF (2h) followed by SIF (3h). At the indicated times, aliquots were withdrawn, and vDAO activity was determined by the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values of vDAO activity refer to the enzymatic activity in the incubation media (mean \pm SD; n = 3 different experiments).

3.4.5.3 Commercial products

Two commercial vegetal diamine oxidases as food supplements in tablet and capsule forms were also evaluated for enzyme release under the same conditions as previously indicated for the tablets in this study (2h in SGF, then transferred in SIF until complete dissolution). After 1 h in SGF, the commercial tablets were fragmented, and the capsules lost their integrity (Fig. 3.8). The fact that the commercial capsule and the tablet lost their integrity in the dissolution medium

suggests that the enzyme release cannot be controlled during gastric transit. The enzyme activity of both capsule and tablet in SGF was $\leq 10\%$, which could be related to an inactivation of the enzyme in the gastric medium. When ex-posed to SIF, the maximal enzyme activity for the tablet reached 20% after 1h and then de-creased to 8% at the end of the test, whereas the capsules released 50% of their activity in 3 h (Fig. 3.7). Compared to monolithic tablets here described with the obtained freeze-dried vDAO powders, the commercial tablets did not offer the same level of gastroprotection. The results obtained using vDAO and cryoprotectants confirmed the capacity of the di-saccharides to protect the enzyme during the lyophilization process and in association with the excipients, to better protect against the pH variations in different dissolution media.

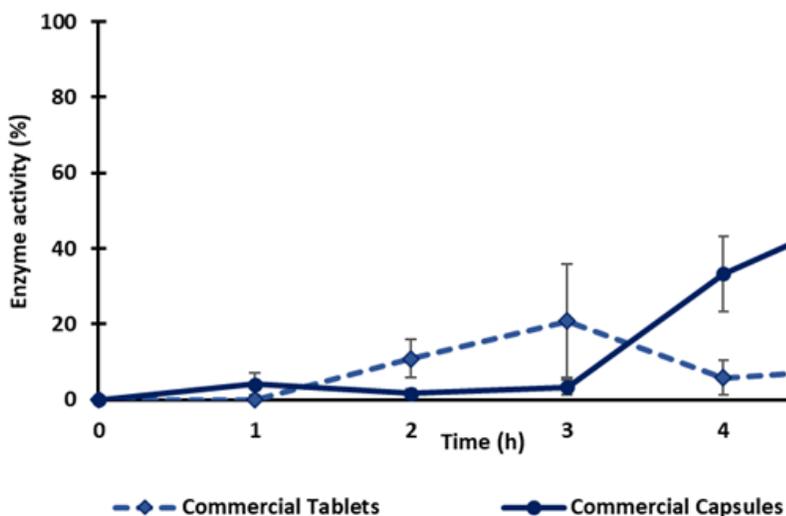


Figure 3.7 Release profile of vDAO from two commercial products (tablet and capsule forms). Tablets and capsules were incubated separately for 2h in SGF (37 °C, 50 rpm) then transferred to SIF. The activity of vDAO was measured every hour until complete dissolution by the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values of vDAO activity refer to the enzymatic activity in the incubation media (mean \pm SD; n = 3 different experiments).

3.5 Materials and Methods

3.5.1 Materials

Vegetal Diamine oxidase from *Pisum sativum* (Diamaze 1.2 U/mg protein) was from IBEX Pharmaceuticals Inc. (Montreal, QC, Canada) kept at -80 °C. Monobasic and dibasic phosphate, 4-Aminoantipyrine (AAP), Sodium 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate (DCHBS),

Horseradish Peroxidase (HRP), Putrescin, Kit ammonia assay, Bovine Serum Albumin (BSA), Sucrose, Trehalose, Carboxymethyl Cellulose (CMC), Mg Stearate, Pepsin from porcine mucosa (460 units/mg solid) and pancreatin from porcine pancreas (8X USP specifications) were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). The Bradford reagent was purchased from BioShop® (Burlington, ON, Canada). The Hydroxypropyl Methyl Cellulose (HPMC) K100 was gifted by Colorcon (Harleysville, PA, USA).

3.5.2 Preparation of Enzyme Formulation and Lyophilization

The vDAO was thawed overnight at 4 °C. Electrophoretic zymographic pattern of enzyme activity and the SDS electrophoretic pattern of proteins (Fig. 3.9) were performed as described by Chomdom kouna *et al.* (Chomdom Kouna *et al.*, 2022) to complete the characterization of the received product. The vDAO was then treated with cryoprotectants (sucrose or trehalose). The ratio of vDAO:cryoprotectant was 1:10 (w:w) and then treated with cryoprotectants. Once mixed, the solutions were divided into 50 mL plastic tubes and maintained at -80 °C for 24 hours. After freezing, the tubes were immersed into liquid nitrogen for 2 min before lyophilization. The preparations were then freeze-dried on benchtop Virtis Freezemobile 25EL (New York, USA) with a chamber pressure of 2.5×10^{-2} Torr, increasing the temperature from -86 °C to 25 °C 72h. All obtained powders were stored at 4 °C and -20 °C and their stability was tested after 1, 2, 3, 6, 12, and 18 months.

3.5.3 vDAO Activity Measuring

3.5.3.1 Specific activity: DCHBS-AAP-HRP method

The vDAO catalytic activity was assayed by measuring the rate generation of H₂O₂ during the oxidation of putrescine by the DCHBS-AAP-HRP method as reported (Pietrangeli *et al.*, 2012). Briefly, in a spectrophotometric cuvette at 25 °C and following the absorbance variation at 515 nm vDAO samples were diluted in 1 mL of phosphate buffer 0.1M pH 7.4 with AAP (0.1 mM final concentration), DCHBS (0.1 mM final concentration), horseradish peroxidase (3.6 U/ml final concentration) and putrescine (3 mM final concentration) are then added. The role of AAP is to form a pink complex with the oxidized DCHBS. The latter is oxidized in the presence of horseradish peroxidase by H₂O₂ generated by the oxidative deamination of putrescine by vDAO.

For the rate of H₂O₂ calculation, a molar extinction coefficient of 26,000 is used. The vDAO activity expressed in enzymatic units (U); 1 unit corresponds to 1 μmol of H₂O₂ generated/min.

3.5.3.2 Protein quantification

Protein concentrations of vDAO were determined by the Bradford assay (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard, and the absorbance was monitored at 595 nm.

3.5.4 Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy images of the lyophilized powders were obtained with a scanning electron microscope, model S-3400N type II (Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA, USA); the secondary electron detector was used for high-resolution images. The samples were mounted on SEM sample holders with double-stick carbon tape. The images of the samples were obtained in a high-vacuum SEM mode with a 10 keV electron beam.

3.5.5 Thermogravimetric analysis (TGA)

The weight loss, depending on the variation of temperature, was measured by a Q500 TGA Thermogravimeter (TA Instruments, New Castle, DE, USA) between 30 and 300 °C at 10 °C/min, using a small amount (1 to 5 mg) of powders filed on a platinum crucible. To keep a controlled atmosphere, the samples were maintained under nitrogen at a flow rate of 100 mL/min. The water content was determined at about 105 °C. All the results were treated by “TRIOS” software version 4.4.0.41651.

3.5.6 DSC (Differential Scanning Calorimetry) Measurements

Differential scanning calorimetry (DSC) analyses of the freeze-dried formulations were performed using a DSC 1 STARe System (Mettler Toledo, ON, Canada). Approximately 10 mg of the lyophilized samples were weighed in an aluminum pan (40 μL) with a pierced lid and sealed hermetically. An empty pan was used as a reference. The experiments were conducted from 0 to 180 °C at a scan rate of 5 °C/min under a nitrogen atmosphere. DSC thermograms were analyzed by STARe evaluation software version 16.20 interfaced with the DSC.

3.5.7 Preparation of monolithic tablets

The Monolithic tablets of 300 mg with 10% of vDAO powders previously lyophilized and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ were prepared by mixing the excipients: sodium carboxymethyl cellulose (NaCMC), magnesium stearate, and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). The excipients were initially homogenized manually in a mortar for 2 min, then transferred into 50 mL tubes and mixed for 10 min in a rotary device at 50 rpm. Dry powders of all excipients and dry vDAO were mixed for each formulation in quantity equivalent to 20 tablets. Tablets were obtained by direct compression of the dry powders in a 9 mm cylindrical mold with flat punches using a manual hydraulic press (Wabash, IN, USA) at 2 tons for 10 s. All the tablets were then packed in HDPE (High-Density Polyethylene) bottles without desiccants and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for stability studies.

3.5.7.1 Characterization of dry tablets

Tablet hardness was evaluated with a VK 200 hardness tester (Benchsaver™ Series, Vankel, NC, USA) as described in the United States Pharmacopeia (USP) <1217>. All the tests were done in triplicate. The thickness of the tablet was evaluated with a caliper from DOCAP tools (St-Laurent, QC, Canada).

The enzymatic activity of vDAO in dry tablets was measured after crushing them in a mortar and then suspending the material in 10 mL of phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4). The suspension was then placed in an incubator shaker for 1 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ at 100 rpm to allow the maximum release of the enzyme. The vDAO solutions were filtered on filter paper (FisherBrand Filter paper, medium porosity); the vDAO activity was determined using the method described in *section 3.5.3*.

3.5.7.2 *In vitro* dissolution tests

The tablets behaviour was followed in simulated gastric fluid (SGF) for 2h and intestinal fluid (SIF) until complete dissolution of the tablets using a USP apparatus II (Distek dissolution system 2100A; Markham, ON, Canada). For vDAO activity, samples of 1mL were withdrawn after each 1h during the test.

The SGF and SIF to simulate human gastric and intestinal transit (GIT) were pre-prepared as described by the USP 43-NF38, 2020. The SGF was prepared by dissolving NaCl (2 g), and 3.2 g of pepsin in deionized water and then pH adjusted to 1.2 ± 0.1 with HCl (37% w/w) in 950 mL. The SIF was

prepared following the corresponding protocol: potassium phosphate monobasic (6.8 g), 77 mL 0.2M NaOH, and 10 g pancreatin in 750 ml of deionized water, and then pH was adjusted to 6.8 ± 0.1 with 1 M NaOH. The final volume of each fluid was adjusted to 1000 (mL) with deionized water. The vDAO activity from tablets in suspension in simulated gastric and intestinal fluids was evaluated by DCHBS-AAP-HRP, as previously described in *section 3.5.3*.

3.5.8 Statistical analysis

All experiments used a minimum of three replicates. Data are expressed as the mean \pm SD. Statistical tests were performed with the GraphPad Prism software, using Two-way ANOVA multiple comparisons. Differences were deemed statistically significant when the associated P-value was lower than 0.05.

3.6 Conclusion

The stability of the DAO over time depends on the storage conditions: temperature and humidity. The present study revealed the potential of disaccharides (sucrose and trehalose) as cryoprotectants to preserve vDAO activity during lyophilization and the long-term storage. The two cryoprotectants SUC and TRE have shown a similar effect on vDAO activity during freeze-drying and storage. The formation of the carbohydrate matrix including vDAO seems to allow a better preservation of the enzyme conformation by avoiding moisture absorption and preventing the decrease of enzyme activity due to variations in environmental conditions. When formulated as monolithic tablets, the vDAO preparations containing CPAs exhibited better resistance in simulated gastric and intestinal fluids and a better release pattern in intestinal fluid. These findings may be useful for further formulations of vDAO for the treatment of histamine-related dysfunctions.

3.7 Acknowledgements

The financial support from Foundation Courtois is gratefully acknowledged.

3.8 Supplementary Data

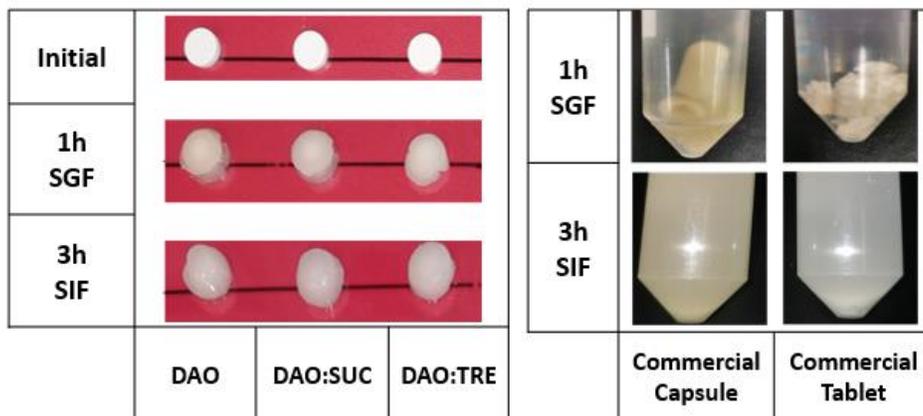


Figure 3.8 Comparison of behavior for tablets obtained with our preparations (Left) versus commercial tablet and capsule (Right) all tested in the same conditions in simulated gastric and intestinal fluids.

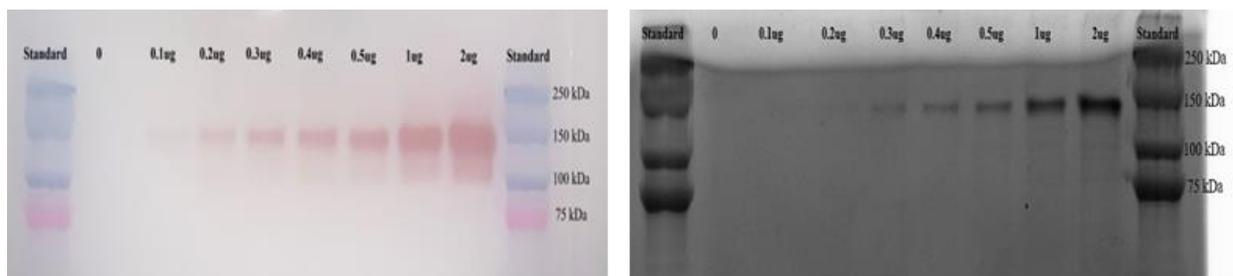


Figure 3.9 Detection of vDAO activity with the DCHBS-AAP method. Zymography of vDAO (0-2 µg/well) developed with DCHBS-AAP (Left) for vDAO activity and restained using Coomassie Brilliant Blue (Right) on SDS-Polyacrylamide (10%) gel electrophoresis (representative of n = 3 runs).

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'histamine, que l'on trouve dans de nombreux types de cellules, semble être la molécule la plus pléiotropique du corps humain. Cette amine biogène est aussi produite par décarboxylation bactérienne de l'histamine dans divers aliments. Si la quantité d'amines biogènes ingérées est élevée et/ou si leur dégradation est inhibée ou perturbée dans l'organisme, l'histamine provoque de multiples symptômes gastro-intestinaux (GI). Ceux-ci peuvent être accompagnés de symptômes extra-intestinaux, notamment des troubles cardiovasculaires, respiratoires et cutanés. L'intolérance à l'histamine (HIT) est un problème émergent dans notre société, touchant au moins 1 % de la population globale. Le diagnostic clinique de l'intolérance à l'histamine est difficile. Plusieurs traitements incluant des corticostéroïdes, des antiinflammatoires non-stéroïdiens, des immunomodulateurs, des antihistaminiques, sont utilisés afin de soulager les symptômes des dysfonctions entériques associées à l'histamine (Mateescu et al., 2017). Ces thérapies, couramment utilisées, ne guérissent pas l'ensemble des troubles liés à l'histamine et ont également des effets secondaires tels que la nausée, la somnolence, la perte de goût et de l'odorat, etc. Il en résulte le besoin d'autres traitements. La DAO est considérée comme la principale enzyme extracellulaire pour la dégradation intestinale de l'histamine et d'autres amines biogènes (Jones et Kearns, 2011), (d'où l'appellation histaminase, pour sa capacité à métaboliser les amines biogènes dont l'histamine). La diamine oxydase a donc été proposée comme agent décomposant l'histamine pour traiter les histaminoses alimentaires et autres dysfonctions associées à l'histamine avec action au niveau du lumen intestinal.

Plusieurs suppléments (compléments alimentaires) avec administration orale de DAO issues principalement de reins de porc (pkDAO, porcine kidney DAO) sont présentement disponibles dans le commerce sous forme de comprimés et de capsules. Une étude clinique réalisée avec des patients souffrants de troubles liés à l'histamine, a montré une amélioration au niveau des symptômes de manière significative durant la période de supplémentation orale avec les capsules de DAO. Une fois la supplémentation arrêtée, l'intensité des symptômes a réaugmenté (Schnedl et al., 2019). Une autre étude sur la cinétique de la DAO porcine a montré que cette dernière présente

une activité basse, avec une faible affinité pour l’histamine et ne résiste pas au pH des milieux gastriques et intestinaux (Kettner et al., 2020).

L'activité de l'enzyme dégradant l'histamine (la diamine oxydase végétale), nécessaire à une dégradation satisfaisante de l'histamine est de loin supérieure à la quantité théorique apparemment donnée dans les compléments alimentaires commerciaux. Avec ces connaissances, il est évident que des compléments alimentaires améliorés doivent être développés pour aider à mieux réduire les effets nocifs dus à un excès d’histamine (Kettner *et al.*, 2020). En plus de cela, la pkDAO étant d’origine animale pourrait être plus immunogénique et pourrait aussi présenter une limite pour une catégorie de consommateurs. Notre laboratoire propose la DAO végétale (vDAO) comme alternative à la pkDAO, avec une activité spécifique plus élevée (20 à 100 fois), une meilleure affinité pour l’histamine et plus sûre en termes d’effets secondaires (Comas-Basté et al., 2019a; Neree et al., 2020).

Les effets bénéfiques des Cu-AO d'origine végétale ont été documentés dans des modèles animaux *in vivo* et *ex vivo* d'états inflammatoires ou allergiques, y compris des réactions de type asthmatique (Masini *et al.*, 2003) et des lésions d'ischémie-reperfusion myocardique (Masini *et al.*, 2007b) ou intestinale (Masini *et al.*, 2007a) dans laquelle il a été démontré que le traitement avec la Cu-AO (DAO) végétale favorise l'atténuation de ces dysfonctionnements et la diminution du niveau d'histamine tissulaire, de l'infiltration de neutrophiles et des dommages oxydatifs cellulaires. De plus, l'élimination de l'histamine, qui est un substrat efficace de la Cu-AO végétale a été associée à la fonction anti-inflammatoire de cette enzyme et à ses propriétés anti-allergiques (Pietrangeli *et al.*, 2020).

L’une des limites à l’utilisation thérapeutique de la DAO est son instabilité en forme liquide durant le stockage à long terme. Les protéines sont souvent commercialisées sous forme lyophilisée ou stockées sous forme de poudres lyophilisées après purification et avant formulation. La lyophilisation commence par la congélation, suivie d’un séchage primaire pour éliminer la glace en vrac par sublimation et d’un séchage secondaire pour désorber l’eau non gelée. Les protéines sont soumises à divers types de stress pendant la lyophilisation, y compris la formation de gel et la dénaturation à la surface de la glace, les changements de pH et l’agrégation induite par la déshydratation. Les protéines peuvent être protégées de certains de ces stress en modifiant la

formulation et en utilisant des excipients stabilisateurs. En plus des problèmes liés à la lyophilisation, les travaux menés dans notre laboratoire par Neree *et al.*, en 2018 sur la stabilité de la DAO dans les milieux gastriques et intestinaux simulés ont permis de conclure que la DAO présente une certaine sensibilité aux variations du pH, surtout en milieux acide. Une faible activité de la DAO dans le milieu intestinal pourrait diminuer son efficacité à éliminer l’histamine et rendre son utilisation limitée (Neree *et al.*, 2018). Des formulations ont été proposées pour protéger l’enzyme contre les variations du pH (Calinescu *et al.*, 2012). La stabilité de la vDAO en temps est un autre aspect majeur pour les développements futurs avec cette enzyme.

L’objectif principal de ce projet de maîtrise était d’améliorer le rendement en termes d’activité de la DAO après la lyophilisation et durant le stockage. Le choix entre le sucrose et le tréhalose comme agents stabilisants dépend des protéines cibles et de l’utilisation clinique prévue. Ces stabilisants peuvent conférer une viscosité élevée au concentré congelé. Ainsi, la viscosité élevée du système diminue la vitesse de déploiement qui peut se produire pendant la durée du séchage primaire, même si la température de séchage primaire est supérieure à la Tg du produit congelé. Les paramètres du procédé tels que la température et la durée de séchage primaire, la vitesse de rampe de chauffage, la pression de la chambre peuvent influencer la qualité du produit protéique lyophilisé (Butreddy *et al.*, 2021). La présence de cryoprotecteurs dans la formulation est également importante pour éviter l’agrégation après réhydratation (suspension) du lyophilisat. Évaluation des propriétés morphologiques, physico-chimiques et cinétiques de la DAO après la lyophilisation

La DAO a été lyophilisée avec et sans cryoprotecteurs ajoutés, et ses propriétés physico-chimiques et cinétiques ont été évaluées après lyophilisation. En général, un rapport massique d’environ 1:1 du cryoprotecteur (disaccharide) à la protéine remplit les interactions moléculaires stabilisatrices de protéines. Dans ce projet le rapport protéine:disaccharide a été intentionnellement augmenté à 1:10 afin d’optimiser la lyophilisation et éviter le déploiement de l’enzyme qui peut être induit par la lyophilisation. En plus de minimiser l’agrégation des protéines pendant la lyophilisation et/ou la réhydratation, l’augmentation du ratio des disaccharides permet la maximisation de la rétention de la structure des protéines natives qui est essentielle pour optimiser la stabilité de stockage à long terme (Carpenter *et al.*, 2002).

La morphologie des poudres DAO obtenues après lyophilisation peut être évaluée par la visualisation de son aspect microscopique par microscopie électronique à balayage (MEB). Ces résultats ont permis de montrer qu'en absence des disaccharides la DAO présente une structure poreuse. La lyophilisation de la DAO en absence des cryoprotecteurs augmente considérablement le nombre de pores à la surface de l'enzyme. La sublimation crée un réseau ouvert de pores, qui sont des voies d'élimination de l'eau de la DAO. L'étape de congélation peut également influencer la porosité des protéines, car cette étape peut affecter les caractéristiques morphologiques du "cake" lyophilisé (Kasper et Friess, 2011). Par conséquent, l'étape de congélation influence la taille des cristaux de glace et par la suite les étapes de séchage et donc, la surface des protéines et la porosité du "cake" final en dépendent fortement et maintenir la conformation de l'enzyme et ainsi préserver son activité lors du stockage.

En présence des disaccharides, la DAO lyophilisée présente un aspect lisse, non poreux. L'enzyme semble être incluse dans des matrices carbohydrates prépondérantes. En effet, lorsqu'une solution protéique est lyophilisée en présence de sucres, des matrices amorphes de sucres se forment, ce qui pourrait intégrer des molécules de protéines (Imamura *et al.*, 2003). L'incorporation de molécules de protéines dans les matrices de sucre amorphes pourrait empêcher les changements conformationnels dans la protéine pendant la déshydratation et le stockage en raison des interactions entre les molécules de protéines et de sucre (Chang *et al.*, 2005b).

Les propriétés thermiques de la DAO ont été évaluées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) pour la mesure de la température de transition vitreuse et la température de cristallisation et par la thermogravimétrie (ATG/TGA) pour la mesure du taux d'humidité résiduelle. À l'état solide, un excipient amorphe et une protéine peuvent former une matrice vitreuse, avec une Tg caractéristique (Mensink *et al.*, 2017). En dessous de cette température, les voies de dégradation de la protéine et de ses excipients sont considérablement réduites (Carpenter *et al.*, 2002).

Les résultats obtenus de l'évaluation de la Tg de la DAO après lyophilisation ont permis de voir que la DAO lyophilisée sans cryoprotecteurs a une Tg et un contenu en humidité élevés, contrairement aux poudres vDAO:SUC et vDAO:TRE où le %HR et la Tg était 2 fois plus faible. Les protéines augmentent la Tg de la formulation et l'ajout d'excipients comme sucrose et tréhalose avec des valeurs de Tg relativement élevées est nécessaire pour maintenir la stabilité de l'enzyme

(Chang *et al.*, 1996). L'évaluation de l'humidité résiduelle en même temps que de l'activité de la DAO tout au long la période de stockage à 4 °C et -20 °C, montre que le témoin (DAO sans stabilisant/ cryoprotecteur) absorbe plus d'humidité, à la fin de la période de stockage avec d'une perte de 60% de l'activité enzymatique. L'étude de (Chang *et al.*, 2005b) a démontré qu'un séchage excessif nuit à la stabilité des protéines et, au contraire, une quantité d'eau résiduelle plus élevée (le cas de notre échantillon sans cryoprotecteurs) affecte la stabilité des protéines par la réduction de la Tg en relation avec les conditions de stockage prévues. Le % HR augmente légèrement environ 1% de plus vers la fin de la période de stockage pour les échantillons lyophilisés en présence de sucrose ou tréhalose et, de façon inattendue, avec une meilleure préservation de l'activité à 4 °C qu'à -20 °C. La stabilité à long terme dépend du maintien de la structure protéique native dans le solide séché. Initialement, les contraintes aiguës de congélation et de séchage induisent le déploiement de protéines non protégées (Chang *et al.*, 1996). La présence du sucrose ou du tréhalose dans la formulation a permis de prévenir l'agrégation et le déploiement de l'enzyme et ainsi le maintien de sa stabilité (faible perte de l'activité enzymatique) au cours de la période de stockage. Il a été montré que le sucrose et le tréhalose sont très efficaces pour la stabilité pendant le processus de lyophilisation et le stockage qui suit. La raison principale est que ces deux sucres sont moins hygroscopiques, ne sont pas sujets à cristallisation pendant la lyophilisation, et donc ils ne se séparent pas de la protéine (Bjelošević *et al.*, 2020).

L'effet de ces deux disaccharides était similaire tout au long de la période de stockage. Les deux formulations vDAO:SUC et vDAO:TRE ont montré la même tendance que ça soit pour le taux d'humidité et l'activité enzymatique, avec une différence dans la température de transition vitreuse (Tg). Cette différence revient aux propriétés en solution du tréhalose et du sucrose qui montrent des différences significatives liées à la flexibilité conformationnelle et au comportement des liaisons hydrogène des disaccharides.

Les disaccharides qui contiennent un cycle furanose (ex, le sucrose) ont une flexibilité conformationnelle inférieure à ceux composés de deux résidus pyranose (tréhalose). La liaison glycosidique α -(1-1) confère cependant un haut degré de rigidité (faible flexibilité dynamique) à la molécule malgré l'absence de liaisons hydrogène (liaison H) intramoléculaires (Perić-Hassler *et al.*, 2010; Winther *et al.*, 2012). De plus, les fluctuations du rayon de giration et des angles dièdres glycosidiques du tréhalose indiquent une plus grande flexibilité pour le tréhalose par rapport au

saccharose, reflétant moins de liaisons H intramoléculaires (= 1) par rapport au saccharose (= 2) (Lerbret *et al.*, 2005). Le résultat de la plus grande rigidité du saccharose et du plus grand nombre de liaisons H intramoléculaires (par rapport au tréhalose) se traduit par une capacité réduite à former des liaisons H avec l'eau et donc un tassement moins efficace à l'état solide et par conséquent, un plus grand volume libre et température de transition vitreuse (Tg) inférieure (pour le saccharose par rapport au tréhalose). La valeur Tg des disaccharides est liée à l'étendue des liaisons H intermoléculaires. Avec l'humidité adsorbée, certaines des liaisons H saccharide-saccharide sont remplacées par une interaction saccharide-eau, réduisant ainsi considérablement la Tg avec la teneur en eau (Singh, 2018).

1. Évaluation de la libération *in vitro* de la DAO à partir des comprimés monolithiques

Les résultats de la première partie du projet ont permis de confirmer l'effet des cryoprotecteurs sur l'activité de la DAO après la lyophilisation et durant la période de stockage. Dans la deuxième partie du projet, nous voulions voir l'effet des cryoprotecteurs durant la libération de la DAO (*in vitro*) dans le milieu gastrique (SGF) et intestinal simulé (SIF).

Par rapport aux comprimés de la DAO lyophilisée sans cryoprotecteur ajouté, les comprimés à base de DAO avec Sucrose et DAO avec tréhalose ajoutés ont généré une quantité plus élevée de DAO libérée, tandis que les comprimés à base de DAO sans ajout ont conduit à une quantité très faible de DAO libérée. En fait, les comprimés DAO-SUC ont libéré près de 80% de la quantité de DAO après 3h dans le milieu intestinal simulé, tandis que pour les comprimés DAO-TRE le maximum de libération observée a été 70%. Cette différence peut être due aux propriétés du sucrose et du tréhalose en tant que cryoprotecteurs : la solubilité plus élevée du sucrose (200g/100mL) par rapport à celle du tréhalose (68.9g/100mL). Intéressant à mentionner que les deux cryoprotecteurs peuvent se comporter comme une sorte d'accélérateur de « gonflement », favorisant la libération de l'enzyme. De plus, le temps de libération de 5h est optimal, compte tenu du temps de transit de 5-6h d'un comprimé pris par voie orale pour atteindre le côlon.

Les comprimés à base de DAO sans cryoprotecteur ont libéré la plus faible quantité d'enzyme avec seulement près de 20% de la quantité totale de DAO après 5 heures (2h en SGF et 3h en SIF). En fait, il a été rapporté que le tréhalose et le sucrose semble être les meilleurs cryoprotecteurs pour

les biomolécules, en raison de leurs nombreux avantages par rapport aux autres sucres. Ces disaccharides permettent une formation plus flexible de liaisons hydrogène avec la protéine. En raison de ces liaisons, le sucrose et tréhalose vont interagir avec la surface de l'enzyme et avec les milieux externes (gastrique ou intestinal) en même temps (Fonte *et al.*, 2012). Dans le tractus gastro-intestinal, un environnement considéré difficile pour l'enzyme en raison des effets du pH et des enzymes protéolytiques (pepsine, pancréatine), la présence de la matrice carbohydre formée par les disaccharides sucrose et tréhalose a permis de protéger davantage la DAO en évitant le contact direct de l'enzyme avec les milieux externes permettant ainsi une libération de l'enzyme en plus grande quantité et dans un meilleur état. En ce qui concerne l'étude des profils de libération obtenus pour les comprimés de DAO avec ou sans les cryoprotecteurs ajoutés durant la période de stockage, il est possible de conclure que le schéma de libération de la DAO est resté à peu près le même avec le maximum de libération pour les comprimés DAO-SUC suivi par DAO-TRE et la plus faible libération pour la DAO sans cryoprotecteurs.

Afin de comparer nos comprimés avec les produits commerciaux deux suppléments commerciaux de diamine oxydase végétale sous forme de comprimés et de capsules ont également été évalués pour la libération d'enzyme dans les mêmes conditions que nos comprimés (2h dans SGF, puis transférés dans SIF jusqu'à dissolution complète). Les comprimés commerciaux n'ont pas présenté de résistance gastrique, et les capsules commerciales ont perdu leurs intégrité et ainsi sans offrir le même niveau de gastro-protection que nos comprimés monolithiques préparés avec des poudres de DAO lyophilisée avec des disaccharides cryoprotecteurs formulés avec du CM-Cellulose (CMC) comme excipient. L'activité DAO dans le comprimé commercial a atteint 50% de l'activité totale à 5 h, tandis que dans la capsule, l'activité maximale atteinte était de 20% à 3 h. Ensuite, l'activité DAO a diminué à 8% à la fin du test. Ces résultats suggèrent que les comprimés à base de vDAO lyophilisée en présence de sucrose ou tréhalose ont un meilleur avantage car leur mécanisme contrôlé de relargage est préservé même après une résidence au pH bas assez longtemps (jusqu'au 2 h) pour atteindre ensuite le tractus intestinal et dégrader l'histamine accumulée à ce niveau.

CONCLUSION

En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que l'ajout de disaccharides tels que le sucrose ou le tréhalose comme agents cryoprotecteurs avant l'étape de lyophilisation, permettent une bonne protection de la DAO durant le processus de séchage, ce qui a permis d'avoir un meilleur rendement en termes d'activité enzymatique retenue et ce même après une longue période de stockage à différentes températures.

Malgré les propriétés physico-chimiques difficile du tube digestif telles que l'osmolarité, le pH, et les enzymes pancréatiques, les études de stabilité et de la libération contrôlée de la DAO *in vitro* dans les milieux gastrique et intestinal simulés ont permis de conclure que la présence de sucrose ou tréhalose dans la formulation des comprimés monolithiques permet de réduire les interactions directes entre l'enzyme et les milieux externes (gastrique et intestinal) ce qui protège l'enzyme contre les variation et le stress de l'environnement conduisant à une plus grande activité de l'enzyme tout au long de la période stockage.

L'approche de formulation de la DAO avec des disaccharides (sucrose, tréhalose) proposée se veut être une bonne suggestion pour la mise en place d'un traitement thérapeutique plus efficace pour réduire les dysfonctions liées à l'histamine. Pour des travaux à venir, il serait intéressant de mettre l'accent sur le mécanisme de stabilisation de la DAO par les disaccharides, afin de mieux comprendre leur fonctionnement et ainsi mieux adapter la formulation en forme de comprimés. Il serait aussi intéressant de passer à la fabrication des comprimés de DAO selon les normes des Bonnes pratiques de fabrication des ingrédients pharmaceutiques actifs, dans le but de passer d'un supplément alimentaire à un produits pharmaceutique utilisable pour les traitements des dysfonctions liées à l'histamine. Enfin, il serait pertinent d'évaluer l'efficacité de la DAO *in vivo* et d'étudier le profil de sa libération.

APPENDICE A

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE À LA RÉDACTION ET LA PUBLICATION D'UN ARTICLE SCIENTIFIQUE DURANT LE PROJET DE MAÎTRISE

"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 Ohlund ¹, Kathrina Mae Kumaresan ¹, Meriem Megoura ^{1,2}, Thomas D Warkentin ³, Pompilia Ispas-Szabo ^{1,2}, Lekha Sleno ¹, Mircea Alexandru Mateescu ^{1,2}

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

²*Department of Chemistry & Research Chair Allerdys-Prevention of Allergies and Enteric Dysfunctions, Université du Québec à Montreal, CP 8888, Branch A, Montreal, QC H3C 3P8, Canada.*

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

Cet article a été publié dans le Journal *Int J Mol Sci.* 2023, 24(5), 4625

DOI : <https://doi.org/10.3390/ijms24054625>

This article belongs to the Special Issue *Biological Properties of Medicinal Plants*

*Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu & Abdelkrim Azzouz

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

Phone: +1 (514) 987 4319, Tel: +1 514 987 4119; Fax: +1 514 987 4054

e-mail: mateescu.m-alexandru@uqam.ca ; azzouz.a@uqam.ca.



Article

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 Sleno^{1,*} and Mircea Alexandru Mateescu^{1,2,*}

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

² Department of Chemistry & Research Chair Allerdys—Prevention of Allergies and Enteric Dysfunctions, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Branch A, Montreal, QC H3C 3P8, Canada

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

* Correspondence: sleno.lekha@uqam.ca (L.S.); mateescu.m-alexandru@uqam.ca (M.A.M.);
Tel.: +1(514)987-3000 (ext. 1599) (L.S.); +1(514)987-4319 (M.A.M.)



Citation: Boulfekhar, R.; Ohlund, L.; Kumaresan, K.M.; Megoura, M.; Warkentin, T.D.; Ispas-Szabo, P.; Sleno, L.; Mateescu, M.A. 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. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4625. <https://doi.org/10.3390/ijms24054625>

Academic Editors: Raffaele Capasso, Rafael Cypriano Dutra and Elisabetta Caiazza

Received: 30 November 2022

Revised: 7 February 2023

Accepted: 24 February 2023

Published: 27 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

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

1. Introduction

Histamine intolerance (HIT), also referred to as enteral histaminosis, is a disorder caused by an excessive increase in histamine [1]. Histamine is a biogenic amine that plays an important role in the body as a neuromediator and immune modulator [2]. In contrast, HIT is defined by the impaired gastrointestinal breakdown of histamine from ingesting foods containing high levels of it [3], such as chocolate, certain cheeses, sauerkraut, tomatoes, and some red wines [4]. Among the causes of HIT is a reduced ability to metabolize histamine via the intestinal enzyme diamine oxidase (DAO) [5–7].

Considering that DAO is the main exogenous histamine-degrading enzyme with predominant activity in the gut, histamine excess in the gut lumen may trigger diarrhoea, abdominal pain, or constipation by enhancing neurosecretory functions and muscle contractility [8]. In addition, histamine excess may be linked to serious inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis [9]. DAO copper-containing amine

APPENDICE B

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE À LA RÉDACTION ET LA PUBLICATION D'UN ARTICLE SCIENTIFIQUE DURANT LE PROJET DE MAÎTRISE

"Synthesis of Metal-Loaded Carboxylated Biopolymers with Antibacterial Activity through Metal Subnanoparticle Incorporation."

Farzaneh Noori¹, Meriem Megoura¹, Marc-André Labelle¹, Mircea Alexandru Mateescu^{*1} and Abdelkrim Azzouz^{*1,2}

¹*Chemistry Department, Nanoqam, Université du Québec à Montréal, QC H3C 3P8, Canada.*

²*École de Technologie Supérieure, Montreal, QC H3C 1K3, Canada.*

Cet article a été publié dans le Journal *Antibiotics* 2022, 11, 439

<https://doi.org/10.3390/antibiotics11040439>

*Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu & Abdelkrim Azzouz

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

Phone: +1 (514) 987 4319, Tel: +1 514 987 4119; Fax: +1 514 987 4054

e-mail: mateescu.m-alexandru@uqam.ca ; azzouz.a@uqam.ca.

Article

Synthesis of Metal-Loaded Carboxylated Biopolymers with Antibacterial Activity through Metal Subnanoparticle Incorporation

Farzaneh Noori¹, Meriem Megoura¹, Marc-André Labelle¹, Mircea Alexandru Mateescu^{1,*} and Abdelkrim Azzouz^{1,2,*}

¹ Nanoqam, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Université du Québec à Montréal, Montreal, QC H3C 3P8, Canada; noori.farzaneh@courrier.uqam.ca (F.N.); megoura.meriem@courrier.uqam.ca (M.M.); labelle.marc-andre.2@courrier.uqam.ca (M.-A.L.)

² École de Technologie Supérieure, Montreal, QC H3C 1K3, Canada

* Correspondence: mateescu.m-alexandru@uqam.ca (M.A.M.); azzouz.a@uqam.ca (A.A.);

Tel.: +1-514-987-4319 (M.A.M.); +1-514-987-3000 (ext. 4119) (A.A.); Fax: +1-514-987-4054 (M.A.M. & A.A.)

Abstract: Carboxymethyl starch (CMS) and carboxymethyl cellulose (CMC) loaded by highly dispersed metal subnanoparticles (MSNPs) showed antibacterial activity against *E. coli* and *B. subtilis* strains. Copper and silver were found to act in both cationic and zero-valence forms. The antibacterial activity depends on the metal species content but only up to a certain level. Silver cation (Ag^+) showed higher antibacterial activity as compared to Ag^0 , which was, however, more effective than Cu^0 , due to weaker retention. The number of carboxyl groups of the biopolymers was found to govern the material dispersion in aqueous media, the metal retention strength and dispersion in the host-matrices. Cation and metal retention in both biopolymers was found to involve interactions with the oxygen atoms of both hydroxyl and carboxyl groups. There exists a ternary interdependence between the Zeta potential (ZP), pH induced by the biocidal agent and its particle size (PS). This interdependence is a key factor in the exchange processes with the surrounding species, including bacteria. Clay mineral incorporation was found to mitigate material dispersion, due to detrimental competitive clay:polymer interaction. This knowledge advancement opens promising prospects for manufacturing metal-loaded materials for biomedical applications.

Keywords: carboxymethyl starch; carboxymethyl cellulose; metal subnanoparticles; antibacterial activity



Citation: Noori, F.; Megoura, M.; Labelle, M.-A.; Mateescu, M.A.; Azzouz, A. Synthesis of Metal-Loaded Carboxylated Biopolymers with Antibacterial Activity through Metal Subnanoparticle Incorporation. *Antibiotics* 2022, 11, 439. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040439>

Academic Editors: Roberto Cristina, Rosaria Anna Picca and Maria Chiara Sportelli

Received: 22 February 2022

Accepted: 21 March 2022

Published: 24 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Excessive use of conventional organic antibiotics was already recognized as favoring pathogenic microorganism resistance with negative impact on animal and human health [1–4]. Nowadays, this is regarded as being a major environmental issue. The use of highly dispersed metals could be an interesting avenue to explore, since metal nanoparticles (MNPs) have a broad-spectrum activity being efficient against both Gram-positive and Gram-negative microorganisms [5,6]. Their non-selective toxicity arises from the production of a wide variety of reactive oxidative species (ROS) through the oxidative stress induced on microorganisms.

Among many other metals, copper and silver already showed antibacterial activity [6–11] and anticancer properties [12]. These features were found to be improved by high contact surface with microorganisms, but their tendency to aggregate [13–15] is known to affect their toxicity toward bacteria [16,17]. High dispersion into the smallest particles possible by using suitable host-matrices or surfactants bearing highly chelating groups can prevent this drawback [6,18–26]. Therefore, the synthesis of metal subnanoparticles by using carboxymethylated biopolymers was the target of the present work. The novelty core resides less in the synthesis of metal subnanoparticles than in an original approach to correlate the interactions involved between the incorporated metal and the host-matrices with their antibacterial activity. Such an approach has not been tackled so far.

APPENDICE C

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE À LA RÉDACTION ET LA PUBLICATION D'UN ARTICLE SCIENTIFIQUE DURANT LE PROJET DE MAÎTRISE

"Insights into the metal retention role in the antibacterial behavior of montmorillonite and cellulose tissue-supported copper and silver nanoparticles"

Farzaneh Noori^a, Armelle Tchoumi Neree^b, Meriem Megoura^{ab}, Mircea Alexandru Mateescu^{*ab} and Abdelkrim Azzouz^{*a}

^a*Chemistry Department, Nanoqam, Université du Québec à Montréal, QC H3C 3P8, Canada.*

^b*CERMO-FC Center, Université du Québec à Montréal, QC H3C 3P8, Canada*

Cet article a été publié dans le Journal *RSC Advances*, 2021, Volume 11 : 24156-24171.

DOI : [10.1039/D1RA02854E](https://doi.org/10.1039/D1RA02854E).

*Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu & Abdelkrim Azzouz

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

Phone: +1 (514) 987 4319, Tel: +1 514 987 4119; Fax: +1 514 987 4054

e-mail: mateescu.m-alexandru@uqam.ca ; azzouz.a@uqam.ca.

Cite this: *RSC Adv.*, 2021, 11, 24156

Insights into the metal retention role in the antibacterial behavior of montmorillonite and cellulose tissue-supported copper and silver nanoparticles†

 Farzaneh Noori,^a Armelle Tchoumi Neree,^b Meriem Megoura,^{ab}
Mircea Alexandru Mateescu ^{*ab} and Abdelkrim Azzouz ^{**a}

The role of the retention strength of Cu⁰ and Ag⁰ nanoparticles on the induced antibacterial properties of montmorillonite and cellulose-supported polyol dendrimer was comparatively investigated. An unprecedented approach involving X-ray photoelectron spectroscopy, thermal analyses, and surface charge measurements allowed correlating the host–matrix features to the different antibacterial activities of Cu⁰ and Ag⁰ nanoparticles against both the bacterial strains. Optimal metal–matrix interactions appear to favor high dispersion of both metal particles and material grains, thereby improving the contact surface with the cultivation media. This was explained in terms of hydrophilic character and judicious compromise between the metal retention by the host–matrix and release in the impregnating media. Competitive Lewis acid–base interactions appear to occur between MNP, solid surface and liquid media. These findings are of great importance, providing a deeper understanding of the antibacterial activity of metal-loaded materials. This opens promising prospects for vegetal fibers and clay-supported drugs to treat dermatological and gastro-intestinal infections.

Received 12th April 2021
Accepted 20th June 2021

DOI: 10.1039/d1ra02854e

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

Overuse of conventional antibiotics has led to pathogenic bacteria adaption and rise of resistance, which has been found to be a direct cause of a series of outbreaks of infectious diseases.¹ This has become a major medical issue that has imposed a great challenge to be addressed.² Some metal nanoparticles (MNPs) can behave as potential surrogates for organic antibiotics, given the well-known toxicity of heavy metals in certain concentrations in aqueous media. Metals are known as metabolism disturbing agents, some of them being harmful for animals and humans.³ Certain zero-valent metals (metal-zero) such as silver in high dispersion state have long been used for treating skin bacterial infections.⁴ Nanoparticles of gold, zinc, and titanium have showed high bioactivity. In this context, silver (Ag) and copper (Cu) are also promising nanoparticles that have shown broad-spectrum activity against many species of Gram-positive and Gram-negative bacteria.^{5–11} High antibacterial activity against pathogens has already been reported for finely dispersed MNP¹² and more particularly AgNPs, which

appears to generate free radicals that inhibit microbial growth.¹³ Reportedly, eco-friendly and cost-effective cotton fabric-based composite materials doped with copper oxide have shown antibacterial action against *Staphylococcus epidermis* and *Escherichia coli*.¹⁴ Preliminary unpublished tests have provided arguments that metal-loaded polyhydroxylic matrices act as antibacterial agents.¹⁵

These performances have often been explained in terms of the contribution of the antibacterial properties of metal without sufficient emphasis on metal dispersion. In spite of the wide literature reported in this regard, the effect of the interactions occurring between the host–matrix and both MNPs on the infected media has scarcely been tackled so far. Furthermore, the role of metal retention strength in the antibacterial activity that has never been evaluated and still remains to be elucidated has been undertaken in the present study.

MNPs have a strong tendency to aggregate into bulky inactive clusters.¹⁶ So far, a wide variety of metal-loaded materials with antibacterial activity have been synthesized.¹⁷ Both zero-valent and cationic metal forms are known to behave as Lewis acids, and can interact with basic chemical groups. Polyols and polyamines bear specific chemical groups that confer them chelating and stabilizing properties for metals.¹⁸ Besides, unavoidable interparticle H-bridges interactions often lead to a compacted structure and enhanced metal encapsulation that impede direct metal interaction with the infected area, thereby reducing their antibacterial activity. MNP dispersion and

^aChemistry Department, Nanoqam, Université du Québec à Montréal, QC, H3C 3P8, Canada. E-mail: mateescu.m-alexandru@uqam.ca; azzouz.a@uqam.ca; Fax: +1 514 987 4054; Tel: +1 514 987-4319; +1 514 987 3000 ext. 4119

^bCERMO-FC Center, Université du Québec à Montréal, QC, H3C 3P8, Canada

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1ra02854e



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agostinelli E, Arancia G, Vedova LD, Belli F, Marra M, Salvi M et Toninello A (2004) The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: perspectives of clinical applications. *Amino Acids* 27: 347-58.
- Angelini R, Cona A, Federico R, Fincato P, Tavladoraki P et Tisi A (2010) Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 560-4.
- Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC et Carpenter JF (2001) Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46: 307-26.
- Befani O, Shiozaki T, Turini P, Gerosa P et Mondovi B (1995) Inhibition of diamine oxidase activity by metronidazole. *Biochemical and biophysical research communications* 212: 589-94.
- Benly P (2015) Role of histamine in acute inflammation. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Research* 7: 373-6.
- Binda C, Newton-Vinson P, Hubálek F, Edmondson DE et Mattevi A (2002) Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature Structural Biology* 9: 22-6.
- Bjelošević M, Zvonar Pobirk A, Planinšek O et Ahlin Grabnar P (2020) Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *International Journal of Pharmaceutics* 576: 119029.
- Bodmer S, Imark C et Kneubühl M (1999) Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Research* 48: 296-300.
- Bonivento D, Milczek EM, McDonald GR, Binda C, Holt A, Edmondson DE et Mattevi A (2010) Potentiation of ligand binding through cooperative effects in monoamine oxidase B. *The Journal of biological chemistry* 285: 36849-56.
- Borriello F, Iannone R et Marone G (2017) Histamine release from mast cells and basophils. *Histamine and histamine receptors in health and disease* 121-39.
- Boyce S, Tipton KF, O’Sullivan MI, Davey GP, Gildea MM, McDonald AG, Olivieri A et O’Sullivan J (2009) Nomenclature and potential functions of copper amine oxidases. *Floris G, Mondovi B (eds) Copper amine oxidases CRC Press, Boca Raton* 5-17.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.

- Brazeau BJ, Johnson BJ et Wilmot CM (2004) Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428: 22-31.
- Butreddy A, Janga KY, Ajjarapu S, Sarabu S et Dudhipala N (2021) Instability of therapeutic proteins - An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in lyophilized proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* 167: 309-25.
- Calinescu C, Mondovi B, Federico R, Ispas-Szabo P et Mateescu MA (2012) Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 428: 48-56.
- Carpenter JF, Chang BS, Garzon-Rodriguez W et Randolph TW (2002) Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Theory and Practice. Dans *Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice*. Carpenter JF et Manning MC, eds. Springer US. Boston, MA.
- Castelo Branco AC, Seiti F, Pietrobon A et Sato M (2018) Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2018: 1-10.
- Chan JM (2019) Drug Metabolism and Pharmacogenetics. Dans *Pharmacology and physiology for anesthesia*. Hugh C. Hemmings et Egan. TD, eds, Ed 2nd. Elsevier. Philadelphia, PA.
- Chang BS, Beauvais RM, Dong A et Carpenter JF (1996) Physical Factors Affecting the Storage Stability of Freeze-Dried Interleukin-1 Receptor Antagonist: Glass Transition and Protein Conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 331: 249-58.
- Chang L, Shepherd D, Sun J, Ouellette D, Grant KL, Tang X et Pikal MJ (2005a) Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94: 1427-44.
- Chang L, Shepherd D, Sun J, Tang X et Pikal MJ (2005b) Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: Implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94: 1445-55.
- Chang LL et Pikal MJ (2009) Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 2886-908.
- Checkoway H, Franklin GM, Costa-Mallen P, Smith-Weller T, Dilley J, Swanson PD et Costa LG (1998) A genetic polymorphism of MAO-B modifies the association of cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology* 50: 1458-61.
- Chi EY, Krishnan S, Randolph TW et Carpenter JF (2003) Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmaceutical Research* 20: 1325-36.

- Chomdom Kouna P, Tchoumi Neree A, Pietrangeli P, Marcocci L et Mateescu MA (2022) Faster and sensitive zymographic detection of oxidases generating hydrogen peroxide. The case of diamine oxidase. *Analytical Biochemistry* 648: 114676.
- Cicerone MT, Pikal MJ et Qian KK (2015) Stabilization of proteins in solid form. *Advanced Drug Delivery Reviews* 93: 14-24.
- Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, Rabell-González J, Veciana-Nogués MT et Vidal-Carou MC (2020a) Lyophilised legume sprouts as a functional ingredient for diamine oxidase enzyme supplementation in histamine intolerance. *LWT* 125: 109-201.
- Comas-Basté O, Latorre-Moratalla ML, Sánchez-Pérez S, Veciana-Nogués MT et Vidal-Carou MC (2019a) In vitro determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411: 7595-602.
- Comas-Basté O, Luz Latorre-Moratalla M, Sánchez-Pérez S, Teresa Veciana-Nogués M et del Carmen Vidal-Carou M (2019b) Histamine and other biogenic amines in food. From scombroid poisoning to histamine intolerance. Dans *Biogenic Amines*. Proestos C, ed, Vol 1. IntechOpen London, UK.
- Comas-Basté O, Sánchez-Pérez S, Veciana-Nogués MT, Latorre-Moratalla M et Vidal-Carou MDC (2020b) Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules* 10: 11-81.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R et Tavliadoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11: 80-8.
- Crowe JH, Carpenter JF et Crowe LM (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 60: 73-103.
- Dale HH et Laidlaw PP (1910) The physiological action of β -iminazolyethylamine. *The Journal of physiology* 41: 318.
- Dawkes HC et Phillips SEV (2001) Copper amine oxidase: cunning cofactor and controversial copper. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 666-73.
- Duralliu A, Matejtschuk P, Stickings P, Hassall L, Tierney R et Williams DR (2020) The Influence of Moisture Content and Temperature on the Long-Term Storage Stability of Freeze-Dried High Concentration Immunoglobulin G (IgG). *Pharmaceutics* 12: 303.
- Duralliu A, Matejtschuk P et Williams DR (2019) Measuring the specific surface area (SSA) of freeze-dried biologics using inverse gas chromatography. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 142: 216-21.

- Enwonwu CO, Afolabi BM, Salako LO, Idigbe EO et Bashirelah N (2000) Increased plasma levels of histidine and histamine in falciparum malaria: relevance to severity of infection. *Journal of Neural Transmission* 107: 1273-87.
- Falus A, Grosman N et Darvas Z (2004) Histamine : biology and medical aspects. Dans *Histamine : biology and medical aspects*. Falus A, ed. Karger publisher. Basel, Switzerland.
- Fissore D, Pisano R et Barresi A (2019) Freeze Drying of Pharmaceutical Products. Dans. CRC Press. london, New York.
- Floris G et Agrò AF (2004) Amine Oxidases. Dans *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Lennarz WJ et Lane MD, eds. Elsevier. New York.
- Floris G et Finazzi Agrò A (2013) Amine Oxidases. Dans *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Lennarz WJ et Lane MD, eds. Academic Press. Waltham.
- Fonte P, Soares S, Costa A, Andrade JC, Seabra V, Reis S et Sarmiento B (2012) Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomatter* 2: 329-39.
- Franks F (1994) Long-term stabilization of biologicals. *Bio/Technology* 12: 253-6.
- Franks F et Auffret T (2008) Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals. Dans. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- Garcia-Caballero M, Neugebauer E, Campos R, Nunez de Castro I et Vara-Thorbeck C (1988) Increased histidine decarboxylase (HDC) activity in human colorectal cancer: Results of a study on ten patients. *Agents and Actions* 23: 357-60.
- Gaweska H et Fitzpatrick PF (2011) Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomolecular Concepts* 2: 365-77.
- Grasmeijer N, Stankovic M, de Waard H, Frijlink HW et Hinrichs WL (2013) Unraveling protein stabilization mechanisms: vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1834: 763-9.
- Gutka H (2018) Rational selection of sugars for biotherapeutic stabilization: a Practitioner's perspective. *Bioprocess International* 40-4.
- Hansen L, Daoussi R, Vervaeet C, Remon J-P et De Beer T (2015) Freeze-drying of live virus vaccines: a review. *Vaccine* 33: 5507-19.
- Hodges P et Kelly P (2020) Inflammatory bowel disease in Africa: what is the current state of knowledge? *International Health* 12: 222-30.

- Hrubisko M, Danis R, Huorka M et Wawruch M (2021) Histamine Intolerance-The More We Know the Less We Know. A Review. *Nutrients* 13: 22-8.
- Hua T-C, Liu B-L et Zhang H (2010) Freeze-drying of pharmaceutical and food products. Dans. Elsevier. Boca Raton, Boston, NY, Washington, D.C.
- Huang G, Zhu F, Chen Y, Chen S, Liu Z, Li X, Gan L, Zhang L et Yu Y (2016) A spectrophotometric assay for monoamine oxidase activity with 2, 4-dinitrophenylhydrazine as a derivatized reagent. *Analytical Biochemistry* 512: 18-25.
- Huang H, Li Y, Liang J et Finkelman FD (2018) Molecular Regulation of Histamine Synthesis. *Frontiers in Immunology* 9: 1392.
- Huang J, Hong D, Lang W, Liu J, Dong J, Yuan C, Luo J, Ge J et Zhu Q (2019) Recent advances in reaction-based fluorescent probes for detecting monoamine oxidases in living systems. *Analyst* 144: 3703-9.
- Imamura K, Ogawa T, Sakiyama T et Nakanishi K (2003) Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92: 266-74.
- Izutsu KI (2018) Applications of Freezing and Freeze-Drying in Pharmaceutical Formulations. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1081: 371-83.
- Jarisch R, Wantke F, Raithel M et Hemmer W (2015) Histamine and biogenic amines. Dans *Histamine Intolerance*. Springer. Berlin, Heidelberg.
- Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT, Pedersen BV, Nielsen NM et Frisch M (2012) Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology* 143: 375-81 e1; quiz e13-4.
- Jones BL et Kearns GL (2011) Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 89: 189-97.
- Jumarie C, Séide M, Marcocci L, Pietrangeli P et Mateescu MA (2017) Diamine Oxidase from White Pea (*Lathyrus sativus*) Combined with Catalase Protects the Human Intestinal Caco-2 Cell Line from Histamine Damage. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182: 1171-81.
- Kasper JC et Friess W (2011) The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78: 248-63.
- Kawai K et Suzuki T (2007) Stabilizing effect of four types of disaccharide on the enzymatic activity of freeze-dried lactate dehydrogenase: step by step evaluation from freezing to storage. *Pharmaceutical Research* 24: 1883-90.

- Kettner L, Seitl I et Fischer L (2020) Evaluation of porcine diamine oxidase for the conversion of histamine in food - relevant amounts. *Journal of Food Science* 85: 843-52.
- Kovacova-Hanuszkova E, Buday T, Gavliakova S et Plevkova J (2015) Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia* 43: 498-506.
- Kumar V, Dooley DM, Freeman HC, Guss JM, Harvey I, McGuirl MA, Wilce MCJ et Zubak VM (1996) Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure* 4: 943-55.
- Landete JM, Ferrer S, Polo L et Pardo I (2005) Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1119-24.
- Landete JM, Pardo I et Ferrer S (2006) Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine. *FEMS Microbiology Letters* 260: 84-90.
- Lavizzari T, Veciana-Nogués MT, Weingart O, Bover-Cid S, Mariné-Font A et Vidal-Carou MC (2007) Occurrence of biogenic amines and polyamines in spinach and changes during storage under refrigeration. *J Agric Food Chem* 55: 9514-9.
- 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.
- Lerbret A, Bordat P, Affouard F, Descamps M et Migliardo F (2005) How homogeneous are the trehalose, maltose, and sucrose water solutions? An insight from molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B* 109: 11046-57.
- Liu B et Zhou X (2021) Freeze-Drying of Proteins. *Methods in Molecular Biology* 2180: 683-702.
- Maintz L et Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85: 1185-96.
- Masini E, Bani D, Marzocca C, Mateescu MA, Mannaioni PF, Federico R et Mondovì B (2007a) Pea Seedling Histaminase as a Novel Therapeutic Approach to Anaphylactic and Inflammatory Disorders. *TheScientificWorldJOURNAL* 7: 408423.
- Masini E, Cuzzocrea S, Bani D, Mazzon E, Muja C, Mastroianni R, Fabrizi F, Pietrangeli P, Marcocci L et Mondovì B (2007b) Beneficial effects of a plant histaminase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock* 27: 409-15.
- Masini E, Pierpaoli S, Marzocca C, Mannaioni PF, Pietrangeli P, Mateescu MA, Zelli M, Federico R et Mondovì B (2003) Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 309: 432-9.

- Mateescu MA, Koudoufio MD, Tchoumi Neree A et Mondovì B (2017) Plant Histaminase as Bioactive Agent to Lower the Histamine Level: A Mini-Review. *Journal of Gastroenterology and Research 1*: 34-41.
- McGrath AP, Hilmer KM, Collyer CA, Dooley DM et Guss JM (2010) A new crystal form of human diamine oxidase. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications 66*: 137-42.
- 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*: 264-6.
- Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K et Hinrichs WL (2017) How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 114*: 288-95.
- Mocking T, Bosma R, Rahman S, Verweij E, McNaught-Flores DA, Vischer HF et Leurs R (2016) Molecular aspects of histamine receptors. Dans *Histamine Receptors*. Blandina P et Passani M, eds. Humana Press. Switzerland.
- Moosavi-Movahedi AA, Amani M, Moosavi-Nejad SZ, Hashemnia S, Ahmad F, Floris G, Mura A, Rezaei-Tavirani M, Hakimelahi GH, Saboury AA, et al. (2007) Thermal Dissection of Lentil Seedling Amine Oxidase Domains by Differential Scanning Calorimetry. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 71*: 1644-9.
- Mu D, Medzihradzky KF, Adams GW, Mayer P, Hines WM, Burlingame AL, Smith AJ, Cai D et Klinman JP (1994) Primary structures for a mammalian cellular and serum copper amine oxidase. *Journal of Biological Chemistry 269*: 9926-32.
- Mura A, Padiglia A, Medda R, Pintus F, Agrò AF et Floris G (2006) Properties of copper-free pig kidney amine oxidase: Role of topa quinone. *FEBS Letters 580*: 4317-24.
- Mutukuri TT, Wilson NE, Taylor LS, Topp EM et Zhou QT (2021) Effects of drying method and excipient on the structure and physical stability of protein solids: Freeze drying vs. spray freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics 594*: 120169.
- Nema S et Kenneth EA (1993) Freeze-thaw studies of a model protein, lactate dehydrogenase, in the presence of cryoprotectants. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 47*: 76-83.
- Neree AT, Pietrangeli P, Szabo PI, Mateescu MA et Marcocci L (2018) Stability of Vegetal Diamine Oxidase in Simulated Intestinal Media: Protective Role of Cholic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 66*: 12657-65.
- Neree AT, Soret R, Marcocci L, Pietrangeli P, Pilon N et Mateescu MA (2020) Vegetal diamine oxidase alleviates histamine-induced contraction of colonic muscles. *Scientific Reports 10*: 1-13.

- Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WL, Stark H, Thurmond RL et Haas HL (2015) International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacological Reviews* 67: 601-55.
- Parsons MR, Convery MA, Wilmot CM, Yadav KD, Blakeley V, Corner AS, Phillips SE, McPherson MJ et Knowles PF (1995) Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure* 3: 1171-84.
- Perić-Hassler L, Hansen HS, Baron R et Hünenberger PH (2010) Conformational properties of glucose-based disaccharides investigated using molecular dynamics simulations with local elevation umbrella sampling. *Carbohydrate Research* 345: 1781-801.
- 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: 33-9.
- Pietrangeli P, Capuozzo E, Mateescu MA et Marcocci L (2020) Copper-containing amine oxidase purified from *Lathyrus sativus* as a modulator of human neutrophil functions. *International Journal of Molecular Medicine* 45: 1583-90.
- 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.
- Potts RA, Tiffany CM, Pakpour N, Lokken KL, Tiffany CR, Cheung K, Tsolis RM et Luckhart S (2016) Mast cells and histamine alter intestinal permeability during malaria parasite infection. *Immunobiology* 221: 468-74.
- Pugin B, Barcik W, Westermann P, Heider A, Wawrzyniak M, Hellings P, Akdis CA et O'Mahony L (2017) A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. *Microbial Ecology and Health Disease* 28: 1353881.
- Sánchez-Pérez S, Comas-Basté O, Duelo A, Veciana-Nogués MT, Berlanga M, Latorre-Moratalla ML et Vidal-Carou MC (2022) Intestinal Dysbiosis in Patients with Histamine Intolerance. *Nutrients* 14: 1774.
- Schnedl WJ, Schenk M, Lackner S, Enko D, Mangge H et Forster F (2019) Diamine oxidase supplementation improves symptoms in patients with histamine intolerance. *Food Science Biotechnology* 28: 1779-84.
- Schwelberger H (2004) Histamine: Biology and Medical Aspects. Dans *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Falus A, ed. SpringMed Publishing. Budapest.
- Schwelberger H (2009) Histamine intolerance: overestimated or underestimated? *Inflammation research* 58: 51.

- Schwelberger H, Ahrens F, Fogel W et Sánchez-Jiménez F (2013) Histamine metabolism. Dans *Histamine H4 receptor: a novel drug target for immunoregulation and inflammation* Stark H, ed. Versita Limited. London, England.
- Schwelberger H, Hittmair A et Kohlwein S (1998) Analysis of tissue and subcellular localization of mammalian diamine oxidase by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society* 47: S60-S1.
- Shahid M, Tripathi T, Sobia F, Moin S, Siddiqui M et Khan RA (2009) Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an updated systematic review. *The Open Immunology Journal* 2: 9-41.
- Singh SK (2018) Sucrose and trehalose in therapeutic protein formulations. Dans *Challenges in Protein Product Development*. Warne N et Mahler H, eds, Vol 38. Springer, Cham. Switzerland.
- Smolinska S, Groeger D, Perez NR, Schiavi E, Ferstl R, Frei R, Konieczna P, Akdis CA, Jutel M et O'Mahony L (2016) Histamine Receptor 2 is Required to Suppress Innate Immune Responses to Bacterial Ligands in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Disease* 22: 1575-86.
- Smolinska S, Winiarska E, Globinska A et Jutel M (2022) Histamine: A Mediator of Intestinal Disorders-A Review. *Metabolites* 12: 895.
- Snowman JW (1997) Lyophilization. Dans *Handbook of Downstream Processing*. Goldberg E, ed. Springer Netherlands. Dordrecht.
- Srirangsan P, Kawai K, Hamada-Sato N, Watanabe M et Suzuki T (2010) Improvement in the remaining activity of freeze-dried xanthine oxidase with the addition of a disaccharide–polymer mixture. *Food Chemistry* 119: 209-13.
- Starciuc T, Malfait B, Danede F, Paccou L, Guinet Y, Correia NT et Hedoux A (2020) Trehalose or Sucrose: Which of the Two Should be Used for Stabilizing Proteins in the Solid State? A Dilemma Investigated by In Situ Micro-Raman and Dielectric Relaxation Spectroscopies During and After Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 109: 496-504.
- Steinhoff M., Griffiths C., Church M. et T.A. L (2008) Histamine. Dans *Rook's textbook of dermatology*. Burns T, Breathnach SM, Cox N et Griffiths C, eds, Vol 9. John Wiley & Sons. Oxford, England.
- Sugawara A, Matsui D, Yamada M, Asano Y et Isobe K (2015) Characterization of two amine oxidases from *Aspergillus carbonarius* AIU 205. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119: 629-35.
- Tang X et Pikal MJ (2004) Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research* 21: 191-200.

- Thakral S, Sonje J, Munjal B et Suryanarayanan R (2021) Stabilizers and their interaction with formulation components in frozen and freeze-dried protein formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 173: 1-19.
- Tong J, Meyer JH, Furukawa Y, Boileau I, Chang LJ, Wilson AA, Houle S et Kish SJ (2013) Distribution of monoamine oxidase proteins in human brain: implications for brain imaging studies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33: 863-71.
- Varshney D et Singh M (2015) History of Lyophilization. Dans *Lyophilized Biologics and Vaccines: Modality-Based Approaches*. Varshney D et Singh M, eds. Springer New York. New York, NY.
- Vinel PK, Grobovoy S, Sinitskii A et Kolesnikov O (2021) Modification of a spectrophotometric method for assessment of monoamine oxidase activity with 2, 4-dinitrophenylhydrazine as a derivatizing reagent. *Analytical Biochemistry* 629: 114294.
- Wang B, Tchessalov S, Cicerone MT, Warne NW et Pikal MJ (2009) Impact of sucrose level on storage stability of proteins in freeze-dried solids: II. Correlation of aggregation rate with protein structure and molecular mobility. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 3145-66.
- Wang W (2000) Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 203: 1-60.
- Ward KR et Matejtschuk P (2021a) The principles of freeze-drying and application of analytical technologies. *Cryopreservation and freeze-drying protocols* 99-127.
- Ward KR et Matejtschuk P (2021b) The Principles of Freeze-Drying and Application of Analytical Technologies. *Methods in Molecular Biology* 2180: 99-127.
- Weyler W (1994) Functional expression of C-terminally truncated human monoamine oxidase type A in *Saccharomyces cerevisiae*. Dans *Amine Oxidases: Function and Dysfunction*. Tipton KF, Youdim MBH, Barwell CJ, Callingham BA et Lyles GA, eds. Springer-Vienna. Wien New York.
- Winther LR, Qvist J et Halle B (2012) Hydration and Mobility of Trehalose in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B* 116: 9196-207.
- Wolkers WF et Oldenhof H (2021) Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues. *Methods in Molecular Biology* 2180: 3-25.
- Zhao Y, Zhang X, Jin H, Chen L, Ji J et Zhang Z (2022) Histamine Intolerance—A Kind of Pseudoallergic Reaction. *Biomolecules* 12: 454.