

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

AGENTS BIOACTIFS À BASE DE CUIVRE AVEC DES APPLICATIONS
PHARMACEUTIQUES ET BIOMÉDICALES

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN CHIMIE

PAR
MARIELA GOMEZ PEREZ

JANVIER 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse 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.12-2023). 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 mon directeur, Dr Mircea-Alexandru Mateescu, pour le soutien qui m'a accordé pendant mes études de doctorat. Je lui exprime aussi ma gratitude pour ses conseils judicieux, sa grande disponibilité et son intérêt pour mon intégration dans la communauté scientifique au niveau national et international (congrès et stages).

Je tiens également à remercier la Professeure Lucia Marcocci et la Dre Paola Pietrangeli de l'Université « Sapienza » de Rome, Italie de m'avoir accueillie dans leur laboratoire à Rome et pour leur implication et leur dévouement au projet.

Je remercie infiniment la Dre Joanne Paquin pour sa précieuse collaboration et pour nourrir ma curiosité scientifique avide.

Je suis aussi particulièrement reconnaissante envers Dr Borhane Annabi pour le temps et le soutien accordé à mon projet.

Je tiens à remercier Narjara Gonzalez Suarez d'avoir partagé les techniques expérimentales que j'ai utilisées.

J'aimerais remercier Dre Pompilia Ispas-Szabo pour sa précieuse aide et le partage de son expertise.

Certes, je salue la bienveillance des membres de ma famille, Lucia, Miguel, Gerardo et Maria Teresa, qui ont su m'appuyer sans appréhension dans tous mes projets et mes décisions.

Enfin, je remercie CERMO et la Fondation Courtois pour l'appui à ma recherche qui m'a permis aussi l'octroi des bourses d'études durant ma scolarité à l'UQAM. L'octroi d'une bourse de la Fondation de l'UQAM est également remercié.

TABLE DE MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DE MATIERES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	ix
RÉSUMÉ.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 LA PROBLÉMATIQUE ET REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.1 Le Cuivre : un métal essentiel, mais potentiellement toxique.....	3
1.1.1 Fonctions biologiques du cuivre reliées aux enzymes cuivre-dépendantes.....	3
1.1.2 Absorption, distribution et métabolisme cellulaire du cuivre.....	5
1.1.3 Toxicité du cuivre.....	7
1.2 Maladies orphelines liées aux dysfonctions du métabolisme du cuivre.....	9
1.2.1 Maladie de Wilson.....	9
1.2.1.1 Approches thérapeutiques.....	9
1.2.2 Maladie de Menkes.....	10
1.2.2.1 Approches thérapeutiques.....	11
1.2.3 Cardioencéphalomyopathie hypertrophique.....	11
1.2.3.1 Approches thérapeutiques.....	12
1.3 L’Histamine — Agent essentiel « Ami & Ennemi ».....	12
1.3.1 Métabolisme de l’histamine.....	13
1.3.2 L’histamine et les récepteurs histaminiques.....	15
1.3.2.1 Récepteur H ₁	16
1.3.2.2 Récepteur H ₂	17
1.3.2.3 Récepteur H ₃	17
1.3.2.4 Récepteur H ₄	17
1.3.3 Des dysfonctions dues à l’histamine.....	18
1.3.3.1 L’intolérance à l’histamine ou histaminose alimentaire.....	18
1.3.3.2 Des maladies inflammatoires chroniques de l’intestin.....	20
1.3.3.3 L’histamine dans les troubles du système nerveux central.....	23
1.3.4 Approches thérapeutiques des affections dues à l’histamine.....	24
1.3.4.1 Aspects préventifs.....	24
1.3.4.2 Agents antihistaminiques.....	24
1.3.4.3 Les amine oxydases.....	25
CHAPITRE 2 PRÉSENTATION DU PROJET.....	29
2.1 Présentation du Project de thèse.....	29
2.1.1 Objectifs de recherche.....	30

2.2	Hypothèses	31
2.3	Modèle de cellules P19	34
2.3.1	Différenciation neuronale	35
2.4	Le modèle des cellules Caco-2.....	36
CHAPITRE 3 COPPER COMPLEXES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS: STRUCTURAL INSIGHTS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND NEURON COMPATIBILITY		38
3.1	Résumé.....	40
3.2	Abstract.....	41
3.3	Introduction.....	42
3.4	Experimental Procedures	44
3.4.1	Synthesis of copper complexes	44
3.4.2	Structural characterization	44
3.4.3	Stability in different media	45
3.4.3.1	Spectrophotometric measurements	45
3.4.3.2	Electrochemical measurements.....	45
3.4.4	Antioxidant capacity	45
3.4.4.1	DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) colorimetric method	45
3.4.4.2	DPPH (1,1-Diphenyl-2,2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity.....	46
3.4.5	Neuronal cell culture and treatment	46
3.4.6	Cell viability	47
3.5	Results and discussion.....	47
3.5.1	Chemical analysis of copper complexes	47
3.5.2	X-ray crystal structure of copper complexes	48
3.5.3	FTIR characterization of copper complexes and ligands.....	51
3.5.4	Stability of copper complexes in physiologically-relevant media	53
3.5.4.1	Stability at room temperature	53
3.5.4.2	Cyclic voltammetry.....	55
3.5.4.3	Stability at 37°C.....	56
3.5.5	<i>In vitro</i> Antioxidant Capacity	57
3.5.6	Biocompatibility of copper complexes and ligands.....	60
3.6	Conclusion	61
CHAPITRE 4 BIOACTIVE COPPER(II) AGENTS AND THEIR POTENTIAL INVOLVEMENT IN THE TREATMENT OF COPPER DEFICIENCY-RELATED ORPHAN DISEASES		63
4.1	Résumé.....	65
4.2	Abstract.....	66
4.3	Introduction.....	67
4.4	Materials and methods	68
4.4.1	Synthesis of copper (II) complexes.....	68
4.4.2	Culture, differentiation and treatment of Caco-2 cells.....	69
4.4.3	Viability of Caco-2 cells	70
4.4.4	Effect of the copper (II) complexes on cell monolayers TEER	70
4.4.5	Efflux and retention of copper (II) complexes in cells	71
4.4.6	RT-qPCR assay of copper transporters and metallothionenin	71

4.4.7	Cytochrome c oxidase activity.....	72
4.5	Results and discussion.....	72
4.5.1	Biocompatibility of copper (II) complexes.....	72
4.5.2	Effects of copper (II) complexes on transepithelial electrical resistance (TEER).....	74
4.5.3	Flow and retention of copper(II) complexes in Caco-2 cells.....	76
4.5.4	Effects of copper (II) complexes on the expression of metal transporters and metallothionein.....	79
4.5.5	Effects of copper (II) complexes on the COX activity.....	81
4.6	Conclusion.....	82
CHAPITRE 5 P19-DERIVED NEURONAL CELLS EXPRESS H ₁ , H ₂ , AND H ₃ HISTAMINE RECEPTORS: A BIOPHARMACEUTICAL APPROACH TO EVALUATE ANTIHISTAMINE AGENTS.....		84
5.1	Résumé.....	86
5.2	Abstract.....	87
5.3	Introduction.....	88
5.4	Materials and Methods.....	89
5.4.1	vDAO purification and characterization.....	89
5.4.2	Cell culture.....	90
5.4.3	Cell treatment with antihistamine drugs, vDAO and CAT and H ₂ O ₂	91
5.4.4	Cell phenotypic analysis by immunoblotting.....	91
5.4.5	Cell viability assay.....	92
5.4.6	RT-PCR assay of H- receptors.....	92
5.4.7	Cellular Ca ²⁺ mobilization.....	93
5.4.8	H ₂ O ₂ spectrofluorimetric assay.....	93
5.4.9	Statistics.....	94
5.5	Results and Discussion.....	94
5.5.1	Differentiation of cultured P19 cells into neurons by retinoic acid.....	94
5.5.2	Loss of cell viability in P19 neurons treated with histamine.....	95
5.5.3	No involvement of DAO activity in the histamine-induced loss of cell viability.....	96
5.5.4	Involvement of H-receptors in histamine-induced loss of cell viability.....	97
5.5.5	Histamine-induced cellular Ca ²⁺ mobilization.....	98
5.5.6	Expression of H ₁ , H ₂ and H ₃ receptors in P19 neurons.....	99
5.5.7	Modulation of histamine effect on P19 neurons by exogenous diamine oxidase and catalase.....	100
5.6	Conclusions.....	102
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE.....		104
CONCLUSION.....		109
ANNEXE A DONNÉES SUPPLEMENTAIRES (CHAPITRE 3).....		111
ANNEXE B DONNÉES SUPPLEMENTAIRES (CHAPITRE 4).....		115
APPENDICE A PRINCIPALES RÉALISATIONS : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....		116
BIBLIOGRAPHIE.....		117

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Métabolisme du cuivre.....	6
Figure 1.2 Dommages causés par l'excès d'ions cuivre libres dans les systèmes biologiques	8
Figure 1.3 Représentation schématique du métabolisme du cuivre dans la maladie de Wilson.	9
Figure 1.4 Représentation schématique du métabolisme du cuivre dans la maladie de Menkes.	10
Figure 1.5 Représentation schématique du métabolisme du cuivre dans la cardioencéphalomyopathie hypertrophique.....	12
Figure 1.6 Structure et différents tautomères du monocation d'histamine.....	13
Figure 1.7 Métabolisme, absorption, stockage et libération de l'histamine dans le SNC	14
Figure 1.8. Les voies de dégradation de l'histamine.	15
Figure 1.9. Principales voies de signalisation des récepteurs de l'histamine	16
Figure 1.10 Histaminose alimentaire.....	19
Figure 1.11 Composants immunitaire contribuant à la colite ulcéreuse.....	22
Figure 1.12 Classification des amine oxydases (AO) selon leur cofacteurs.....	25
Figure 1.13 Réactions chimiques des AO sensibles à la semicarbazide (AOSS).....	26
Figure 1.14 Réaction chimique de la Désamination oxydative de la putrescine par la DAO.	27
Figure 1.15 Réaction chimique de la désamination oxydative de l'histamine par la DAO.....	28
Figure 2.1 Présentation graphique de l'avancement du projet de recherche	32
Figure 2.2 Schéma-bloc des différentes étapes du projet (Section sur des agents bioactifs à cuivre).....	33
Figure 2.3 Schéma-bloc des différentes étapes du projet (Section récepteurs histaminiques et agents antihistaminiques).....	34
Figure 2.4 Différenciation des cellules P19 par différents inducteurs	35
Figure 2.5 Différenciation des cellules P19 en neurones en présence d'acide rétinoïque.....	36
Figure 2.6 Différenciation des cellules Caco-2.	36
Figure 2.7 Caractéristiques de base d'une couche épithéliale.	37
Figure 3.1 Structure of [Cu(Ser) ₂] and of [Cu(His) ₂] from crystal X-ray diffraction.....	48
Figure 3.2 Structure of [Cu(Urea) ₂ Cl ₂] and of [Cu(Biuret) ₂ Cl ₂] from crystal X-ray diffraction.....	49

Figure 3.3 FTIR spectra of copper complexes	52
Figure 3.4 UV-Vis absorbance spectra of copper complexes in different physiological media	54
Figure 3.5 Cyclic voltammetry measurements of copper (II) complexes	55
Figure 3.6 Time course of absorbance values at λ_{\max} and 37 °C.....	56
Figure 3.7 The ROS scavenging capacity of copper complexes determined by the DPD assay.....	58
Figure 3.8 The free radical scavenging capacity determined by the DPPH assay.....	59
Figure 3.9 P19 neurons viability of in the presence of copper complexes.....	60
Figure 4.1 Effect of copper (II) complexes on viability of differentiated Caco-2 cells	73
Figure 4.2 Effect of copper (II) complexes on transepithelial electric resistance (TEER).....	75
Figure 4.3 Time course of copper (II) efflux from the apical to the basolateral compartments	76
Figure 4.4 Time course of copper (II) uptake in differentiated Caco-2 cells	77
Figure 4.5 Percentages of copper (II) relative to the corresponding initial concentration	78
Figure 4.6 The relative gene expression of copper transporters and of metallothionein.....	80
Figure 4.7 Effect of copper (II) complexes on Cytochrome c oxidase (COX) activity.....	82
Figure 5.1 Time course of the expression of phenotypic markers in P19 neuron cultures.....	94
Figure 5.2 Effect of histamine on P19 neurons viability.....	95
Figure 5.3 Effect of putrescine and semicarbazide on P19 neurons viability	96
Figure 5.4 Effect of histamine and of the antihistamine agents on cell viability	98
Figure 5.5 Effect of histamine, antihistamine drugs and vDAO on intracellular calcium levels	99
Figure 5.6 Agarose gels of H ₁ , H ₂ , H ₃ and H ₄ amplicons obtained by RT-PCR analysis	100
Figure 5.7 Effect of vDAO and CAT on histamine induced loss of neuron viability	100
Figure 5.8 Production and toxic effect of the H ₂ O ₂ in P19 neuronal cultures.....	101
Figure A 3.1 Time course of absorbance values of the complexes at their λ_{\max} and 37 °C	112
Figure A 3.2 UV-Vis absorbance spectra in different physiologically relevant media.....	114
Figure B 4.1 The agarose gels of CTR1, DMT1, ATP7A, ATP7B and MT amplicons by RT qPCR.....	115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Exemple d'enzymes cuivre-dépendantes chez les mammifères	4
Tableau 1.2 Exemples de molécules intervenant dans la circulation du cuivre chez les mammifères.....	7
Tableau 3.1 Analytical and physical data of the Cu (II) complexes of Ser, His, Urea and Biuret	47
Tableau 3.2 Bond lengths for [Cu(Urea) ₂ Cl ₂]	50
Tableau 3.3 Structural features of copper for the four copper (II) complexes	51
Tableau A 3.1 Crystal data and structure refinement for [Cu(Ser) ₂] and [Cu(Urea) ₂ Cl ₂]	111

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AC	Adénylyl cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adnosine-phosphate cyclique
AO	Amine oxydases
AOSS	Amine oxydase sensibles à la semicarbazide
AP	Apicale
AR	Acide rétinoïque
ATOX1	Protéine antioxydante 1
ATP	Adénosine triphosphate
ATP7A	ATPase copper transporting alpha
ATP7B	ATPase copper transporting beta
AUC	Area under the curve
BL	Basolateral
BM	Copper-free buffer medium
Ca ²⁺	Ions calcium
Caco-2	Cellules d'adénocarcinome colorectal humain
CAT	Catalase
CCO	Cytochrome c oxydase
CCS	Chaperon de cuivre pour la superoxyde dismutase
CEMH	Cardioencéphalomyopathie hypertrophique
CIM	Cimetidine
ClO ⁻	Ion hypochlorite
COX 17	Chaperon de cuivre de la cytochrome c oxydase
CP	Céruloplasmine
CPX	Ciproxifan
CTR1	Transporteur de cuivre 1
Cu	Cuivre
[Cu(Biuret) ₂ Cl ₂]	Complexe de biuret et cuivre (II)
[Cu(His) ₂ Cl ₂]	Complexe de histidine et cuivre (II)
[Cu(Ser) ₂]	Complexe de serine et cuivre (II)
[Cu(Urée) ₂ Cl ₂]	Complexe de urée et cuivre (II)

Cu ⁺ , Cu (I)	Ions cuivre (I)
Cu ²⁺ , Cu (II)	Ions cuivre (II)
Cu-AO	Amine oxydase contenant du cuivre
CuCl ₂	Chlorure de cuivre
D-AAO	D-amino acide oxydase
DAO	Diamine oxydase
DES	Desloratadine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT1	Transporteur de métaux divalents
ECL	Cellules chromaffines-like
EROs	Espèces réactives à l'oxygène
FAD-AO	Amine oxydases à flavine adénine dinucléotide
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
H	Hydrogène
H ₁ , H ₂ , H ₃ , H ₄	Récepteur d'histamine H ₁ , H ₂ , H ₃ , H ₄
H ₂ O ₂	Péroxyde d'hydrogène
HAT	Transfert d'atomes d'hydrogène
HDC	Histidine décarboxylase
His	L-histidine
HNMT	Histamine-N-méthyltransférase
Im	Imidazole
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
L	Ligand
LOX	Lysyl oxydases
LTQ	Lysine tyrosylquinone
MAO	Monoamine oxydase
MAPK	Protéine kinase activée par le mitogène
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
M	Métal
MM	Maladie de Menkes
MT	Metallothionein
NaCl	Chlorure de sodium
NF-M	Neurofilament M
NO	Oxyde nitrique,

OCT2/OCT3	Transporteur de cations organiques 2 et 3
•O ₂ ⁻	Radical superoxyde
•OH	Radical hydroxyl
PAM	Peptidyl-glycine α-amidating monooxygenase
PAO	Polyamine oxydase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PLP	Pyridoxal phosphate
PUT	Putrescine
SC	Semicarbazide
SCO2 et SCO1	Proteines d'assemblage de la cytochrome c oxydase
Ser	L-Serine
SGF	Solution gastrique simulée
SIF	Solution intestinale simulée
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SOD	Superoxyde dismutases
SYP	Synaptophysin.
TEER	Résistance électrique transépithéliale
TGI	Tractus gastro-intestinal
TPQ	2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone
vDAO	DAO d'origine végétale
VMAT2	Transporteur vésiculaire de la monamine 2

RÉSUMÉ

La dérégulation de l'homéostasie du cuivre est reliée avec diverses maladies telles que la maladie de Menkes, le syndrome de la corne occipitale et la cardioencéphalomyopathie hypertrophique. Le cuivre coordonné avec des résidus d'acides aminés est essentiel pour la fonction de nombreuses protéines. De plus, le cuivre complexé à la L-histidine, sous forme de $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ administré par voie sous-cutanée, est utilisé dans le traitement de ces maladies. La compréhension des mécanismes de transport de ces complexes de cuivre (II) à travers l'épithélium intestinal et de leur activité biologique est fondamentale dans le développement de produits pharmaceutiques pour le traitement des maladies reliées à la carence en cuivre. Dans le cadre de ce projet de thèse des complexes de cuivre (II) avec potentiel thérapeutique comme molécules biologiquement actives, ont été synthétisés : $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$. L'analyse élémentaire, la diffraction des rayons X et la FTIR ont suggéré que les complexes étaient sous forme de $[\text{Cu}(\text{Ligand})_2]$ et présentaient une coordination tridentée (L-histidine), bidentée (L-sérine et biuret) ou monodentée (urée) avec le cuivre. Les profils d'absorbance UV-Vis dans des solutions physiologiques simulées et la voltamétrie cyclique ont révélé que les complexes $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ et $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ étaient stables, différemment de ceux de type $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$. Tous les complexes avaient une capacité antioxydante évaluée par des méthodes *in vitro*. Toutefois, le complexe $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et a montré une activité antioxydante plus élevée. Les complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ ont montré une bonne biocompatibilité évaluée dans des neurones P19 et des cellules Caco-2 différenciées (avec viabilité d'environ 90 % à des concentrations allant jusqu'à 100 μM), plus élevées que celle obtenue avec les autres complexes de cuivre à des concentrations équivalentes. Les complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ ont été choisis comme les meilleurs candidats pour des investigations en vue des applications thérapeutiques. L'étude du transport à travers l'épithélium intestinal estimé par la mesure de la résistance transépithéliale des monocouches des cellules Caco-2 différenciées et de la concentration de complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ du côté apical et basolatéral sur cette lignée de cellules a suggéré leur passage par voie paracellulaire. Ce rapport est le premier à montrer la capacité de $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et de $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ à induire la régulation à la baisse du niveau relatif d'ARNm des quatre principaux transporteurs de cuivre (CTR1, DMT1, ATP7A, ATP7B) et la régulation à la hausse de l'expression génétique de la métallothionéine. Une augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase a été observée après le traitement des cellules Caco-2 différenciées avec les deux complexes cuivriques $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ (50-100 μM). Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives pour l'éventuelle utilisation ces complexes en tant qu'agents thérapeutiques pour le traitement des dysfonctionnements reliés à la carence du cuivre.

Les défaillances du métabolisme du cuivre affectent la biogenèse des enzymes comme la diamine oxydase, enzyme à cuivre impliquée dans le catabolisme de l'histamine. L'excès de cette amine biogène accroît les dysfonctionnements neurologiques constatés chez les patients atteints des maladies associées au déficit cuivrique. Des modèles cellulaires pratiques sont nécessaires pour cribler et développer de nouveaux agents antihistaminiques ciblant les récepteurs histaminiques dans le système nerveux central. L'exposition des neurones P19 à l'histamine a réduit la viabilité cellulaire à 65 %. Cet effet a suggéré l'implication des récepteurs spécifiques de l'histamine puisqu'il a été prévenu par le traitement avec la desloratadine et à la cimétidine, respectivement antagonistes H₁ et H₂, mais pas par l'antagoniste H₃ ciproxifan. L'analyse RT-PCR a montré que les neurones P19 expriment les récepteurs H₁ et H₂, ainsi que le récepteur H₃ (bien qu'il ne semble pas impliqué dans l'effet de l'histamine sur ces cellules). Le récepteur H₄ n'a pas été exprimé. Les antagonistes H₁ et H₂ ainsi que la diamine oxydase végétale ont diminué la mobilisation intracellulaire du Ca²⁺ déclenchée par l'histamine. Le traitement avec la diamine oxydase végétale ou de la catalase protégeait contre la mortalité cellulaire. Une réduction significative du niveau de H₂O₂, produit par les cellules, sous l'action de l'histamine, a été trouvée lors de traitements avec desloratadine, cimétidine, diamine oxydase végétale ou catalase. Dans l'ensemble, les résultats indiquent l'expression des récepteurs fonctionnels de l'histamine et ouvrent la possibilité d'utiliser les neurones P19 comme système modèle pour étudier les rôles de l'histamine et des médicaments antihistaminiques dans la pathogenèse neuronale. Ce modèle est moins coûteux à exploiter et peut être facilement mis en œuvre par les laboratoires d'analyse actuels et par les RCO (Research Contract Organizations/Organisations de recherche sous contrat).

Mots clés : Complexes de cuivre (II), Transporteurs de cuivre ; Cytochrome c oxydase ; Transport paracellulaire, Histamine, Antihistaminiques; Diamine oxydase d'origine végétale, Récepteurs de l'histamine ; Cellules de carcinome embryonnaire P19.

ABSTRACT

Dysregulation of copper homeostasis is related with various diseases such as Menkes disease, hypertrophic cardioencephalomyopathy or occipital horn syndrome. Copper coordinated with amino acid residues is essential for the function of many proteins. Furthermore, copper complexed with L-histidine, as $[\text{Cu}(\text{His})_2]$, is used subcutaneously in the handling of these diseases. Understanding the transport mechanisms of these copper (II) complexes through the intestinal epithelium and their biological activity is fundamental in the development of pharmaceutical forms for the treatment of diseases related to copper deficiency. As part of this thesis project, copper (II) complexes with therapeutic potential as biologically active molecules were synthesized: $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$. Elemental analysis, X-ray diffraction, and FTIR suggested that the complexes were in $[\text{Cu}(\text{Ligand})_2]$ form and exhibited tridentate (L-histidine), bidentate (L-serine and biuret), or monodentate coordination (urea) with copper. UV-Vis absorbance profiles in simulated physiological solutions and cyclic voltammetry revealed that $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ and $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ complexes were stable, differently from $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$. All complexes had antioxidant capacity assessed by *in vitro* methods. However, the complex $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ showed higher antioxidant activity. $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ complexes showed good biocompatibility evaluated in P19 neurons and differentiated Caco-2 cells (with viability of approximately 90% at concentrations up to 100 μM), higher than that obtained with the other copper complexes at equivalent concentrations. The complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ were chosen as the best candidates for investigations to therapeutic applications. The study of transport through the intestinal epithelium estimated by measuring the transepithelial resistance of the monolayers of differentiated Caco-2 cells and the concentration of complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ on the apical and basolateral side suggested their paracellular influx. This report is the first to show the ability of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ to induce down regulation of the relative mRNA level of the four major copper transporters (CTR1, DMT1, ATP7A, ATP7B) and up regulation of metallothionein gene expression. An increase in cytochrome c oxidase activity was observed after treatment of differentiated Caco-2 cells with the two copper complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ (50–100 μM). These observations open new perspectives for the possible use of these complexes as therapeutic agents for the treatment of dysfunctions related to copper deficiency.

The failures in copper metabolism affect the biogenesis of enzymes such as diamine oxidase, a copper enzyme involved in histamine catabolism. The excess of this biogenic amine increases the neurological dysfunctions observed in patients with diseases associated with copper deficiency. Practical cell models are needed to screen and develop novel antihistamine agents. Exposure of P19 neurons to histamine reduced cell viability to 65%. This effect suggested the involvement of histamine receptors since it was prevented

by treatment with desloratadine and cimetidine, H₁ and H₂ antagonists respectively, but not by the H₃ antagonist ciproxifan. RT-PCR analysis showed that P19 neurons express H₁ and H₂ receptors, and the H₃ receptor (although it does not appear to be involved in the effect of histamine on these cells). The H₄ receptor was not expressed. H₁ and H₂ antagonists and plant diamine oxidase decreased histamine-triggered intracellular Ca²⁺ mobilization. The treatment with vegetal diamine oxidase or catalase protected against mortality induced by histamine. Also, a significant reduction of H₂O₂ level, generated from the cells under the histamine action, was found upon treatments with desloratadine, cimetidine, vegetal diamine oxidase or catalase. Taken together, the results indicate the expression of functional histamine receptors and open the possibility of using P19 neurons as a model system to study the roles of histamine and related drugs in neuronal pathogenesis. This model is less expensive to operate and can be easily implemented by current laboratories of analysis and by Contract Research Organizations.

Keywords : Copper (II) complexes, Copper Transporteurs, Cytochrome c oxidase, Paracellular Transport, Histamine, Antihistamines, Vegetable Diamine oxidase, Histamine receptors, P19 embryonic carcinoma cells.

INTRODUCTION

Le premier chapitre de la thèse est consacré à présenter le contexte biomédical et une revue critique de la littérature abordant principaux aspects reliés avec l'objet de recherche du présent travail. Le sujet général a été divisé en trois sections. La première section comporte le cuivre comme élément essentiel, mais potentiellement toxique pour l'organisme. Ce métal, aux concentrations physiologiques, est indispensable pour le fonctionnement adéquat de l'organisme. Alors, nous allons d'abord montrer les fonctions biologiques du cuivre qui sont étroitement reliées aux protéines à cuivre. Les ions cuivre libres sont toxiques pour les organismes vivants. C'est pour quoi nous avons trouvé pertinent de faire une révision des mécanismes d'absorption, distribution et excrétion du cuivre en présentant les protéines impliquées dans le trafic et le métabolisme de ce métal. Finalement, comme le cuivre à hautes concentrations peut-être hautement toxique provoquant des perturbations dans de nombreux processus cellulaires, il était important de présenter les effets nuisibles de ce métal pour notre organisme.

D'autre part, l'excès ou la carence de cuivre sont la cause de diverses pathologies qui sont présentées dans la deuxième section du premier chapitre. La défaillance du métabolisme du cuivre est à l'origine des diverses maladies orphelines. Dans cette section, nous nous sommes arrêtés sur : (i) la maladie de Willson reliée à une accumulation du cuivre dans l'organisme ; (ii) la maladie de Menkes (MM) provoquée par une absorption déficiente du cuivre et (iii) la cardioencéphalomyopathie hypertrophique (CEMH), maladie mitochondriale, caractérisée par un vaste spectre clinique allant des myopathies aux troubles multisystémiques. Également, nous avons discuté les approches thérapeutiques pour chacun de ces troubles.

Des protéines à cuivres sont également impliquées dans le métabolisme de l'histamine. Elle participe dans un large éventail des processus physiologiques et pathologiques. Cet aspect est objet de discussion dans la troisième section du chapitre 1. Le métabolisme et les sources endogènes et exogènes d'histamine sont discutés. Cette amine biogène exerce ses effets par l'activation de quatre récepteurs nommés H₁, H₂, H₃ et H₄, largement distribués dans l'organisme. Également, il était intéressant d'aborder : (i) la structure des différents récepteurs histaminiques couplés aux protéines G, (ii) les voies de signalisation à la suite de leur activation et (iii) les effets physiologiques.

L'excès d'histamine cause des altérations de leurs voies métaboliques (y compris de signalisation) qui sont liées à diverses pathologies. Compte tenu de cet aspect, dans la dernière section du premier chapitre, les dysfonctions liées à l'histamine sont présentées. Ainsi, nous avons considéré important de réaliser une revue de la littérature sur l'intolérance à l'histamine ou histaminose alimentaire et les maladies inflammatoires

chroniques de l'intestin comme la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. Bien que l'existence de l'histamine dans le cerveau soit connue depuis plus de 50 ans, son rôle dans le fonctionnement du système nerveux n'a été largement apprécié que récemment. Les troubles et pathologies du système nerveux central causés par l'histamine sont aussi discutés.

Les approches thérapeutiques fréquemment utilisées pour le traitement des affections dues à l'histamine sont abordées dans cette section. Les thérapies préventives sont basées dans un régime nutritionnel en faible teneur en histamine. Quant à l'aspect curatif, les agents antihistaminiques sont toujours l'option la plus récurrente. Cette classe de médicaments agit sur les récepteurs histaminiques pour traiter les affections médiées par l'histamine. Cependant, les antihistaminiques sont toujours utilisés et développés dans un domaine restreint, classiquement établi, des allergies et des affections gastro-intestinales causées par un excès d'acide gastrique. En plus, ils entraînent un large éventail d'effets indésirables. Pour cela, les scientifiques cherchent des traitements alternatifs pour les affections dues à l'histamine. Une possibilité est la supplémentation avec des enzymes capables de cataboliser l'histamine en favorisant la réduction de son niveau dans l'organisme. Les amines oxydases qui interviennent dans le catabolisme des amines biogènes comme l'histamine sont présentées dans cette section. Une attention spéciale a été dédiée à l'utilisation de la diamine oxydase végétale et de la catalase dans une approche thérapeutique des affections dues à l'histamine.

Cette mise en contexte est suivie de la présentation du projet dans le deuxième chapitre dans lequel les hypothèses et objectifs du projet sont présentés. Aussi, il a été inclus un schéma représentant l'avancement et les différentes étapes du projet. De plus, les modèles des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (Caco-2) et de carcinome embryonnaire de souris P19 sont présentés. Les chapitres trois, quatre et cinq sont présentés sous forme d'articles scientifiques suivis du chapitre six dans lequel une discussion générale est réalisée pour finalement arriver aux conclusions générales répondant aux objectifs.

CHAPITRE 1

LA PROBLÉMATIQUE ET REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

Ce chapitre présente les fonctions biologiques du cuivre, son métabolisme, les maladies orphelines liées aux dysfonctionnements de leur homéostasie ainsi que l'approche thérapeutique utilisée dans leur traitement. Aussi, ce chapitre aborde les rôles de l'histamine dans l'organisme, les enzymes qui participent à son catabolisme et les récepteurs histaminiques. Finalement, le métabolisme de l'histamine, les dysfonctions liées à cette amine biogène et les méthodes préventives et curatives des affections dues à l'excès de cette molécule sont référencés.

1.1 Le Cuivre : un métal essentiel, mais potentiellement toxique

Dans les systèmes biologiques, le cuivre est impliqué dans un large éventail de fonctions biologiques dans les contextes intra et extracellulaires (O'Dell, 1976). Cependant, comme autres métaux lourds, il peut être toxique (Bento *et al.*, 2007). De nombreuses recherches sont consacrées à l'étude des troubles liés à sa carence ou son excès dans l'organisme. La dérégulation du métabolisme du cuivre causée par des mutations génétiques peut entraîner diverses affections telles que la maladie de Wilson, la maladie de Menkes, ou la cardioencéphalomyopathie hypertrophique. L'étude de ces maladies orphelines a permis de comprendre les mécanismes de l'homéostasie du cuivre et de suggérer des cibles thérapeutiques pour leur traitement.

1.1.1 Fonctions biologiques du cuivre reliées aux enzymes cuivre-dépendantes

Dans les organismes vivants, le cuivre peut exister sous la forme réduite (Cu^+) et sous la forme oxydée (Cu^{2+}). L'activité redox du cuivre est exploitée par plusieurs enzymes (Tableau 1.1) indispensables à un large éventail de fonctions physiologiques. Aussi, de petites molécules biologiquement actives, telles que des acides aminés, sont capables de complexer et de transporter le cuivre et peuvent posséder des propriétés thérapeutiques (Brumas *et al.*, 1993 ; Deschamps *et al.*, 2005).

Le cuivre participe dans le métabolisme énergétique comme cofacteur de la cytochrome c oxydase (CCO) ou complexe IV (Ruiz *et al.*, 2021). Étant la dernière enzyme de la chaîne respiratoire de transport d'électrons, elle est nécessaire à la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Le déficit en CCO est l'une des causes les plus fréquentes d'anomalies de la chaîne respiratoire chez l'homme (Diaz, F. 2010 ; Scheiber *et al.*, 2014). La diminution de l'activité de la CCO a été montrée dans des maladies reliées avec la carence du cuivre comme la neutropénie, l'anémie, la maladie de Menkes ou la

cardioencéphalomyopathie hypertrophique (Freisinger *et al.*, 2004 ; Deschamps *et al.*, 2005 ; Kumar *et al.*, 2011 ; Wazir *et al.*, 2017).

Tableau 1.1 Exemple d'enzymes cuivre-dépendantes chez les mammifères

Protéine	Fonction	Référence
Angiogénine	Induction de la formation de vaisseaux sanguins	Sheng <i>et al.</i> , (2016); Cucci <i>et al.</i> , (2021)
Facteurs de coagulation sanguine V et VIII	La coagulation du sang	Jin <i>et al.</i> , (2016)
Céruleplasmine	Ferroydase, métabolisme du Fer. Piégeur d'espèces réactives à l'oxygène (ERO). Transport du cuivre Propriétés cardioprotectrices et neuromodulatrices	Ducharme <i>et al.</i> , (2010); Kim <i>et al.</i> , (2008); Maltais <i>et al.</i> , (2003); Mateescu <i>et al.</i> , (1995).
Cytochrome-c oxydase	Enzyme terminale de la chaîne respiratoire mitochondriale, catalyse la réduction du dioxygène en eau.	Tapiero (2003), Lönnerdal, B. (2008)
Diamine oxydase (DAO)	Catalyser la désamination oxydative de l'histamine. Les fonctions de la DAO sont liées à la prolifération cellulaire, à l'inflammation, à la réponse allergique et à l'ischémie et à l'intolérance à l'histamine	Maintz (2007); McGrath <i>et al.</i> , (2009); Vakal <i>et al.</i> , (2020)
Dopamine β – hydroxylase	Production de catécholamines	Yoshizawa <i>et al.</i> , (2006)
Lysyl oxydases	Réticulation du collagène et de l'élastine	Tapiero <i>et al.</i> , (2003); Martínez-González <i>et al.</i> , (2019).
Peptidyl-glycine α -amidating monoxygenase (PAM)	Catalyse la conversion des substrats de peptidylglycine en produits α -amidés. Maturation des neuropeptides	Kim <i>et al.</i> , (2008); Scheiber <i>et al.</i> , (2014)
Prion (Pr ^{Pc})	Fonctions liées à l'homéostasie de la myéline, à la neuroprotection, au rythme circadien, à l'homéostasie des ions métalliques, à l'homéostasie mitochondriale et à la signalisation intercellulaire	Kovač <i>et al.</i> , (2022)
Protéine précurseur de l'amyloïde	Protéine impliquée dans le développement neuronal; le clivage conduit à la génération d'A β peptide qui s'agrège dans la plaque sénile associée à la maladie d'Alzheimer	Kim <i>et al.</i> , (2008); O'Brien <i>et al.</i> , (2011)
Superoxyde dismutase	Enzyme antioxydante, catalyse la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène	Yonashiro <i>et al.</i> , (2009); Mondola <i>et al.</i> , (2016); Ruiz <i>et al.</i> , (2021)
Tyrosinase (catéchol oxydase)	Biosynthèse de mélanine	Zolghadri <i>et al.</i> , (2019).

Aussi, certains enzymes à cuivre collaborent dans la défense antioxydante de l'organisme. La superoxyde dismutase (SOD) convertit le superoxyde en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (Miao et St Clair, 2009 ; Yonashiro *et al.*, 2009 ; Mondola *et al.*, 2016 ; Ruiz *et al.*, 2021) qui sera éliminé ultérieurement par la catalase ou par la glutathion peroxydase (Halliwell, 2007 ; Flora, 2009). L'excès de superoxyde peut

contribuer au stress oxydatif et conduire à l'oxydation des constituants cellulaires, les dommages membranaires et l'apoptose. (Halliwell et Gutteridge, 2007).

La céruloplasmine (CP) joue différents rôles dans l'organisme. Entre eux se trouvent : le transport du cuivre, l'oxydation des amines biogènes et la régulation du métabolisme du fer. Aussi, sa capacité de piégeage des radicaux superoxydes ($\bullet\text{O}_2^-$) et des radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) a été montrée (Atanasiu *et al.*, 1998 ; Dumoulin *et al.*, 1996, Paradis *et al.*, 2010). De même, la CP peut jouer un rôle protecteur dans divers tissus soumis à un stress oxydatif (Mateescu *et al.*, 1995). Elle est aussi connue pour participer dans la régulation de l'inflammation (Qian et Ke, 2001 ; Samygina *et al.*, 2013 ; Vassiliev *et al.*, 2019) et dans le développement du système nerveux (Ducharme *et al.*, 2010 et Ducharme, 2013).

1.1.2 Absorption, distribution et métabolisme cellulaire du cuivre.

Un schéma général du transit du cuivre chez les mammifères est montré dans la Figure 1.1. Le cuivre provenant des aliments est libéré des complexes organiques naturels grâce au milieu acide (pH 1,5–3,5) de l'estomac (Stillhart *et al.*, 2020). Le cuivre est absorbé dans des régions de l'intestin grêle qui ont un $\text{pH} \leq 5,8$. L'augmentation du pH du lumen intestinal affecte l'absorbabilité du cuivre, en raison de la prédominance d'hydroxyde cuivrique et de sels de cuivre basiques avec de faibles constantes de dissociation (Wapnir, 1998). Le transport du cuivre à travers l'épithélium intestinal implique à la fois la diffusion et le transport saturable indépendant de l'énergie. La concentration du cuivre est un autre facteur qui module leur acquisition par l'organisme (Tapiero *et al.*, 2003)

Le cuivre est absorbé sous forme de Cu (I) donc il a été suggéré la présence d'une réductase membranaire qui réduit le Cu (II) au Cu (I) dans les entérocytes (Scheiber *et al.*, 2014). Par la suite, le transporteur de cuivre 1 (CTR1) va faciliter le transport de Cu (I) à travers la membrane apicale de la cellule intestinale (Lønnerdal, 2008). Autre mécanisme alternatif suggéré pour l'absorption du cuivre, implique le transporteur de métaux divalents (DMT1 ; Kim *et al.*, 2008). Le tableau 1.2 résume les principales molécules qui sont impliquées dans la livraison du cuivre aux différentes protéines cibles dans la cellule.

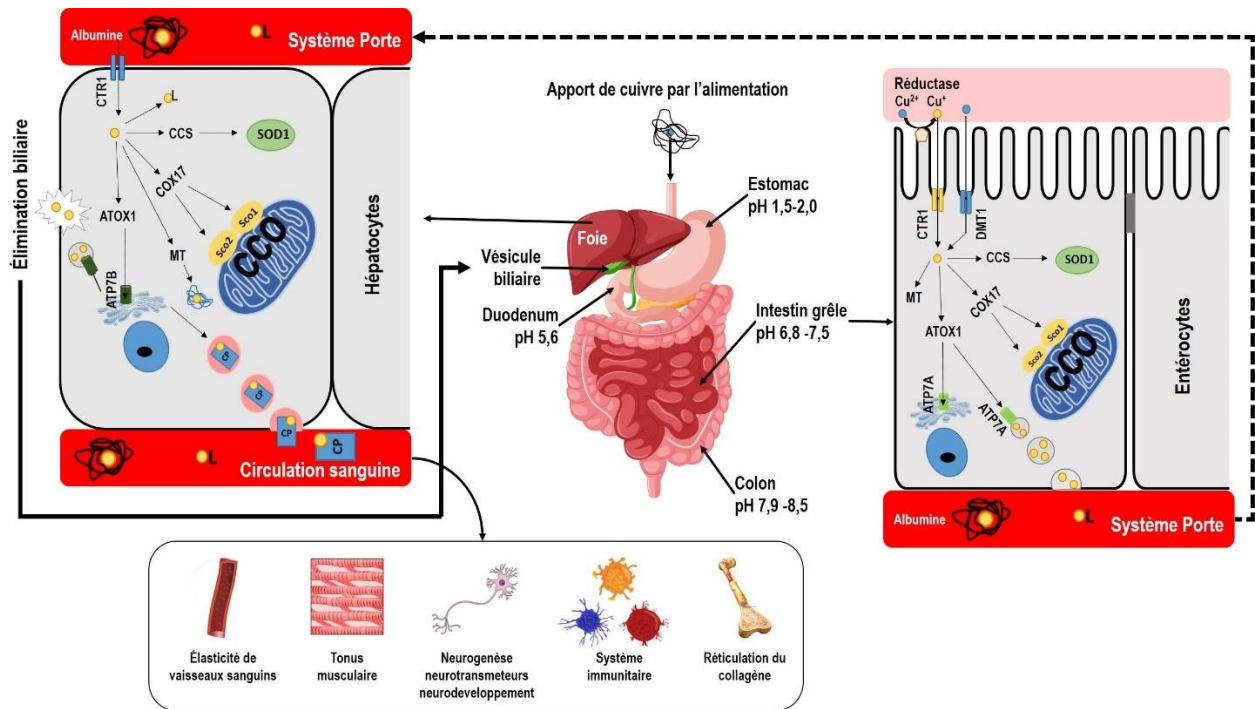


Figure 1.1 Métabolisme du cuivre.

Le cuivre provenant de l'alimentation est absorbé dans l'intestin grêle et pompé dans le système porte par l'ATP7A. Dans le foie, il est principalement remis en circulation après la conversion de l'apocéruloplasmine en CP par la l'ATP7B ou la métallothionéine. Également, l'ATP7B participe dans l'excrétion de l'excès du cuivre vers la bile. Différentes molécules interviennent dans le transport intra et extracellulaire du cuivre (Transporteur de cuivre 1 [CTR1]; le transporteur de métaux divalents [DMT1]; protéine antioxydante 1 [ATOX1]; chaperon de cuivre de la cytochrome c oxydase [COX 17]; chaperon de cuivre pour la superoxyde dismutase [CCS], protéines d'assemblage de la cytochrome c oxydase [SCO2 et SCO1], Métallothionéine : MT; L : ligand, Albumine ou Ceruloplasmine : CP)

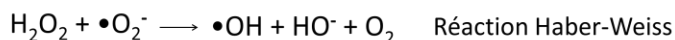
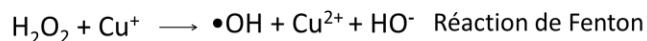
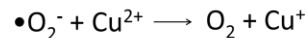
L'exportation de cuivre des cellules épithéliales est médiée par l'ATP7A ou par des vésicules qui libèrent leur contenu dans le milieu basolatéral par exocytose (Verwilt *et al.*, 2015). Une fois traversée la lumière intestinale, le Cu est transporté dans la circulation par des protéines telles que la céruloplasmine (transportant environ 90 à 95 % du cuivre (II) en circulation), la transcupréine ou l'albumine sérique. Aussi, des complexes de faible masse moléculaire, dont le complexe Cu-histidine, peuvent transporter le cuivre dans le plasma (Deschamps *et al.*, 2005). Dans le foie, organe central pour l'homéostasie du cuivre, l'ATP7B facilite son incorporation dans la céruloplasmine pour sa circulation périphérique ou pour son excrétion dans la bile (Tapiero *et al.*, 2003, Lönnerdal, 2008, Esmaeli *et al.*, 2019).

Tableau 1.2 Exemples de molécules intervenant dans la circulation du cuivre chez les mammifères

Molécules	Fonction	Référence
ATOX1	Livrer Cu aux transporteurs ATP7A et ATP7B	Kim <i>et al.</i> , (2008) ; Ruiz <i>et al.</i> , (2021)
Métallothionéine	Stockage de l'excès de Cu et d'autres ions métalliques divalents excepté par le Fe (II). Donneur possible de Cu à certaines apoprotéines	Sakurai <i>et al.</i> , (1992) ; Tapiero (2003) ; Roesijadi, G. (1996) ; Sabolić <i>et al.</i> , (2010)
Protéine chaperon du cuivre (CCS)	Livrer Cu à la SOD	Tapiero (2003) ; Kim <i>et al.</i> , (2008)
COX17	Donneur spécifique de cuivre pour la Sco1 et la Cox11, qui donnent du cuivre aux sites CuB et CuA de la cytochrome oxydase, respectivement	Cobine <i>et al.</i> , (2006) Inesi (2016)
SCO1	Donneur des ions cuivre au site CuA dans le noyau catalytique de CCO. Semble être impliquée dans un mécanisme post-transductionnel pour réguler l'importation de Cu dépendante de CTR1 dans la cellule via SCO1	Hlynialuk Christopher <i>et al.</i> , (2015) ; Morgada <i>et al.</i> , (2015)
SCO2	Donneur des ions cuivre au site CuA dans le noyau catalytique de CCO	Morgada <i>et al.</i> , (2015)
COA6	Il est impliqué dans la biogenèse dépendante du cuivre de COX2, sous-unités de la CCO qui contient un centre de cuivre binucléaire (CuA) qui sert d'accepteur d'électrons initial du cytochrome c. Donner le cuivre à la SCO1	Stroud <i>et al.</i> , (2015); Pacheu-Grau <i>et al.</i> , (2020)
Ligand (L)	La majeure partie du cuivre mitochondrial est stockée dans la matrice de la mitochondrie sous forme de complexe avec un ou plusieurs ligands (L) qui n'ont pas été identifiés. Transport dans le plasma.	Brumas <i>et al.</i> , (1993) ; Deschamps <i>et al.</i> , 2005 ; Cobine <i>et al.</i> , (2006) ; Kim <i>et al.</i> , (2008) ; Ruiz <i>et al.</i> , (2021)

1.1.3 Toxicité du cuivre

Alors que le cuivre est nécessaire en tant que cofacteur catalytique important dans la chimie redox pour de nombreuses protéines, lorsqu'il est présent en excès, les ions de cuivre libres peuvent être hautement toxiques en raison de sa capacité à générer des radicaux libres via la réaction de Fenton ou Haber-Weiss (Flemming *et al.*, 1989)



En général, les espèces radicalaires qui se forment dans les cellules jouent un rôle particulier durant les processus physiologiques normaux. Parmi les espèces radicalaires se trouvent celles qui dérivent de

l'oxygène comme l'anion superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$) et le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) (Pisoschi *et al.*, 2015). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une espèce active de l'oxygène précurseur de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé EROs.

La production excessive d'EROs provoque des modifications oxydatives aux biomolécules clés pour l'ensemble de fonctions des systèmes biologiques (Figure 1.2). L'attaque continue des EROs détruit la perméabilité sélective de la membrane cellulaire par la peroxydation des lipides (Halliwell *et al.*, 1993). L'oxydation des protéines modifie leurs configurations, entraînant une perte de fonctionnalité biochimique, tandis que les altérations oxydatives de l'acide désoxyribonucléique (ADN) entraînent des mutations, des erreurs de réplication, des altérations de la stabilité génomique et la mort cellulaire (Klaunig *et al.*, 2010; Davies, 2016; Pisoschi *et al.*, 2021). La modification de biomolécules essentielles s'accompagne souvent d'une perte de leurs fonctionnalités ou de modifications de leur localisation cellulaire (*d'après* Pisoschi *et al.*, 2021).

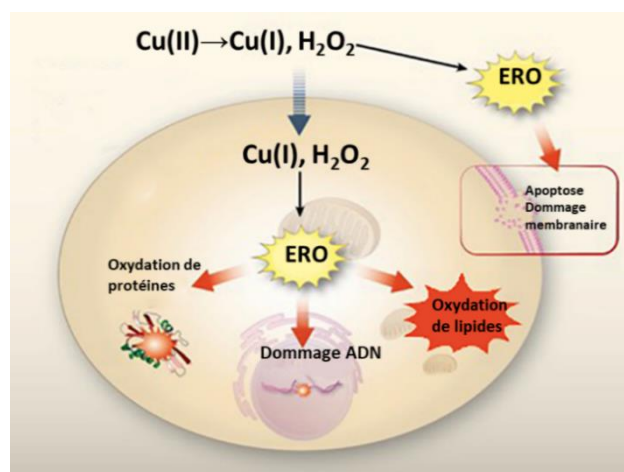


Figure 1.2 Dommages causés par l'excès d'ions cuivre libres affectant l'ensemble de fonctions dans les systèmes biologiques

Les altérations irréversibles des lipides, des protéines et des acides nucléiques, ainsi que les dommages induits de la structure et des fonctions cellulaires, ont été identifiées comme cause de neurodégénérescence, de maladies cardiovasculaires, de tumorigénicité, de cancer, de diabète, etc. Aussi, les biomolécules oxydées peuvent entraîner l'apparition de néoantigènes participant à la progression des maladies auto-immunes (Pisoschi *et al.*, 2021). Ces aspects concernant la toxicité des ions cuivriques peuvent être palliés par l'utilisation des complexes cuivriques biocompatibles stables comme ceux de types $\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ (Esmaeli *et al.*, 2019).

1.2 Maladies orphelines liées aux dysfonctions du métabolisme du cuivre

1.2.1 Maladie de Wilson.

La toxicité du cuivre est mise en évidence dans la maladie de Wilson qui est causée par des mutations du gène codant l'ATP7B (Figure 1.3). Les mutations dans cette protéine entraînent une réduction de la conversion de l'apocéruloplasmine en CP et de l'excrétion du cuivre dans la bile. L'excès de cuivre libre s'accumule dans l'organisme, en particulier, le cerveau, le foie, les os et la cornée (Członkowska *et al.*, 2018). L'évolution clinique des patients peut varier, mais la maladie hépatique progressive, les troubles neurologiques et les symptômes psychiatriques sont une caractéristique commune (Członkowska *et al.*, 2018).

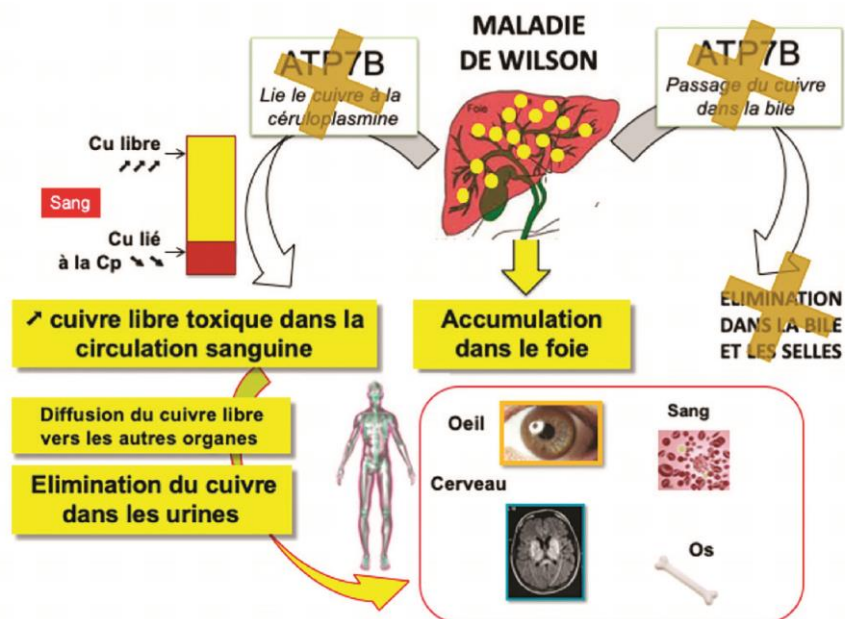


Figure 1.3 Représentation schématique du métabolisme du cuivre dans la maladie de Wilson.

La sécrétion du cuivre dans la circulation systémique et son excrétion via la bile sont inhibées en raison d'une anomalie de l'ATP7B. L'accumulation de cuivre dans le foie, l'œil, le cerveau conduit finalement à une défaillance multifonctionnelle. (d'après Poujois *et al.*, 2021)

1.2.1.1 Approches thérapeutiques

Le traitement de la Maladie de Wilson est basé dans l'utilisation des chélateurs de cuivre. La D pénicillamine contient des fonctions thiols capables de complexer les ions de cuivre en favorisant leurs éliminations par voie rénale (Poujois *et al.*, 2021). Également, la D pénicillamine induit la synthèse des métallothionéines avec des structures riches en thiols, ce qui les amène à se lier au cuivre évitant sa toxicité.

Cependant, la D pénicillamine a de nombreux effets secondaires (troubles digestifs, réactions allergiques, lupus induit, lésions cutanées, etc.), donc d'autres chélateurs sont proposés, entre eux, le tétratiomolybdate qui est en phase III du développement du médicament (Poujois *et al.*, 2021). L'acétate de zinc (Wilzin®) est aussi utilisé dû à la capacité de ce métal de bloquer l'absorption intestinale du cuivre en induisant la synthèse d'une métallothionéine intestinale et l'excrétion fécale du cuivre (Poujois *et al.*, 2021). Des traitements symptomatiques non spécifiques de la maladie sont associés.

1.2.2 Maladie de Menkes.

La maladie de Menkes (MM) est une affection rare multisystémique provoquée par une absorption déficiente du cuivre en raison du dysfonctionnement de la protéine ATP7A (Deschamps *et al.*, 2005). La base biochimique de cette maladie est liée à un défaut répandu dans le transport intracellulaire du cuivre (Figure 1.4).

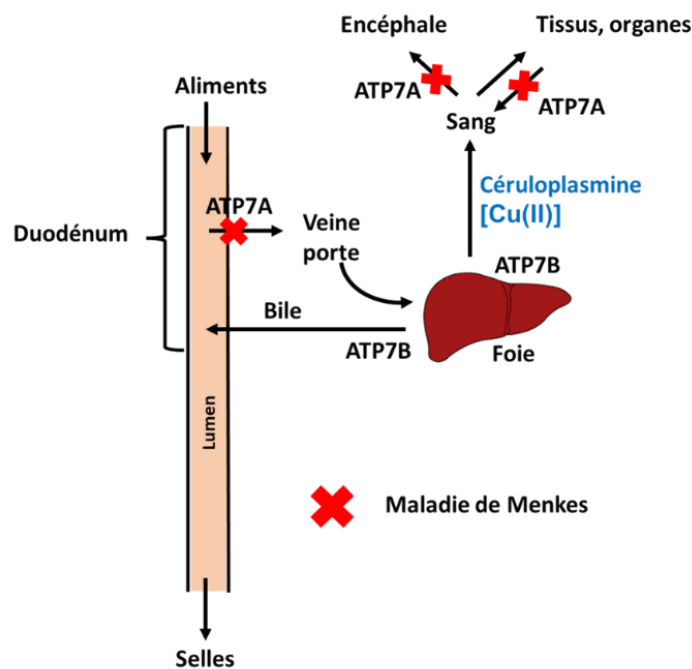


Figure 1.4 Représentation schématique du métabolisme du cuivre dans la maladie de Menkes. Le cuivre alimentaire n'est pas absorbé dans l'intestin dû à une anomalie de l'ATP7A chez les patients atteints de cette maladie. Le cuivre ne passe pas dans la circulation systémique empêchant sa distribution aux différents organes.

La carence systémique en cuivre dans l'organisme conduit à une insuffisance en cuproenzymes comme la CP, la CCO, les lysyl oxydases ou la tyrosinase (Vulpe *et al.*, 1993 ; Meguro *et al.*, 1991, Llanos et Mercer,

2002). Cette déficience provoque de multiples anomalies, telles que des cheveux hypopigmentés, des anomalies du tissu conjonctif, une peau lâche, des os fragiles et des dysfonctions neurologiques graves (Llanos et Mercer, 2002)

1.2.2.1 Approches thérapeutiques

Les traitements de la MM visent à rétablir les niveaux normaux de cuivre. Les patients traités par injections intraveineuses de sels de cuivre (chlorure de cuivre, sulfate de cuivre et cuivre albumine) n'ont pas montré de normalisation du taux de cuivre ou CP, étant donné que l'albumine peut se lier au cuivre avec une très grande affinité dans le sang humain et inhiber son absorption dans les cellules (Garnica *et al.*, 1994). D'autre part, des études cinétiques ont démontré que l'équilibre de la réaction de transfert de cuivre (II) entre l'albumine et le complexe cuivre (II) : L-histidine, était en faveur de la biodisponibilité du cuivre. Les patients traités avec des injections sous-cutanées de ce complexe ont montré une amélioration clinique et de marqueurs biochimiques significatifs. Comme le complexe cuivre (II) : L-histidine est instable en solution aqueuse, Deschamps *et al.*, (2005) ont suggéré que sa synthèse à l'état solide pourrait être avantageuse pour le traitement de la MM.

1.2.3 Cardioencéphalomyopathie hypertrophique.

La cardioencéphalomyopathie hypertrophique (CEMH) est une maladie mitochondriale rare caractérisée par un vaste spectre clinique allant des myopathies aux troubles multisystémiques graves affectant principalement les muscles, le cœur et le système nerveux central (Freisinger *et al.*, 2004). La CEMH est causée par des mutations dans le gène qui code la SCO2 (Figure 1.5), une metallochaperon essentielle à l'assemblage du cuivre vers la sous-unité II du complexe IV de la CCO (Baker *et al.*, 2017).

La manière dont le cuivre est importé dans la cellule et finalement livré à la mitochondrie reste un domaine d'investigation actif. À ce jour, aucune chaperon spécifique pour livrer le cuivre à l'organite n'a pas été découvert. Cependant, plusieurs études sur fibroblastes et myoblastes de patients atteints de mutations de la SCO2 ont montré que la supplémentation en cuivre peut restaurer l'activité de la cytochrome c oxydase à des niveaux presque normaux (Jaksch *et al.*, 2001, Salviati *et al.*, 2002, Freisinger *et al.*, 2004)

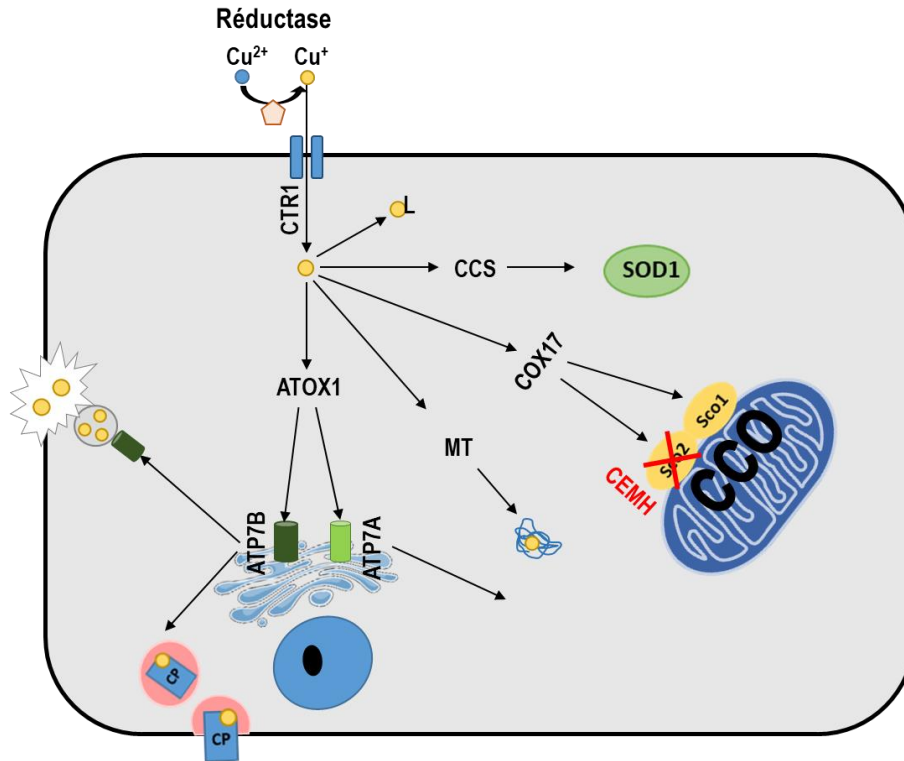


Figure 1.5 Représentation schématique du métabolisme du cuivre dans la cardioencéphalomyopathie hypertrophique. La SCO2 ne peut pas participer dans l'assemblage du cuivre au site Cu_A dans le noyau catalytique de CCO ce qui conduit à un déficit de la production d'ATP par les cellules.

1.2.3.1 Approches thérapeutiques

Présentement, il n'existe aucun traitement établi pour les patients atteints de la cardioencéphalomyopathie hypertrophique sévère. Il a été reporté, l'utilisation de cuivre (II) : L-histidine sous-cutanée dans un patient qui a montré une inversion de la maladie pendant 48 mois avant son décès (Freisinger *et al.*, 2004). Aussi, le traitement combiné avec 100 μM de CuCl_2 et 200 μM de bézafibrate a permis de récupérer complètement l'activité CCO dans des cellules de patients porteurs de la mutation SCO2 (Casarin *et al.*, 2012). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour généraliser l'utilisation de ces traitements.

1.3 L'Histamine — Agent essentiel « Ami & Ennemi »

L'histamine [2-(3H-imidazole-4-yl)éthanamine] est une monoamine primaire soluble dans les solutions aqueuses. Cette amine biogène est constituée d'un noyau imidazole et d'un groupe aminé aliphatique (Figure 1.6). Le groupe aminé aliphatique a un pKa 9,7 alors que le pKa du deuxième azote du cycle imidazole est 5,9 (Schwelberger *et al.*, 2013). Compte tenu des pKa, la forme protonnée du groupe aminé aliphatique est prédominante à pH physiologique (7,4), tandis que le noyau imidazole qui présente deux

formes tautomères ne sera pas protoné (Vianello et Mavri, 2012). Ainsi, l’histamine est un cation à charge unique dans les organismes vivants.

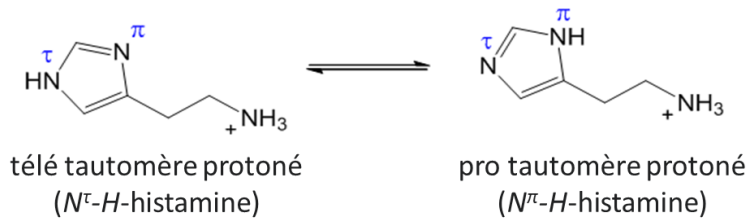


Figure 1.6 Structure et différents formes tautomères du monocation d’histamine ((d’après Vianello et Mavri, 2012)

Cette amine biogène est impliquée dans divers processus physiologiques. Entre les fonctions les plus étudiées de l’histamine se trouvent la stimulation de la sécrétion gastrique et la modulation du système immunitaire (Rocha *et al.*, 2014 ; Branco *et al.*, 2018). Aussi, elle est impliquée dans la modulation de la fréquence cardiaque et la contractilité, la vasodilatation et la perméabilité paracellulaire (Obara *et al.*, 2020). En agissant sur les neurones du système nerveux entérique (SNE), elle a des effets sur les muscles lisses et la contraction intestinale (Spencer *et al.*, 2020). Dans le système nerveux central (SNC), l’histamine joue le rôle comme neuromodulateur/neurotransmetteur et elle est impliquée dans le cycle veille-sommeil, la plasticité synaptique et l’apprentissage (Haas *et al.*, 2008). Cependant, la perturbation de l’équilibre des niveaux d’histamine est à l’origine des processus pathologiques indiquant l’importance du développement de médicaments ciblant le système histaminique dans notre organisme.

1.3.1 Métabolisme de l’histamine

L’histamine endogène est synthétisée à partir de la décarboxylation de la L-histidine par l’enzyme histidine décarboxylase (HDC, EC 4.1.1.22) en présence du cofacteur pyridoxal-5’-phosphate. La HDC endogène est exprimée uniquement dans les cellules libérant de l’histamine telles que les mastocytes, les basophiles, les cellules de type entérochromaffine dans l’estomac, les neurones dans le cerveau ou les macrophages (Huang *et al.*, 2018).

L’histamine synthétisée est ensuite stockée dans les cellules sécrétrices. La charge positive de l’histamine limite la perméabilité à travers les membranes par diffusion (Schwelberger *et al.*, 2013). Ce pour cela, il existe un besoin évident des transporteurs transmembranaires pour l’absorption, le stockage et la libération de l’histamine (Figure 1.7). L’histamine peut être transportée passivement à travers la membrane par les transporteurs de cations organiques 2 et 3 (OCT2 et OCT3) et par le transporteur de monoamine de la

membrane plasmique (PMAT). Le transporteur vésiculaire de la monoamine 2 (VMAT2) est impliqué dans le transport de l’histamine du cytoplasme aux vésicules (Schwelberger *et al.*, 2013).

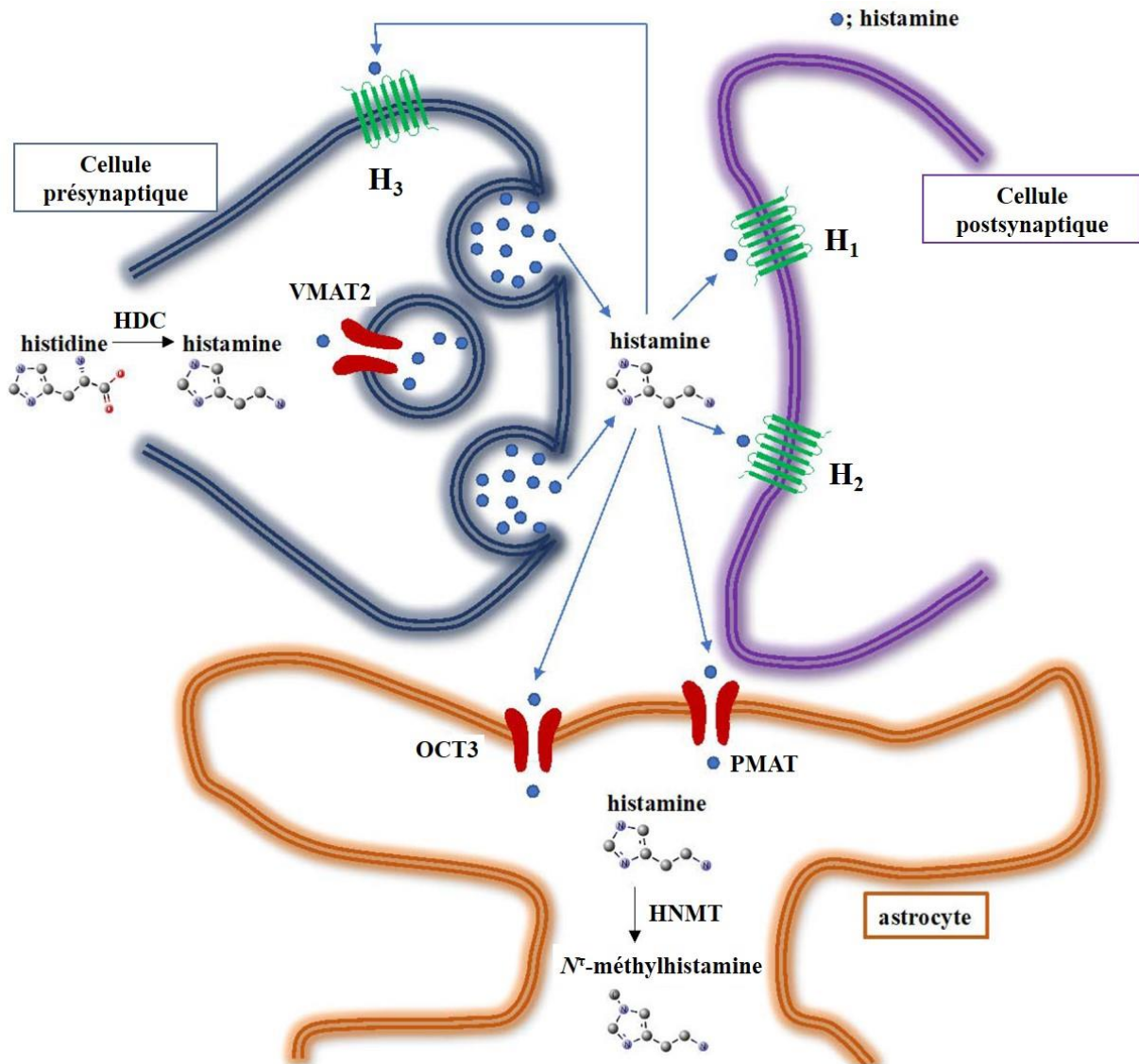


Figure 1.7 Métabolisme, absorption, stockage et libération de l’histamine dans le SNC (*d’après Yoshikawa et al.*, 2019)

L’histamine stockée dans les cellules sécrétrices est ensuite libérée dans des espaces interstitiels lors de la stimulation. Les mastocytes, les basophiles, les cellules type chromaffines (ECL) et les neurones histaminergiques sont réservoirs d’une importante quantité d’histamine tandis que les cellules dendritiques, les cellules T, les macrophages et les cellules épithéliales libèrent de faibles quantités de cette amine (Huang *et al.*, 2018).

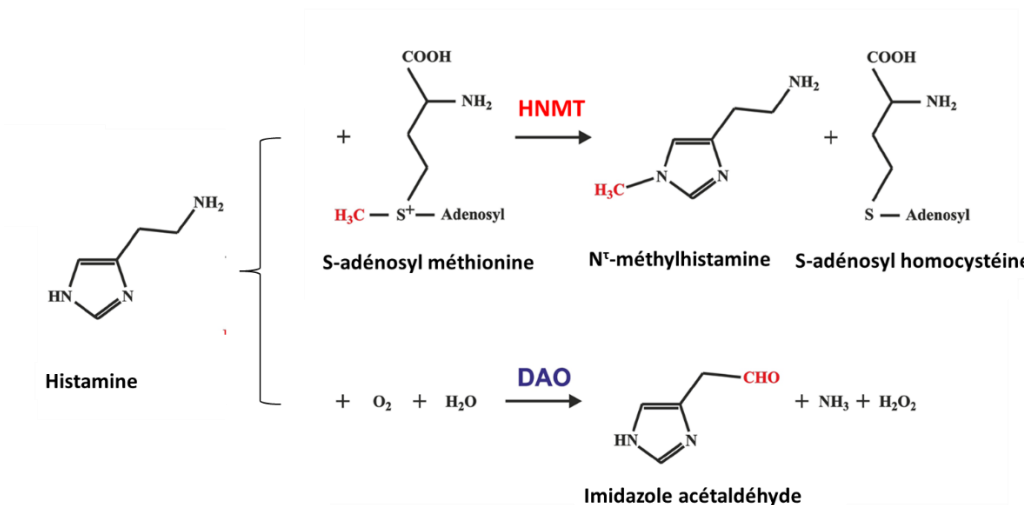


Figure 1.8. Les voies de dégradation de l’histamine.

L’histamine peut être inactivée par méthylation du cycle imidazole, catalysée par l’histamine N-méthyltransférase (HNMT), soit par désamination oxydative du groupe amine primaire, catalysée par la diamine oxydase (DAO). (d’après Schwelberger *et al.*, 2013)

Les enzymes DAO (EC 1.4.3.22) et histamine-N-méthyltransférase (HNMT, EC 2.1.1.8) sont impliquées dans les deux principales voies cataboliques (Figure 1.8) de l’histamine (Holeček, 2020). La DAO catalyse la désamination oxydative du groupement amine primaire de l’histamine extracellulaire (Schwelberger *et al.*, 2013). D’autre part, l’histamine peut être métabolisée en L-méthylhistamine par l’enzyme HNMT qui catalyse la méthylation du groupe amine secondaire de l’imidazole de l’histamine par une réaction nécessitant le co-substrat de S-adénosyl méthionine comme donneur de groupe méthyle (Holeček, 2020).

1.3.2 L’histamine et les récepteurs histaminiques

L’histamine exerce son effet par l’activation de quatre récepteurs nommés H₁, H₂, H₃ et H₄, qui sont largement distribués dans l’organisme (Brown *et al.*, 2001 ; Duan *et al.*, 2010 ; Huang *et al.*, 2018). Ce sont des récepteurs à sept domines transmembranaires (un domaine N-terminal extracellulaire, un domaine C-terminal intracellulaire, 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires) couplés à une protéine G spécifique (Figure 1.9), ce qui entraîne l’activation et/ou l’inhibition d’une voie spécifique (Leurs *et al.*, 2012). Chacun des récepteurs a une affinité de liaison différente (K_i). Les valeurs de K_i pour les récepteurs H₁ et H₂ vont de 2 à 10 μmol/L, tandis que celles des récepteurs H₃ et H₄ vont de 5 à 10 nmol/L (Panula, 2021).

1.3.2.1 Récepteur H₁

Le récepteur H₁ est exprimé majoritairement dans les cellules immunitaires et endothéliales, ainsi comme dans les muscles lisses du tractus gastro-intestinal (TGI), les neurones du SNC et du SNE, astrocytes et cellules gliales (Panula *et al.*, 2015 ; Yuan *et al.*, 2018).

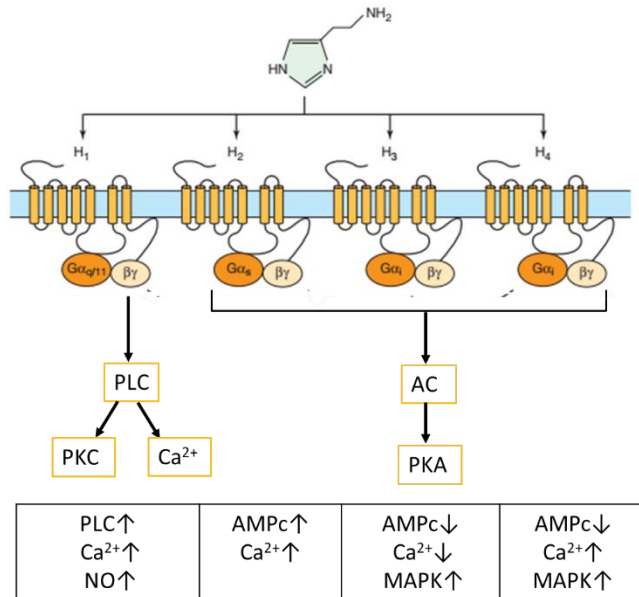


Figure 1.9. Principales voies de signalisation des récepteurs de l'histamine

L'histamine peut se coupler à une variété de voies de transduction de signal liées à la protéine G par ses quatre récepteurs différents. Plusieurs voies de signalisation supplémentaires décrites dans la littérature ne sont pas représentées. Abréviations : PLC, phospholipase C ; ions calcium, Ca²⁺ ; oxyde nitrique, NO ; AC, adénylyl cyclase ; AMPc, adénosine-phosphate cyclique ; PKC, protéine kinase C ; PKA, protéine kinase A ; MAPK, protéine kinase activée par le mitogène (*d'après Leurs et al.*, 2012)

L'histamine active le récepteur H₁ qui est couplé à la protéine G_{αq/11} (Figure 1.9), ce qui conduit à la stimulation de la phospholipase C (PLC), avec la génération subséquente d'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG). Ces deux médiateurs sont connus pour élever les concentrations d'ions calcium (Ca²⁺) intracellulaires et pour activer la protéine kinase C (PKC) (Leurs *et al.*, 1994). La libération de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique est suivie de la production d'acide arachidonique, d'oxyde nitrique (NO) et d'ERO (Molina-Hernandez et Velasco, 2008 ; Shahid *et al.*, 2009 ; Panula *et al.*, 2015). L'activation du récepteur H₁ module positivement la synthèse de l'adénosine-phosphate cyclique (AMPc) liée au récepteur.

Les effets qui résultent de l'activation du récepteur H₁ sont la contraction des muscles lisses (péristaltisme, bronchoconstriction), la réponse inflammatoire, les allergies alimentaires, le choc anaphylactique (Masini

et al., 2007) et l'hyperperméabilité paracellulaire. L'activation des récepteurs H₁ du cerveau induit des réponses dépolarisantes dans de nombreuses régions du cerveau, notamment l'hypothalamus, le thalamus et le cortex cérébral. L'activation des récepteurs H₁ cérébraux régule fortement le cycle veille-sommeil (Hu *et al.*, 2017).

1.3.2.2 Récepteur H₂

Le récepteur H₂ est exprimé dans les cellules pariétales gastriques, dans les muscles lisses et dans certaines cellules immunitaires, dans les neurones du SNC et du SNE et les cardiomyocytes (Panula *et al.*, 2015). Comme montre la figure 1.10, les H₂ couplés à la protéine G_{as} stimule l'adénylyl cyclase (AC) conduisant à une augmentation de la production d'AMPc et conséquemment à l'activation de la protéine kinase A (PKA) et la libération de Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique (Brown *et al.*, 2001 ; Neumann *et al.*, 2021). La réponse physiologique la plus discutée suite à l'activation de H₂ est la sécrétion d'acide gastrique. Également, H₂ peut être impliqué dans la régulation de la motilité gastrique et de la sécrétion intestinale de bicarbonate. Dans le système cardiovasculaire, l'activation de H₂ induit un effet chronotrope et ionotrope négatif (Jones *et al.*, 2011 ; Neumann *et al.*, 2021)

1.3.2.3 Récepteur H₃

Le récepteur H₃ s'exprime principalement sur les neurones histaminergiques, le cœur, poumons, le tube digestif et les cellules endothéliales. Les effets du H₃ sont reliés au cycle réveil/sommeil, l'obésité et la cognition (Hu et Chen, 2017 ; Jones *et al.*, 2011). L'activation de ce récepteur couplé à la protéine G_{ai} conduirait à l'inhibition de l'AMPc, la stimulation de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), ainsi que la diminution de l'afflux de calcium intracellulaire (Figure 1.9). Ce récepteur a une fonction particulièrement importante dans le SNC, participant dans l'inhibition de la libération d'histamine par les neurones histaminergiques du cerveau humain (Leurs *et al.*, 2012). Il semble également être impliqué dans le contrôle de la libération de neurotransmetteurs tels que la dopamine, la sérotonine, la noradrénaline, l'acide γ -aminobutyrique et l'acétylcholine dans le cerveau humain (Jones *et al.*, 2011).

1.3.2.4 Récepteur H₄

Le récepteur H₄ est exprimé principalement dans la moelle osseuse, les tissus intestinaux, ainsi que dans diverses cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T, les mastocytes, les neutrophiles et les éosinophiles. Les principales voies de signalisation des récepteurs H₄ sont présentées dans la figure 1.9. L'activation de ces récepteurs couplés à la protéine G_{ai} conduit à l'inhibition de la production de l'AMPc et ensuite à l'activation de la MAPK (Leurs *et al.*, 2012). Également, ils pourraient favoriser la mobilisation

du Ca^{2+} , via l'activation de la phospholipase C médiée par la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ (Hofstra *et al.*, 2003). Le rôle principal dans la régulation des mécanismes immunitaires/inflammatoires est mis en évidence par la stimulation de la production et libération des cytokines, chimiokines et histamine lors de l'activation de récepteurs H_4 (Takeshita *et al.*, 2003; Obara *et al.*, 2020)

1.3.3 Des dysfonctions dues à l'histamine

Comme discuté dans les sections précédentes, l'histamine est importante pour l'homéostasie humaine, car elle joue un rôle essentiel dans les fonctions physiologiques humaines les plus importantes (neurotransmission, défense, digestion et nutrition, croissance, apoptose et reproduction). Par conséquent, les altérations de leurs voies métaboliques (y compris de signalisation) sont liées aux diverses pathologies. L'histamine d'origine endogène peut générer des pseudo-allergies, alors que l'excès endogène est associé à des phénomènes allergiques et à l'anaphylaxie (Kemp *et al.*, 2002 ; Maintz et Novak, 2007). Aussi, l'excès d'histamine est associé aux lésions cérébrales, à la migraine, la neuro-inflammation, l'épilepsie et l'infarctus cérébral et d'autres troubles neurologiques (Yuan *et al.*, 2018). Dans le système circulatoire, l'histamine modulerait la pression sanguine et induirait la tachycardie et l'arythmie.

1.3.3.1 L'intolérance à l'histamine ou histaminose alimentaire

L'histaminose ou intolérance à l'histamine est causée par le déséquilibre entre les niveaux de cette amine dans l'organisme et la capacité des enzymes cataboliques de la dégrader. La figure 1.10 montre que l'excès d'histamine d'origine endogène pourrait provenir des différents types de cellules (mastocytes, basophiles, des cellules de type chromaffine et des neurones histaminergiques) capables de synthétiser cette amine biogène. D'autre part, l'origine exogène est reliée au contenu d'histamine dans les aliments, à l'activité des certaines entérobactéries productrices d'histamine contenues dans le microbiote humain ou à l'inhibition des enzymes qui la dégradent par certains médicaments (Barcik *et al.*, 2016 ; Pugin *et al.*, 2017).

Les aliments qui contiennent potentiellement des niveaux élevés d'histamine sont : a) ceux qui sont microbiologiquement contaminés, comme le poisson et la viande, ou les produits dérivés qui peuvent avoir été conservés ou transformés dans des conditions d'hygiène inappropriées ; et b) les produits fermentés, dans lesquels les bactéries responsables du processus de fermentation peuvent également avoir une capacité aminogénique (Comas-Basté *et al.*, 2020).

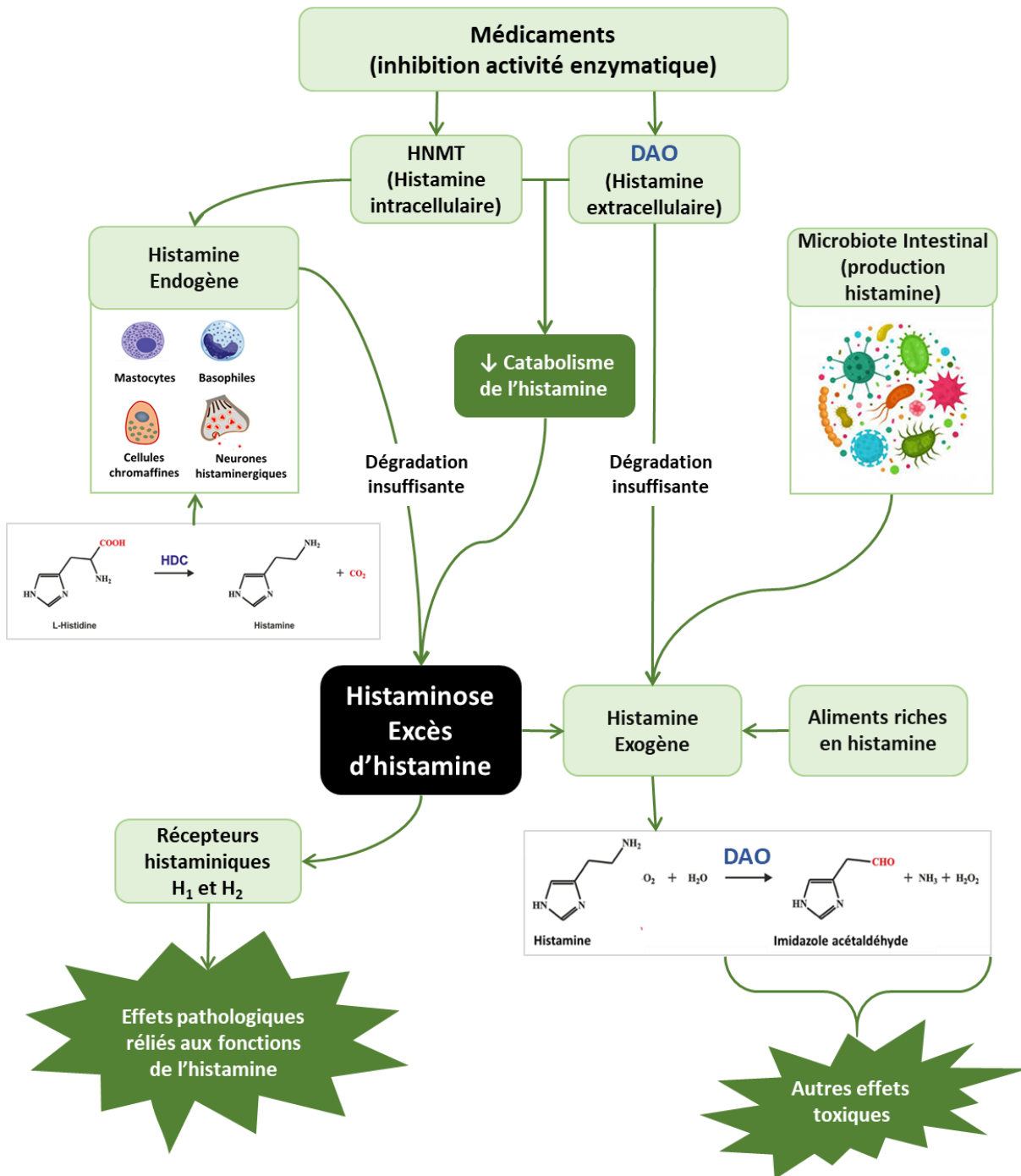


Figure 1.10 Histaminose alimentaire. L'ingestion d'aliments riches en histamine ou la capacité des certaines entérobactéries productrices d'histamine contenues dans le microbiote humain ou à la inhibition des enzymes qui dégradent cette amine biogène par certains médicaments génère un déséquilibre entre l'histamine circulante et les enzymes cataboliques. Les effets de l'excès d'histamine sont étroitement liés aux diverses fonctions physiologiques de l'histamine.

Historiquement, l'intoxication à l'histamine a été associée aux poissons des familles *Scombridae* et *Scomberesocidae*, comme le thon, le hareng et le maquereau. Aussi, les fromages ou les viandes ou boissons fermentées ont un contenu élevé d'histamine à cause de l'utilisation des diverses bactéries lactiques (ex. *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus curvatus* et *Oenococcus oeni*) connues pour leur capacité de produire d'histamine (Latorre-Moratalla *et al.*, 2010 ; Ladero *et al.*, 2010).

Selon sa localisation, l'histamine présente dans l'organisme est désactivée par la DAO qui est une protéine sécrétoire stockée dans les structures vésiculaires de la membrane plasmique. Cette enzyme est responsable de la dégradation de l'histamine extracellulaire (Schwelberger *et al.*, 2013). Chez les mammifères, l'expression de DAO est limitée à certains tissus, principalement l'intestin grêle, le côlon ascendant, le placenta et les reins (Comas-Basté *et al.*, 2020). Dans l'intestin, l'activité de la DAO augmente progressivement du duodénum vers l'iléon et se localise principalement dans les villosités intestinales (Comas-Basté *et al.*, 2020). En revanche, l'enzyme HNMT est exprimée dans un large éventail de tissus humains, surtout dans les reins et le foie, mais aussi la rate, le côlon, la prostate et les ovaires. Elle est une enzyme cytosolique responsable de l'inactivation de l'histamine intracellulaire (Holeček, 2020). Par conséquent, bien que la HNMT soit également présente dans le tractus gastro-intestinal, la DAO joue un rôle majeur dans la protection de l'organisme contre l'histamine exogène, provenant des aliments ingérés ou générés par le microbiote intestinal. Certains médicaments (Ex : metformine, aspirine, metronidazole ou métoclopramide) qui sont capables d'inhiber l'activité enzymatique de la DAO, sont aussi une cause de l'accumulation d'histamine dans l'intestin (Comas-Basté *et al.*, 2020).

L'intoxication à l'histamine se caractérise par une courte période d'incubation avec des symptômes qui disparaissent en quelques heures. Les symptômes sont étroitement liés aux diverses fonctions physiologiques de l'histamine dans le corps, touchant le tractus gastro-intestinal, les fonctions corporelles hémodynamiques et neurologiques.

1.3.3.2 Des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) sont considérées comme des maladies gastro-intestinales chroniques les plus répandues avec une incidence croissante dans les pays nouvellement industrialisés. Les MICI telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont un groupe d'affections inflammatoires chroniques du tractus digestif et du côlon respectivement, qui entraînent une inflammation et une ulcération au niveau intestinal causant des épisodes de douleurs abdominales, de diarrhée, de selles sanglantes, et pertes de poids (Fabisiak *et al.*, 2017).

La plupart des traitements comprennent des médicaments à base de sérotonine qui joue un rôle important dans la motilité et la sécrétion intestinale. Cependant, l'utilisation d'agents ciblant les récepteurs de l'histamine est considérée comme option thérapeutique potentielle (Gershon, 2004).

L'histamine étant un agent pro-inflammatoire a un rôle préjudiciable important dans les MICI (Smolinska *et al.*, 2014). Dans le tractus gastro-intestinal, l'histamine a un impact sur au moins trois fonctions principales : la modulation de la motilité gastro-intestinale, la production d'acide gastrique et l'altération de la sécrétion d'ions par les muqueuses (Sander *et al.*, 2006).

Au niveau intestinal, les récepteurs H₁ sont exprimés dans les entérocytes, les cellules du tissu conjonctif et immunitaire ainsi que dans les vaisseaux sanguins et plexus myentérique. Ils sont impliqués dans le rythme d'alimentation diurne, la réponse inflammatoire, l'hyperperméabilité paracellulaire et le contrôle de la perméabilité vasculaire (Fabisiak *et al.*, 2017). Aussi, il est connu que l'activation des récepteurs H₁ a un impact sur la contractilité des muscles lisses et la motilité gastro-intestinale (Neree *et al.*, 2020 ; Fabisiak *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2011).

Au-delà de la stimulation de la production de l'acide gastrique, les récepteurs H₂ ont un rôle important comme immunomodulateurs. En effet, la stimulation de H₂ entraîne la dégranulation des basophiles, la synthèse d'anticorps, la production de cytokines et la prolifération des cellules T. Aussi, ce récepteur est impliqué dans le contrôle de la contractilité et de la motilité gastro-intestinales par l'activation des cellules nerveuses entériques (Fabisiak *et al.*, 2017).

L'activation de H₄ stimulerait la migration des éosinophiles et la maturation des mastocytes qui relâchent des agents pro-inflammatoires tels que les cytokines, les chimiokines et l'histamine. Les H₄ favorisent la mobilisation de Ca²⁺ et activent la voie de signalisation dépendante de la MAPK (Pino-Ángeles *et al.*, 2012). L'accumulation de l'histamine est un facteur clé dans le processus de l'inflammation (Benly, 2015), contribuant de cette façon au développement de MICI. Aussi ces récepteurs sont impliqués dans la contractilité et la motilité gastro-intestinales (Fabisiak *et al.*, 2017).

i) Colite ulcéreuse

La colite ulcéreuse est une MICI affectant généralement la paroi interne du côlon et du rectum avec une inflammation continue de la muqueuse intestinale. La colite ulcéreuse est un facteur de risque de développement du cancer du côlon. Les symptômes présentés sont des saignements rectaux, une diarrhée

sanglante, des crampes abdominales et des douleurs. La cause de la colite ulcéreuse est inconnue, mais les recherches suggèrent fortement que des interactions entre les facteurs environnementaux, les bactéries intestinales, un dérèglement immunitaire et une prédisposition génétique en sont responsables. Le Canada possède l'une des plus hautes prévalence et incidence signalées au monde, avec approximativement 120 000 personnes diagnostiquées. L'histamine en excès peut déclencher une cascade de réactions conduisant à la production d'EROs (Figure 1.11), l'apoptose et la mort cellulaire (Heller *et al.*, 2008, 2005).

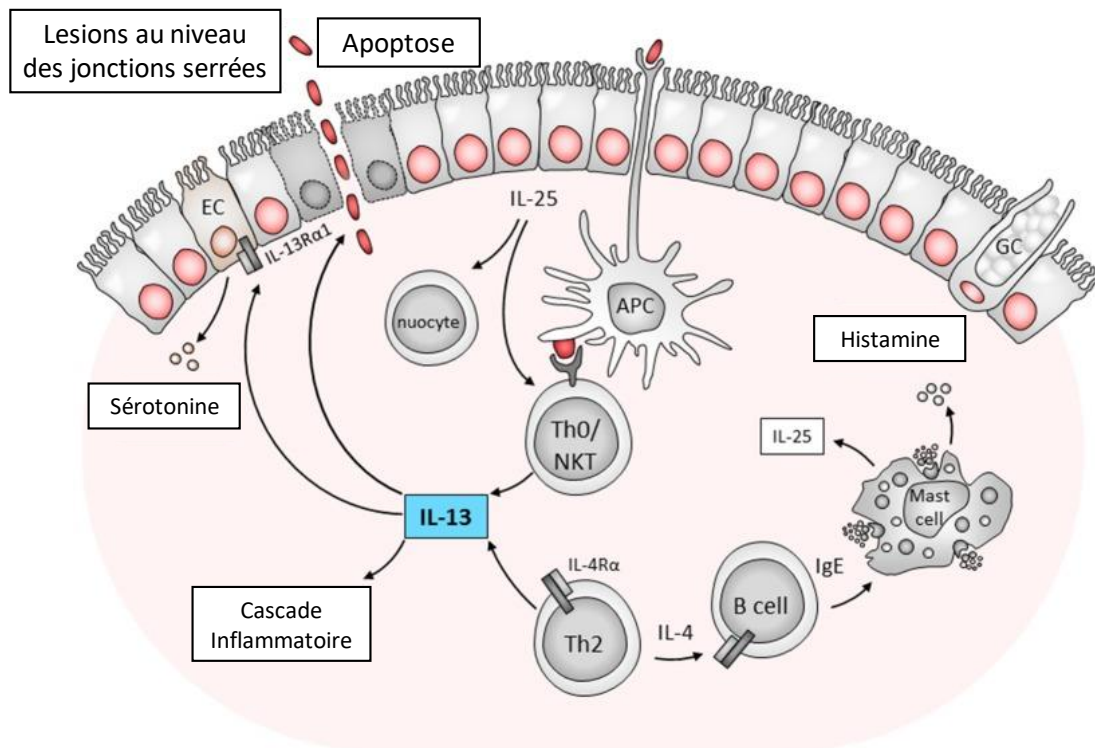


Figure 1.11 Composants immunitaires contribuant à la colite ulcéreuse.

Les mécanismes de la pathogenèse proposés sont basés dans un défaut de reconnaissance de l'antigène dans des cellules présentatrice d'antigène (APC). Aussi, la production d'IL-25 par les cellules épithéliales était également liée à la pathologie de la maladie par l'intermédiaire des nuocytes et des cellules NKT. Les cellules NKT produisent l'IL-13 qui agit sur la fonction des cellules épithéliales provoquant l'apoptose et l'affectation des jonctions serrées (*d'après Hoving, 2018*).

ii) Maladie de Crohn

La maladie de Crohn (MC) est une MICI qui affecte l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon avec une ulcération discontinue et une inflammation profonde de la paroi intestinale avec l'apparition des fistules et de polypes. Bien que les causes précises de la MC soient inconnues, on pense qu'elle est causée par une combinaison de facteurs environnementaux, immunitaires et bactériens chez des individus génétiquement

sensibles (Dam *et al.*, 2013). L'implication de tous les facteurs précédents empêche la définition des mécanismes moléculaires de la pathogénésie dans l'apparition de la MC.

1.3.3.3 L'histamine dans les troubles du système nerveux central

Bien que l'existence de l'histamine dans le cerveau soit connue depuis plus de 50 ans, le rôle de cette amine biogène dans le fonctionnement du cerveau n'a été largement apprécié que relativement récemment. Il est maintenant clair que l'histamine formée dans les neurones du système nerveux central régule plusieurs fonctions cérébrales (Haas & Panula, 2003 ; Haas *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, aucune pathologie n'a été liée spécifiquement ou sélectivement au dysfonctionnement cérébral de l'histamine. Cependant, il est connu que le dysfonctionnement de l'histamine peut être un facteur précipitant la gravité et la progression des diverses maladies.

L'histamine est le principal neurotransmetteur favorisant l'éveil dans le SNC et un régulateur clé de l'état comportemental jouant aussi un rôle dans la pathogénèse des troubles du sommeil (Haas *et al.*, 2008). En fait, les récepteurs H₁ et H₃ sont considérés des cibles prometteuses pour le traitement des troubles de l'état comportemental, l'hypersomnie et l'insomnie (Haas *et al.*, 2008).

L'histamine, au niveau cérébral contrôle l'appétit, les rythmes alimentaires et le métabolisme énergétique. Elle peut donc jouer un rôle dans les troubles de l'alimentation et les syndromes métaboliques (Jorgensen *et al.*, 2007 ; Haas, 2008). La boulimie ou le syndrome de frénésie alimentaire est probablement liée aux effets de l'histamine sur les systèmes de récompense du cerveau et à leur dysfonctionnement dans la dépendance. Les ligands H₃R capables de moduler la libération de l'histamine sont les possibles cibles pour des nouvelles antihistaminiques pour le traitement des troubles de l'alimentation. (Jorgensen *et al.*, 2007).

L'histamine joue un rôle important dans l'athérosclérose, la neuroinflammation, la plasticité des neurones et la dégénérescence. Aussi, elle contribue probablement à la physiopathologie des lésions cérébrales associées à l'hypoxie, à l'ischémie et à l'accident vasculaire cérébral (Haas, 2008). Dans toutes ces conditions, une augmentation de la libération d'histamine par les cellules immunitaires et l'implication des récepteurs H₁ et H₂ ont été signalées. En plus, l'histamine peut également interférer indirectement avec les maux de tête ou la migraine.

Également, l'histamine joue probablement un rôle physiopathologique dans des certaines nombreuses encéphalopathies, en particulier celles dues à une défaillance métabolique. Dans ces pathologies, il a été signalée une augmentation des niveaux d'histamine jusqu'à 13 fois, en particulier dans l'hypothalamus

(Haas, 2008). Dans la maladie d'Alzheimer, les projections des neurones histaminergiques présentent une dégénérescence accompagnée d'un nombre réduit de neurones (Panula *et al.*, 1997). En outre, une baisse des niveaux d'histamine, de l'activité HDC et de l'occupation des récepteurs H₁ a été observée dans la maladie d'Alzheimer, en accord avec les troubles cognitifs (Haas, 2008).

1.3.4 Approches thérapeutiques des affections dues à l'histamine.

1.3.4.1 Aspects préventifs

Les thérapies préventives pour le traitement des affections dues à l'histamine sont basées sur un régime nutritionnel en faible teneur en histamine (Comas-Basté *et al.*, 2020). Des additifs alimentaires contenant du DAO de rein de porc à enrobage entérique ont été développés comme traitement préventif des histaminosis (Shulpekova *et al.*, 2021; Dam *et al.*, 2013).

1.3.4.2 Agents antihistaminiques

Les antihistaminiques sont une classe pharmaceutique de médicaments qui agissent pour traiter les affections liées à l'histamine. Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont beaucoup appris sur les effets de l'histamine. Cependant, les antihistaminiques sont toujours utilisés dans un domaine restreint classiquement établi. Les médicaments ciblant les récepteurs H₁ comme la desloratadine, la loratadine ou la mepyramine sont principalement indiqués pour le traitement symptomatique des états allergiques, tandis que les antihistaminiques visant les récepteurs H₂ (cimetidine, ranitidine et nizatidine) sont recommandés pour le traitement de l'ulcère peptique et du reflux gastro-œsophagien. Cependant, le kétotifène et l'ébastine qui sont antagonistes des récepteurs H₁, ont montré des effets dans les MICI (Fabisiak *et al.*, 2017). Par conséquent, le blocage H₁ pourrait être exploré comme un nouveau traitement potentiel pour le MICI. Également, la cimétidine a présenté des propriétés inattendues en tant qu'agent antitumoral avec un potentiel pour le traitement du glioblastome.

Dans le SNC, l'histamine exerce ses effets à travers via les récepteurs H₁, H₂ et H₃ (Tiligada *et al.*, 2011). Ce dernier peut agir comme autorécepteurs présynaptiques inhibant la synthèse et la libération d'histamine dans les neurones histaminergiques ou d'hétérorécepteurs postsynaptiques. Le récepteur H₃ semble être une cible appropriée pour le développement de médicaments ciblant le SNC (Tiligada *et al.*, 2011). Les effets de l'activation du récepteur H₃ par l'histamine sont liés au cycle réveil/sommeil, à l'obésité et à la cognition (Hu et Chen, 2017; Jones *et al.*, 2011). Cependant, ce n'est qu'en 2019 que le premier antihistaminique ciblant le récepteur H₃ a été approuvé par la *Food and Drugs Administration* (FDA). Le pitolisant (antihistaminique H₃), utilisé dans la narcolepsie et l'hypersomnie, agit en bloquant le

récepteur H₃, qui ne pourra pas inhiber libération d’histamine, ce qui indirectement stimulera la libération d’acétylcholine, de dopamine et de noradrénaline promouvant ainsi l’éveil. Le ciproxifan est un antagoniste très sélectif pour les récepteurs H₃. Des effets d’amélioration cognitive ont été montrés par GSK-239512, un antagoniste des récepteurs H₃, chez les patients atteints de la maladie d’Alzheimer (Schwartzbach *et al.*, 2017). D’autres agents antihistaminiques H₃ sont en phase clinique d’évaluation pour le traitement de la maladie de Parkinson (Tiligada *et al.*, 2011). Les composés ciblant le récepteur de l’histamine H₄, toréforant et adriforant, sont en cours d’essais cliniques en phase II pour le traitement de l’asthme et le psoriasis.

Cependant, les antihistaminiques entraînent un large éventail d’effets indésirables comme les vertiges, la diminution de la coordination ou le délire peuvent également survenir. Les antihistaminiques peuvent également être cardiotoxiques chez certains utilisateurs ou provoquer la diarrhée, la constipation, fatigue. Pour cela, il y a un fort intérêt pour le développement des agents antihistaminiques alternatifs ou pour la supplémentation des enzymes capables de cataboliser l’histamine.

1.3.4.3 Les amine oxydases

Les amine oxydases (AO, EC 1.4.3._) sont des enzymes oxydoréductases qui catalysent l’oxydation des amines endogènes et exogènes dans les organismes vivants. La réaction d’oxydation de l’amine conduit à la formation de l’aldéhyde correspondant, du peroxyde d’hydrogène et de l’ammoniaque (Klema et Wilmot, 2012). Selon la concentration, ces composés physiologiques (polyamines, peroxyde d’hydrogène, ammoniaque et aldéhydes) peuvent être impliqués dans la mort, la prolifération ou la différenciation cellulaire (Nocera *et al.*, 2003).

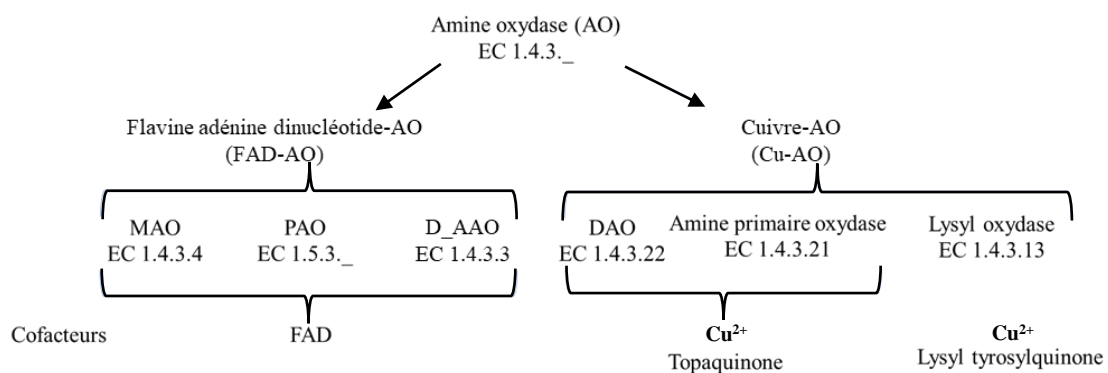


Figure 1.12 Classification des amine oxydases (AO) selon leur cofacteurs. (MAO, monoamine oxydase ; D-AAO, D-amino acide oxydase ; poly amine oxydase, PAO ; diamine oxydase, DAO)

Les AO peuvent être classifiées (Figure 1.12) selon leurs cofacteurs en deux groupes : les amine oxydases à flavine adénine dinucléotide (FAD-AO) et les amine oxydases à cuivre (Cu-AO). Notre intérêt pour ce projet est axé sur la diamine oxydase végétale : une Cu-AO avec un potentiel thérapeutique en agissant sur l’histamine.

Amine oxydase à cuivre (Cu-AO)

Ces enzymes catalysent de l’oxydation d’une large gamme d’amines, y compris de nombreux neurotransmetteurs, l’histamine et des amines xénobiotiques (Schwelberger *et al.*, 2013). Ce groupe comprend à la fois les monoamines-oxydases et les diamines oxydase. En raison de leur large distribution dans les tissus de mammifères, les Cu-AO sont impliquées dans divers processus physiologiques. Les changements dans leur expression et leur activité catalytique ont été liés à plusieurs maladies, par exemple l’intolérance à l’histamine, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, l’eczéma atopique, la sclérose en plaques, le diabète, en autres (Klema et Wilmot, 2012).

Les monoamines oxydases

Les monoamines oxydases (EC 1.4.3.21) sont des enzymes qui oxydent les monoamines primaires, mais qui ont peu ou pas d’activité face aux diamines, telles que l’histamine, ou aux amines secondaires et tertiaires. Ces enzymes présentent le cuivre (II) et la 2, 4, 5-trihydroxyphenylalanine quinone (TPQ) comme cofacteur du site catalytique (Mondovi *et al.*, 1994). Ce groupe d’enzymes catalyse la désamination oxydative des amines primaires (Tyramine, Tryptamine, méthylamine) en aldéhydes correspondants avec libération concomitante d’hydrogène peroxyde et ammoniacque (Figure 1.13).

En plus, ces monoamines oxydases sont sensibles à l’inhibition par des réactifs contenant le groupe carbonyle, tels que la semicarbazide d’où l’appellation de AO sensible à la semicarbazide. La famille des AO sensibles à la semicarbazide, avant classée comme EC.1.4.3.6, est désormais renommée Amine oxydase primaire contenant du cuivre (EC.1.4.3.21) pour mieux les distinguer parmi les autres amines oxydases (Boyce *et al.*, 2009).

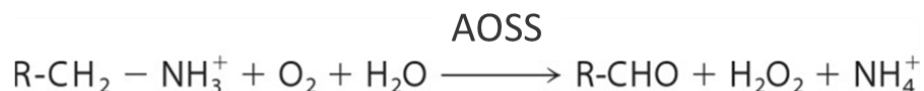


Figure 1.13 Réactions chimiques des AO sensibles à la semicarbazide (AOSS)

La désamination oxydative de l’amine primaire et formation de l’acétaldéhyde correspondant avec la production de peroxyde d’hydrogène et d’ammoniac (*d’après Heuts et al.*, 2011)

Entre leurs fonctions physiologiques, les AOSS ont un rôle dans le développement des vaisseaux sanguins, la régulation de la lipolyse, la réticulation des protéines, l'athérogenèse, la régulation du glucose et l'extravasation des leucocytes aux sites d'inflammation. Des niveaux élevés d'AOSS plasmatique sont reliés au diabète de type 1 et de type 2, à l'insuffisance cardiaque et à la cirrhose du foie (O'Sullivan *et al.*, 2004).

Diamine oxydase (DAO)

La diamine oxydase (EC 1.4.3.22) est une amine oxydase de cuivre ayant de la TPQ pour catalyser la désamination oxydative des diverses diamines telles que l'histamine, la tyramine ou la putrescine, en aldéhydes correspondants, ammoniacs et peroxyde d'hydrogène (Figures 1.8 et 1.14). L'enzyme est un homodimère, composé des sous-unités ayant des poids moléculaires de 70 à 95 kDa, contenant chacune un ion cuivre et le cofacteur TPQ est lié de façon covalente (Schwelberger *et al.*, 2013).

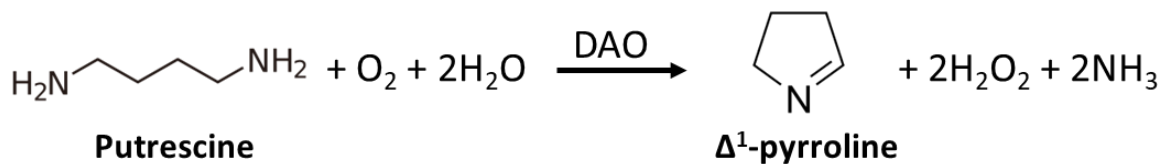


Figure 1.14 Réaction de désamination oxydative de la putrescine par la DAO. L'oxydation de la putrescine conduit à la formation de la pyrroline et la libération d'ammoniac et peroxyde d'hydrogène (*d'après Schwelberger et al.*, 2013)

Au-delà de son rôle dans la dégradation intestinale de l'histamine chez l'homme, la DAO est également présente dans les micro-organismes, les plantes et les animaux.

Diamine oxydase végétale et la catalase dans l'approche thérapeutique des affections dues à l'histamine

La DAO d'origine végétale (vDAO) possède diverses caractéristiques qui diffèrent des enzymes des mammifères, principalement reliées à une plus grande affinité pour l'histamine comme substrat et à une plus grande stabilité lors de son extraction et conservation (Mondovi *et al.*, 2013). Cette histaminase est particulièrement abondante dans des *Fabaceae*, dans de *Lathyrus sativus* et dans de *Pisum sativum* (Medda *et al.*, 1995 ; Vianello *et al.*, 1993). La vDAO a démontré sa capacité d'atténuer diverses dysfonctions liées à l'histamine associées à des affections allergiques (Mondovi *et al.*, 2013) et des troubles intestinaux (Neree *et al.*, 2020). En plus, des études *in vitro* ont montré une réduction de l'activation des neutrophiles (Pietrangeli *et al.*, 2020) et des dommages oxydatifs cellulaires (Masini *et al.*, 2007). Également, la vDAO a réduit la cytotoxicité de l'histamine qui induit la génération de radicaux libres (Nocera *et al.*, 2003).

L'utilisation de vDAO est suggérée comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour diminuer les niveaux d'histamine permettant ainsi mieux gérer les MICI (Mateescu *et al.*, 2017). Des études cliniques ont montré l'amélioration des symptômes liés à l'histamine (Comas-Basté *et al.*, 2020). L'amélioration de l'activité DAO au niveau intestinal permettrait réduire l'histamine et ainsi un régime moins restrictif face à une alimentation contenant certaines quantités d'histamine.

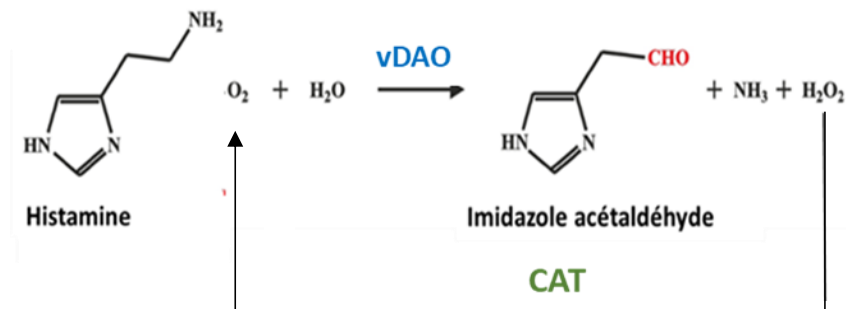


Figure 1.15 Réaction chimique de la désamination oxydative de l'histamine par la DAO. L'oxydation de l'histamine par la vDAO conduit à la libération de peroxyde d'hydrogène lequel peut être dégradé par la catalase (*d'après Schwelberger et al.*, 2013)

Comme pour la plupart des oxydases, un sous-produit de la réaction enzymatique est H₂O₂, un agent pro-oxydant qui peut présenter des effets pro-oxydants indésirables. La catalase (EC 1.11.1.6) est une enzyme antioxydante qui catalyse spécifiquement la décomposition du H₂O₂. (Figure : 1.15) La catalase a été proposée pour une utilisation dans les lésions de reperfusion post-ischémique dans l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux, les brûlures, les traumatismes (Venardos et Kaye, 2007 ; Phillips et Snow, 1994). Aussi, cette enzyme a montré une capacité de protéger la lignée cellulaire Caco-2 de l'intestin humain contre les dommages causés par l'histamine en combinaison avec la vDAO (Jumarie *et al.*, 2017).

CHAPITRE 2

PRÉSENTATION DU PROJET

Le chapitre 2 inclut la présentation du projet, les hypothèses et les objectifs. Des schémas représentant l'avancement et les différentes étapes du projet sont aussi présentés. Finalement, les modèles des cellules d'adénocarcinome colorectal humain (Caco-2) et de carcinome embryonnaire de souris P19 sont montrés.

2.1 Présentation du Project de thèse

Les ions métalliques sont impliqués dans un large éventail de fonctions biologiques dans les contextes intra et extracellulaires. Parmi les cations métalliques, le cuivre est un oligo-élément essentiel pour le fonctionnement de l'organisme en réalisant leurs fonctions comme cofacteur des différents enzymes (ex : lysyl oxydase, ascorbate oxydase, céruloplasmine, amine oxydases, superoxyde dismutase, cytochrome c oxydase). La dérégulation du métabolisme du cuivre entraîne diverses maladies comme la MM ou la CEMH. Le déficit en cuivre a été relié à des troubles touchant principalement les muscles, le cœur et le système nerveux central. Également, il a été associé à la réduction de l'activité des enzymes à cuivre (Ex. : la CCO, la CP). Le cuivre (II) complexé avec L-histidine (His) administré par voie parentérale, a été utilisé pour traiter la MM et la CEMH. Les niveaux des enzymes cuivriques sont revenus aux niveaux normaux après le traitement. Toutefois, l'administration quotidienne injectable de ce complexe et son instabilité en solution aqueuse limitent son utilisation. Par conséquent, les complexes cuivriques des acides aminés pourraient représenter une alternative pour le traitement des troubles reliés à la carence du cuivre. Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives pour l'éventuelle utilisation des complexes cuivriques en tant qu'agents thérapeutiques dans les traitements reliés à la carence du cuivre.

Les maladies orphelines présentées dans cette thèse se caractérisent par un large spectre clinique dont les troubles sévères du SNC sont un facteur commun. Cet aspect peut être expliqué par des atteintes au niveau de la biogenèse des enzymes avec cuivre ayant des fonctions importantes dans le cerveau. Ainsi, l'atteinte de la biogenèse de la DAO amène à un excès d'histamine qui pourrait induire des troubles neurologiques. En effet, l'activation des récepteurs histaminiques par l'histamine peut déclencher une cascade de réactions conduisant à la production des EROs et du H₂O₂ causant des dommages aux composants cellulaires, l'apoptose et la mort des neurones. Des modèles cellulaires pratiques sont nécessaires pour cribler et développer de nouveaux agents antihistaminiques ciblant les récepteurs du SNC. L'action antagoniste de ces agents pourrait soulager les dysfonctions neurologiques associées à l'excès d'histamine observées chez des patients atteints des maladies associées à la carence du cuivre.

Il a été montré dans la première partie du projet de thèse que les complexes de cuivre (II) présentent une toxicité modérée. Parmi les ligands, il n'y avait pas de toxicité pour l'histidine, mais une toxicité réduite pour l'histamine. Il était donc d'intérêt d'investiguer l'éventuelle présence des récepteurs spécifiques pour l'histamine sur des neurones P19. En effet, la toxicité de l'histamine a été totalement annulée par la DAO (l'enzyme qui décompose l'histamine) et aussi par des agents antihistaminiques, suggérant la présence des récepteurs de type histaminique. Comme les neurones P19 représentent une lignée cellulaire facilement à être obtenue par différenciation des cellules souches P19, nous avons abordé une étude approfondie sur cette lignée, ayant comme objectifs : i) l'identification des types des récepteurs et ii) l'utilisation de ce modèle cellulaire pour l'évaluation des nouveaux agents antihistaminiques.

Compte tenu de ces différents aspects, les axes de recherche du présent projet de doctorat comportent deux approches différentes pour le traitement des maladies liées au déficit et aux dysfonctionnements du métabolisme du cuivre. Un axe centré sur une approche thérapeutique visait à rétablir les niveaux de cuivre et augmenter l'activité des enzymes contenant du cuivre comme la CCO en utilisant des complexes cuivriques bioactifs. Le second axe visait l'évaluation d'un modèle pour l'étude des molécules capables de réduire les effets neurologiques associés à l'excès d'histamine dans le SNC dus à la défaillance de la biogenèse de la DAO.

2.1.1 Objectifs de recherche

Le premier axe de cette étude : *approche thérapeutique* décrit la préparation et la caractérisation des complexes de cuivre (II) solides, de faible poids moléculaire, avec une emphase particulière sur les complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$. Les objectifs proposés étaient les suivants :

- 1- Analyser la stabilité des complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ dans différents milieux physiologiques simulés, analogues aux ceux du tractus gastro-intestinal
- 2- Évaluer la biocompatibilité de complexes en utilisant des neurones P19 et des cellules Caco-2 différenciées
- 3- Étudier le transport à travers l'épithélium intestinal des complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$
- 4- Évaluer le transport et l'absorption de complexes de cuivre (II) dans les cellules Caco-2 différenciées

- 5- Analyser l'influence des complexes cuivriques sur l'activité de l'enzyme CCO des cellules Caco-2 différenciées

Dans le deuxième axe : *modèle cellulaire*, les objectifs étaient :

1. Caractériser la réponse histaminique des neurones P19 en culture et la modulation de cette réponse par trois antihistaminiques courants (desloratadine, cimetidine et ciproxifan) ainsi que par la vDAO et par la CAT
2. Étudier dans quelle mesure les neurones P19 peuvent servir de modèle pour évaluer l'effet des agents antihistaminiques potentiellement impliqués dans le traitement des dysfonctionnements induits par l'histamine.

2.2 Hypothèses

En considérant que dans la littérature, il n'y a aucun rapport qui indique l'altération de l'absorption intestinale des complexes de cuivre (II), nous avons émis l'hypothèse que l'administration orale des complexes cuivriques pourrait être avantageuse pour rétablir les niveaux de cuivre et augmenter l'activité des enzymes comme la CCO. Pourtant, pour pouvoir réaliser des formes pharmaceutiques administrables par voie orale (comprimés) stables dans le milieu d'acidité gastrique, il s'impose la synthèse de complexes cuivriques solides et l'étude de leur stabilité dans des milieux physiologiques, leur biocompatibilité, ainsi que leur transport à travers l'épithélium intestinal et leur action biologique.

Ce projet de recherche contribuera à l'avancement des connaissances, dans la mesure où il examine une nouvelle approche dans la thérapie des maladies liées aux déficits du cuivre, en considérant que ces complexes cuivriques peuvent être absorbés dans l'intestin. La compréhension du système de leur transport transmembranaire à travers l'épithélium intestinal, suite à leur administration par voie orale, permettra de développer de nouvelles formes pharmaceutiques et améliorer la qualité de vie des patients.

Les défaillances du métabolisme du cuivre affectent aussi la biogenèse des enzymes comme la diamine oxydase, enzyme à cuivre impliquée dans le catabolisme de l'histamine. L'excès de cette amine biogène accroît les dysfonctionnements neurologiques constatés chez les patients atteints des maladies associées au déficit cuivrique. Le développement des antihistaminiques ciblant les récepteurs histaminiques du SNC a besoin des modèles cellulaires adéquats. Considérant que les neurones du SNC expriment les récepteurs H₁, H₂ et H₃, on a émis l'hypothèse, que les neurones P19 qui se ressemblent étroitement à ceux de l'organisme

pourraient être considérés pour étudier dans quelle mesure ils peuvent servir de modèle pour évaluer l'effet de l'histamine et des agents antihistaminiques impliqués dans le traitement des dysfonctions induites par l'histamine.

La figure 2.1 présente le résumé graphique de l'avancement dans le projet de thèse.

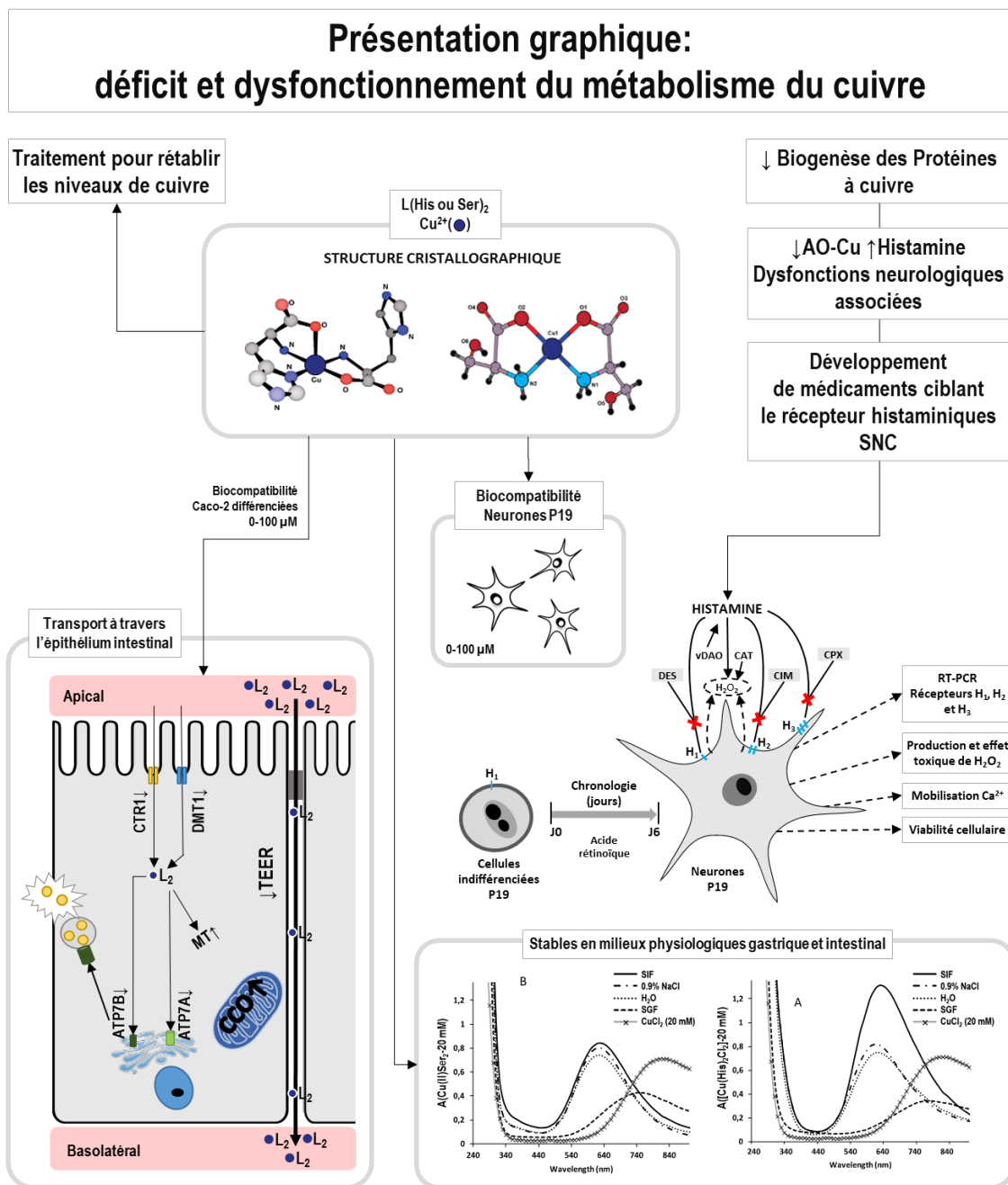


Figure 2.1 Résumé graphique de l'avancement du projet de recherche

Des schémas-blocs des étapes et des accomplissements durant le projet de recherche sont présentés dans les Figures 2.2 et 2.3.

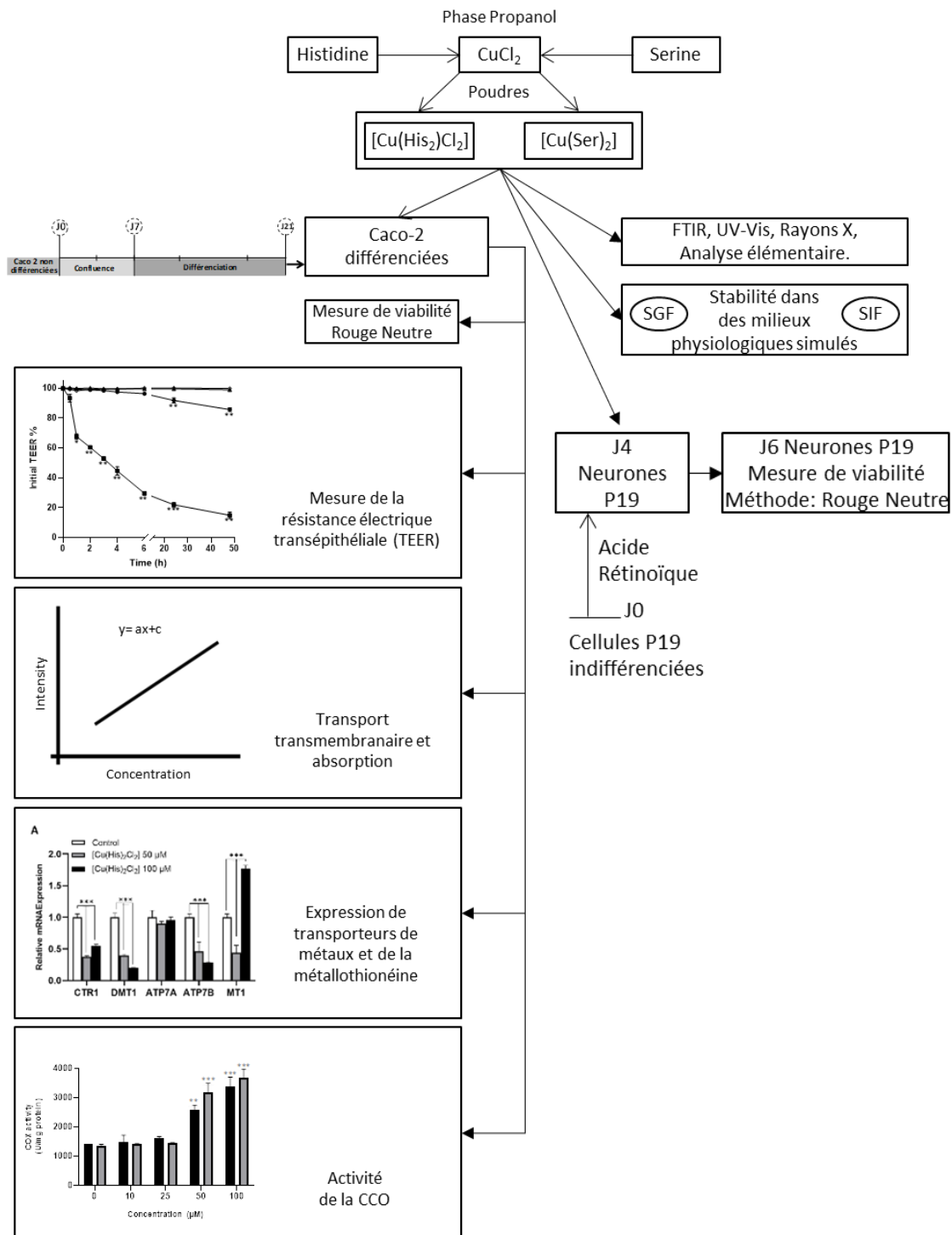


Figure 2.2 Schéma-bloc des différentes étapes du projet (Section sur des agents bioactifs à cuivre; J = Jour).

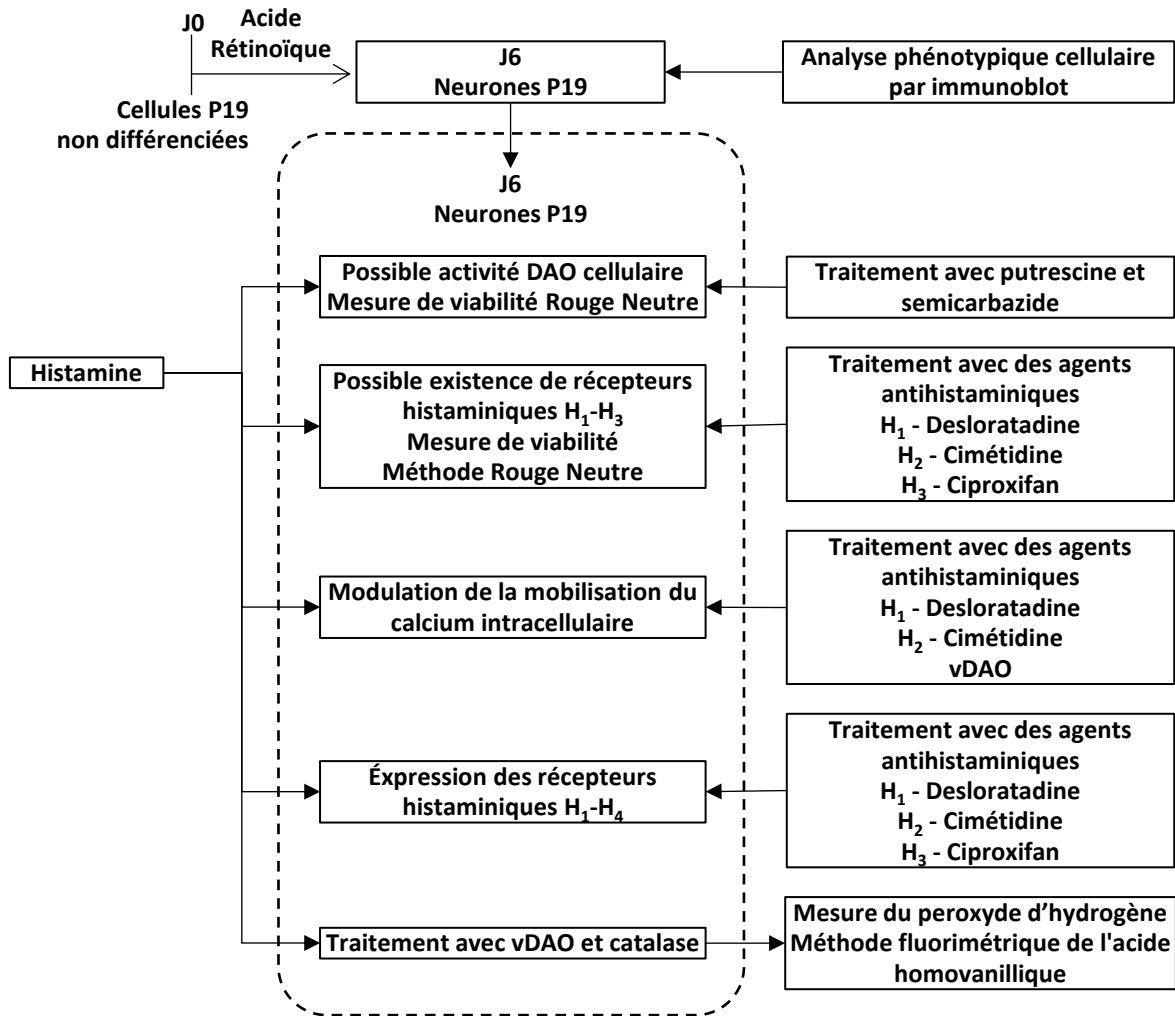


Figure 2.3 Schéma-bloc des différentes étapes du projet sur l'utilisation des neurones P19 pour l'évaluation d'agents antihistaminiques (Section récepteurs histaminiques et agents antihistaminiques; J = jour)

Les principales réalisations dans le cadre du présent projet de recherche doctorale sont présentées dans l'Appendice A

2.3 Modèle de cellules P19

Le modèle cellulaire P19 a été développé par le Dr McBurney à l'Université d'Ottawa (2003). Elles sont obtenues d'un tératocarcinome formé à la suite de la transplantation d'un embryon de 7,5 jours dans le testicule d'une souris juste avant l'initiation de la différenciation cellulaire. Présentant un caryotype euploïde mâle normal, les cellules P19 non différenciées peuvent proliférer de façon rapide, indéfiniment, et sont stables génétiquement (McBurney, 2003).

Ayant la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires, elles sont multipotentes. L'utilisation d'acide rétinoïque (AR) à des concentrations plus grandes que 10^{-6} M conduit à la différenciation des cellules P19 en neurones (McBurney, 2003). Ainsi, les cellules peuvent être différenciées en cellules cardiaques par le traitement avec diméthylsulfoxyde (DMSO) ou par l'hormone peptidique ocytocine (Figure 2.4) (Bouchard *et al.*, 2009).

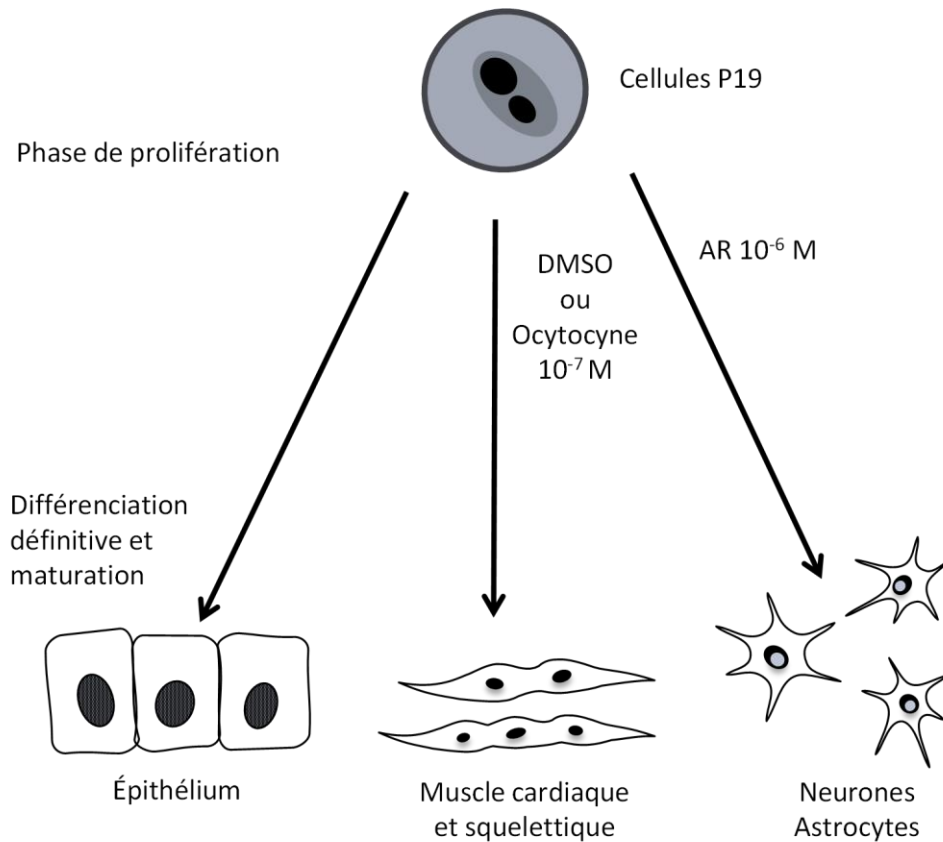


Figure 2.4 Différenciation des cellules P19 par différents inducteurs à des concentrations non toxiques (*d'après Rudnicki et al., 1987*)

2.3.1 Différenciation neuronale

La différenciation des cellules P19 en neurones commence suite à leur exposition pendant 4 jours à l'AR $0,5 \mu\text{M}$ qui va se lier aux récepteurs nucléaires en activant la transcription de gènes cibles pour induire la différenciation neuronale (McBurney, 2003). Du jour 0 (J0) au jour 4 (J4), les cellules cultivées dans les plaques de Petri bactériologiques sont des corps sphéroïdes flottants (Figure 2.5). À partir du J4, l'action de l'AR est arrêtée et les corps embryoides sont dissociés en cellules individuelles.

Durant les 24 h suivantes, les cellules vont étendre des neurites qui seront visibles au bout de deux jours suivants (J6) de la différenciation (Figure 2.5). La maturation des neurones va continuer de façon semblable au SNC. En fait, plusieurs phénotypes des neurones nouvellement différenciés présentent des caractéristiques comparables aux populations neuronales normales du cerveau (Cadet *et al.*, 2000). Les cellules de carcinome embryonnaire P19 ont été largement utilisées comme modèle neuronal capable d'imiter les neurones du SNC (Ulrich et Majumder, 2006 ; Staines *et al.*, 1994) et peuvent se différencier en grande quantité.

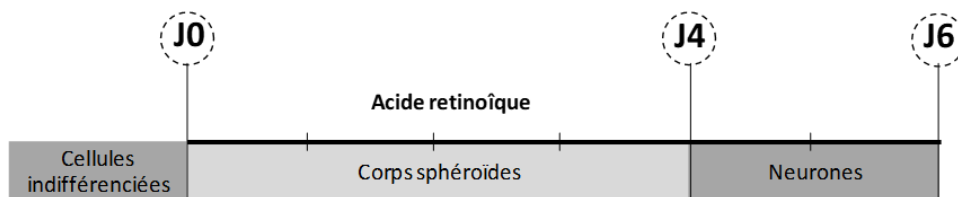


Figure 2.5 Différenciation des cellules P19 en neurones en présence d'acide rétinoïque 0,5 μ M (*d'après Ducharme et al.*, 2010)

2.4 Le modèle des cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sont une lignée cellulaire de cancer épithélial du côlon humain. Lorsqu'elles sont cultivées en monocouche, les cellules Caco-2 se différencient quinze jours après confluence de façon spontanée pour former des jonctions serrées entre les cellules (Lea, 2015) (Figure 2.6).

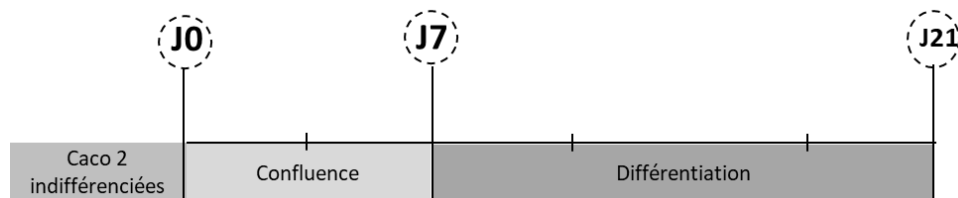


Figure 2.6 Différenciation des cellules Caco-2.
Les cellules Caco-2 peuvent se différencier spontanément autour de 15 à 21 jours (J) post-ensemencement.

Pour cela, elles sont utilisées comme modèle d'absorption intestinale humaine des médicaments et d'autres composés. Comme les cellules Caco-2 expriment des protéines de transport similaires à ceux de l'épithélium intestinal humain (Lea, 2015), elles peuvent servir de modèle pour étudier le passage par voie paracellulaire des divers composés (Figure 2.7).

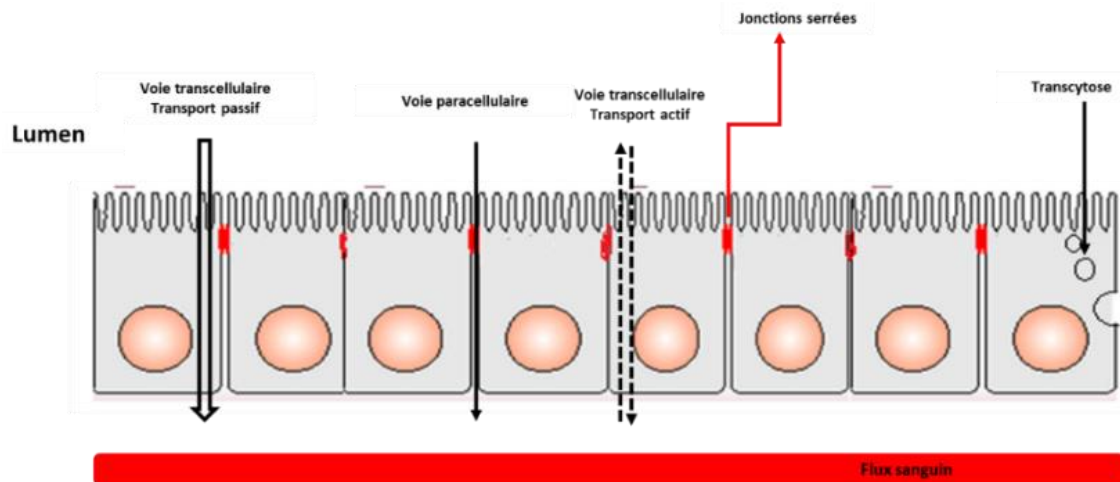


Figure 2.7 Caractéristiques de base d'une couche épithéliale. Les cellules épithéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées. L'absorption des différents composés peut être réalisée par voie paracellulaire, transcellulaire (transport actif ou passif) ou transcytose

Pour l'étude du transport à travers la monocouche, les cellules Caco-2 sont généralement cultivées sur des supports en plastique semi-perméables qui peuvent être insérés dans les puits de plaques de culture. Vers la confluence, ils commencent à se polariser en acquérant une bordure en brosse apicale caractéristique avec des microvillosités. Les composés d'essai sont ensuite ajoutés aux côtés apical ou basolatéral de la monocouche. Après incubation pendant différentes durées, des aliquotes du tampon dans des chambres opposées sont prélevées pour la détermination de la concentration des composés à tester (Lea, 2015).

CHAPITRE 3
**COPPER COMPLEXES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS: STRUCTURAL
INSIGHTS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND NEURON COMPATIBILITY**

Ladan Esmaeili^{1,2,#}, Mariela Gomez Perez^{1,2,#}, Maziar Jafari¹, Joanne Paquin¹, Pompilia Ispas-Szabo^{1,2},
Veronica Pop³, Marius Andruh³, Joshua Byers¹ and Mircea Alexandru Mateescu^{1,2,*}

¹Department of Chemistry, Centres Pharmaqam and CERMO-FC, Université du Québec à Montréal;

²Research Chair in Enteric Dysfunctions “Allerdys”, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada;

³University of Bucharest, Faculty of Chemistry, Inorganic Chemistry Laboratory, Str. Dumbrava Rosie nr. 23, 020464, Bucharest, Romania.

[#]L.E. and M.G.P. contributed equally to the work.

Cet article a été publié dans *J. Inorg. Biochemistry* 192 (2019) 87–97

DOI : 10.1016/j.jinorgbio.2018.12.010

CONTRIBUTIONS DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Auteures principales :

Ladan Esmaeili : Conception du projet ; Méthodologie ; Réalisation de toute l'expérimentation ; Rédaction du manuscrit, Analyse des données ; Rédaction – révision

et

Mariela Gomez Perez : Conception du projet ; Méthodologie ; Réalisation de toute l'expérimentation ; Rédaction du manuscrit ; Analyse des données ; Rédaction - révision

Co-auteurs :

Maziar Jafari : Contribution à la réalisation des expériences (Mesures électrochimiques) ; Rédaction du manuscrit (Mesures électrochimiques) ; Analyse des données

Joanne Paquin : Conception du projet ; Analyse formelle ; Acquisition de financement; Méthodologie ; Gestion de projet ; Surveillance ; Rédaction - brouillon original ; Rédaction - révision

Pompilia Ispas-Szabo : Conception du projet ; Analyse formelle ; Acquisition de financement ; Méthodologie ; Gestion de projet ; Surveillance ; Rédaction - révision

Veronica Pop : Méthodologie

Marius Andruh : Méthodologie; Rédaction - révision

Joshua Byers : Analyse des données ; Analyse formelle ; Recherche; Méthodologie ; Rédaction - révision et édition

Mircea Alexandru Mateescu : Conception du projet; Analyse formelle; Acquisition de financement; Méthodologie; Gestion de projet; Surveillance; Rédaction - révision

3.1 Résumé

Le cuivre coordonné avec des résidus d'acides aminés est essentiel pour la fonction de nombreuses protéines. De plus, le cuivre complexé à la L-histidine, sous forme de $[\text{Cu}(\text{His})_2]$, est utilisé dans le traitement de la maladie neurodégénérative de Menkes et de la cardioencéphalomyopathie. Cette étude visait à coordonner le cuivre (II) avec quatre ligands (L-sérine, L-histidine, urée et biuret) et à évaluer les caractéristiques structurales, la stabilité, l'activité antioxydante et la compatibilité neuronale des complexes obtenus. Tous les complexes ont été synthétisés avec CuCl_2 et purifiés par précipitation dans l'alcool. La composition élémentaire, la diffraction des rayons X et la FTIR ont indiqué que les complexes étaient sous forme de $[\text{Cu}(\text{Ligand})_2]$ et présentaient une coordination tridentée (L-histidine), bidentée (L-sérine et biuret) ou monodentée (urée) avec le cuivre. Les profils d'absorbance UV-Vis dans des solutions physiologiquement pertinentes et la voltamétrie cyclique ont révélé que, contrairement à $[\text{Cu}(\text{Urée})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$, les complexes $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ et $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ étaient stables dans différents milieux, y compris l'eau, la solution physiologique et les milieux physiologiques simulés. Tous les complexes et leurs ligands avaient une capacité antioxydante évaluée par les méthodes DPPH (1,1-diphényl-2,2-picrylhydrazyl) et DPD (N,N-diéthyl-p-phénylènediamine). Toutefois, le complexe $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ a montré une activité antioxydante plus élevée. La biocompatibilité neuronale a été évaluée par des mesures de viabilité cellulaire des neurones P19. Le complexe $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ a montré une bonne neurocompatibilité (environ 90 % à des concentrations allant jusqu'à 200 μM). La cytotoxicité des autres complexes de cuivre était plus faible par rapport à des concentrations équivalentes de CuCl_2 . Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation de ces complexes de cuivre comme antioxydants et éventuellement comme agents thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives. De plus, l'étude de ces complexes peut aider à améliorer la thérapie de chélation pour les dysfonctionnements du cuivre.

3.2 Abstract

Copper coordinated with amino acid residues is essential for the function of many proteins. In addition, copper complexed to free L-histidine, as $[\text{Cu}(\text{His})_2]$, is used in the treatment of the neurodegenerative Menkes disease and of cardioencephalomyopathy. This study was aimed to coordinate copper (II) with four small ligands (L-Serine, L-histidine, Urea and Biuret) and to evaluate structural features, stability, antioxidant activity and neuronal compatibility of the resulting complexes. All Complexes were synthesized with CuCl_2 and purified by precipitation in alcohol. Elemental composition, X-rays diffraction and FTIR indicated that the complexes were in form of $[\text{Cu}(\text{ligand})_2]$ and exhibited tridentate (L-histidine), bidentate (L-Serine and Biuret) or monodentate (Urea) coordination with copper. UV-Vis absorbance profiles in physiologically relevant solutions and cyclic voltammetry revealed that, contrarily to $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$, the $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ and $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ complexes were stable in different media including water, physiological saline and intestinal-like solutions. All complexes and their ligands had antioxidant capacity as evaluated by DPPH (1,1-diphenyl-2,2-picrylhydrazyl) and DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) methods, and the $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ complex was the most potent. Neuronal compatibility was assessed through cell viability measurements using cultured neurons derived from mouse P19 stem cells. Although only $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ showed a good neurocompatibility (about 90% at concentrations up to 200 μM), the cytotoxicity of the other copper complexes was lower compared to equivalent concentrations of CuCl_2 . These findings open new perspectives for the use of these copper complexes as antioxidants and possibly as therapeutic agents for neurodegenerative diseases. Furthermore, study of these complexes may help to improve chelation therapy for copper dysfunctions.

Keywords: Histidine; Serine; Amino acid copper complexes; Antioxidants; Electrolysis induced oxidative stress; Neuronal derivatives of P19 embryonic carcinoma cells.

Abbreviations: DPD, N,N-diethyl-p-phenylenediamine; DPPH, Diphenyl-2,2-picrylhydrazyl; ELS, Electrolysed; HAT, Hydrogen Atom Transfer; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; His, L-histidine; KH, Modified Krebs-Henseleit; ML and ML2, M (metal), L (ligand); MP, Melting point; NR, Neutral Red; PBS, Phosphate Buffer Saline; ROS, Reactive Oxygen Species; Ser, L-Serine; SET, Single Electron Transfer, SGF, Simulated Gastric Fluid; SIF, Simulated Intestinal Fluid; SNB, Supplemented Neurobasal (medium)

3.3 Introduction

Metal ions are involved in a wide range of biological functions in the intra and extracellular contexts of life systems (O'Dell, 1976). Among metal cations, copper (II) plays an essential role in all living organisms, for instance as a structural component of several enzymes (ex: laccase, ascorbate oxidase, ceruloplasmin, amine oxidases, superoxide dismutase, cytochrome c oxidase) (Bento *et al.*, 2007; Bertini *et al.*, 1995). In contrast to copper bound to proteins or peptides, unbound copper can be highly toxic due to its ability to generate free radicals via Fenton reaction (Flemming and Trevors, 1989). Copper ions are transported in biological systems by proteins such as ceruloplasmin [carrying about 90-95% of circulating of copper (II)] and serum albumin in mammals, and hemocyanine in crustaceans. Blue-copper proteins, such as ascorbate oxidase and laccase enzymes, are also frequent in vegetables. Also, small biologically active molecules, such as complexes with amino acids, capable to bind and transport copper have various physiological functions and may possess therapeutic properties (Gala *et al.*, 2014). The copper complexes Dicuprene, Alcuprin and copper salicylate can act as anti-inflammatory agents that help to reduce symptoms (pain and stiffness of rheumatoid arthritis) (Sorenson and Hangarter, 1977). Cu(II)-ATSM (copper (II)-diacetyl-bis(N4-methylthiosemi-carbazone) and kynurenine precursor of anthralinic acid copper ligand exert antioxidant and cardio-protective effects (Srivastava *et al.*, 2016; Sas *et al.*, 2007), and could be beneficial in the treatment of neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases (Klevay, 2008). Ceruloplasmin, the circulatory blue copper protein, possesses antioxidant, cardioprotective and neuromodulatory properties (Mateescu *et al.*, 1995) Its active site consists of six copper atoms, and three of them are coordinated by histidine residues (Bento *et al.*, 2007). Despite its therapeutic potential, ceruloplasmin cannot be used as a medication due to its protein nature with immunogenic and hazardous risks of animal origin. It was then hypothesized that small copper complexes may be of interest in certain aspects, being comparable to copper proteins, but with an easier administration and a better regulatory acceptability.

Copper amino acid complexes synthesized decades ago have received increasing attention in the past years, particularly for their potential biomedical application (Deschamps *et al.*, 2005; Bukharov *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2010). One of the important copper chelators is the amino acid L-histidine (His). Copper bound with His represents an exchangeable pool of copper (II) with albumin in blood (Gala *et al.*, 2014). His possesses an imidazole group that can coordinate metal ions in metalloproteins and is also part of the catalytic site of various enzymes (Sigel and McCormick, 1971). Copper (II)-histidine in blood has a key role in copper transportation and availability for cells and tissues (Deschamps *et al.*, 2005). Dysregulation of copper metabolism leads to various diseases. The transport properties of copper (II)-histidine complex ($[\text{Cu}(\text{His})_2]$) led to its application with success in the treatment of Menkes disease that was considered lethal in the first

decade of life (Deschamps *et al.*, 2005). This neurodegenerative disorder consists in a deficient absorption of copper (II) due to an inherited genetic dysfunction of the *ATP7A* gene which codes for a transmembrane protein acting as a copper transporter (Datta *et al.*, 2008). There was no cure for Menkes disease until mid-seventies when Deschamps *et al.*, (2005) showed that early treatment by intravenous injection of copper (II)-histidine complex can greatly increase life expectancy and delay neurodegeneration (Danks *et al.*, 1972; Sigel and McCormick, 1971). Furthermore, it has been reported that sub-cutaneous administration of copper (II)-histidine is probably effective in the treatment of infantile hypertrophic cardioencephalomyopathy (Freisinger *et al.*, 2004), a fatal disease related to a deficit of the copper-enzyme cytochrome c oxidase. However, injectable daily administration of this complex complicates its use and alternative routes of administration are desirable. For instance, in case of cardioencephalomyopathy, the intestinal *ATP7A*-mediated absorption of copper is not affected; consequently an oral copper administration may be beneficial. Therefore, the isolation of copper (II)-histidine in solid state may be useful for a better oral formulation and for transdermal administration in various copper-related diseases.

L-Serine (Ser) is a non-essential amino acid that can be synthesized by many cells except some cell types, such as neuronal and glial cell subpopulations that rely on the uptake of Ser to support their survival and development (Pecul, 2006). Copper complexed with Ser could be uptaken by cells through Ser transporters in situations of downregulated copper transporters. Urea is an endogenous product of the catabolism of proteins and amino acids, and is present at different concentrations in blood and various organs (Duchesne *et al.*, 2001). Under physiological conditions, urea was shown to act as an antioxidant and as a cardioprotective agent (Wang *et al.*, 1999). Biuret is often used together with urea in animal feeding as an excellent non-protein nitrogen additive having a better palatability compared to urea (Currier *et al.*, 2004). It contains two acylamino groups and one imino group, a structure compatible with its use as a neutral ligand in various complexes mostly for structural studies or bioanalytical applications (i.e. biuret dosage of proteins). Complexes of rare earth metals (Wang *et al.*, 2016), actinide metals (Yingli *et al.*, 1986; Raptis *et al.*, 2000), and alkaline earth metals (Wang *et al.*, 2016; Raptis *et al.*, 2000) based on urea or biuret ligands have been described. However, the complexes of transition metals such as copper with these ligands have been rarely reported (Pop *et al.*, 2002).

This study describes the preparation and characterization of four low molecular weight copper complexes: $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ with special emphasis given to aspects related to the stability of these complexes in physiologically relevant media, to their potential antioxidant activity and to their biocompatibility with neuronal cells in view of their eventual use in the treatment of

neurological diseases. Furthermore, study of these complexes may help to improve chelation therapy for copper dysfunctions and to better understand copper metabolism in human.

3.4 Experimental Procedures

3.4.1 Synthesis of copper complexes

All chemicals were reagent grade and were used without further purification. Copper complexes were prepared in isopropanol following Pop *et al.*'s procedure (Pop *et al.*, 2002). The copper (II)-histidine complex was prepared using an 1:2 molar ratio of CuCl₂:His and a 50:1 v/v isopropanol:H₂O solution. A cold solution (400 mL) of CuCl₂ (1.93×10^{-3} mol/L) in isopropanol was added dropwise to an equal volume of aqueous His solution (3.84×10^{-3} mol/L) at pH 6.8, and the mixture was continuously stirred on ice during 45 min. The complexation was done in isopropanol to facilitate the recovery of copper-histidine which precipitates in these conditions. The resulting solid was collected by filtration, washed with cold isopropanol and dried at ambient temperature. The copper-urea and copper-biuret complexes were prepared similarly but using an 1:4 molar ratio of CuCl₂:ligand. The copper-serine complex was prepared in ethanol using an 1:2:1 molar ratio of CuCl₂:L-Ser:NaOH. A cold solution (15 mL) of CuCl₂ (2.64×10^{-2} mol/L) in ethanol was added dropwise to a solution of 30 mL Ser (5.19×10^{-2} mol/L) in ethanol containing sodium hydroxide (0.01 mol/L). The mixture was stirred on ice during 30 min, and the resulting solid was filtered, washed with ethanol and dried at room temperature.

3.4.2 Structural characterization

The content of carbon (C), hydrogen (H) and nitrogen (N) was determined by the Dynamic flash combustion method which is based on complete oxidation of samples, using an EAS1108 (Fisons instruments SpA) and an ECS4010 (Costech Co. California. USA). Melting points were measured using open capillary tubes on a Gallenkamp melting point apparatus (London, England). Analysis by X-ray diffraction was done with a Bruker X8 Venture Metal jet diffractometer (Geesthacht, Germany). The experimental parameters for X-ray analysis are presented in Table A 3.1 (supplementary data). Single crystals were obtained by slow evaporation of alcoholic solution of copper complexes during 3 days. The crystals were kept at 100 °K during data collection.

The samples were exposed to GaK α X-rays with a wavelength of 1.34 Å and analyzed at an angular range of 2 θ from 10 to 121 degrees. The structure was solved using the Olex2 software (Dolomanov *et al.*, 2009), with the SHELXT structure solution program (Sheldrick, 2008) using Direct Methods and the SHELXL (Sheldrick, 2015) refinement package with the Least Squares minimization method. Data collection and

refinement parameters are presented in section 3.2. The infrared (IR) spectra of the complexes and of their ligands were recorded on a Thermo-Nicolet 6700 (Madison WI USA) FTIR spectrophotometer ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) by using potassium bromide pellets (2%).

3.4.3 Stability in different media

3.4.3.1 Spectrophotometric measurements

Solutions of 20 or 40 mM of His, Ser, Urea, Biuret and their copper (II) complexes were prepared in water, in physiological saline (0.9% NaCl), Simulated Gastric Fluid (SGF: 0.26% HCl, 0.2% NaCl, pH 1.2) and in Simulated Intestinal Fluid (SIF: 0.68% KH_2PO_4 , 0.0615% NaOH, pH 7.2). The absorbance spectra (360-960 nm) were taken after 2 h of incubation at room temperature. Time stabilities of the complexes were investigated by measuring the absorbance values at 37 °C and constant wavelengths, from 0 to 48 h. Measurements were done using a Visible Ultrospec 100 Pro (USA) Spectrophotometer.

3.4.3.2 Electrochemical measurements

A sealed three necked flask was used for electrochemical measurements. The working electrode was a 3 mm diameter glassy carbon electrode (BASi), the reference electrode was a NaCl saturated Ag/AgCl electrode and the counter electrode was either copper wire or platinum mesh (AlfaAesar). The electrochemical solutions contained copper complexes freshly prepared in physiological saline (0.9% w/v NaCl in deionized water) and were purged by argon for 5 min. All measurements were carried out under argon atmosphere.

3.4.4 Antioxidant capacity

3.4.4.1 DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) colorimetric method

The DPD reagent was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reactive oxygen species (ROS) were generated by electrolysis (10 mA, 400V, 3 min; Jackson *et al.*, 1986) of 3 mL of modified Krebs-Henseleit (KH) buffer solution (in mM: NaCl 118, KCl 4.8, CaCl_2 1.8, MgSO_4 0.86, KH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 2.54, glucose 11 and EDTA 0.027). The electrolysis cell contained 2.7 mL of KH buffer in the presence of 0.3 mL of different concentrations of the copper complex or ligand. A volume of 0.2 mL of the electrolyzed (ELS) solution (ELS KH buffer + complex or ligand) was then added to 0.8 mL of 25 mg/mL DPD solution. The electrolysis-generated ROS react rapidly with DPD forming an oxidation product with a specific absorbance at 515 nm (Wang *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1984).

In the presence of antioxidant molecules, ROS may be neutralized and thus unavailable to react with DPD. The antioxidant capacities of ligands and complexes were expressed as a percentage of ROS still remaining in the ELS solution and was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ ROS} = A_{\text{sample}} / A_{100\% \text{ ROS}} \times 100$$

where $A_{100\% \text{ ROS}}$ is the absorbance of ELS KH buffer containing DPD (100% amount of ROS in solution) and A_{sample} is the absorbance of ELS KH buffer containing DPD and in the presence of the copper complex or ligand.

3.4.4.2 DPPH (1,1-Diphenyl-2,2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity

DPPH is a stable free radical (DPPH•) characterized by an absorption band at about 517 nm. In the presence of a substance that can donate a hydrogen atom, DPPH is reduced by losing its violet colour. The DPPH assay was performed in conditions of Marinova *et al* (2011). The DPPH reagent was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A solution of 0.5 mM DPPH was prepared and its absorbance was approximately 0.7 at 517 nm. A volume of 0.2 mL of sample (copper (II) complexes or ligands) was added to 1.8 mL of DPPH solution. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm. The percentage of scavenged DPPH radical was calculated as follows:

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} = (A_{\text{br}} - A_{\text{ar}}) / A_{\text{br}} \times 100$$

where A_{br} is the absorbance before reaction and A_{ar} is the absorbance after reaction with the antioxidant (complex or ligand).

3.4.5 Neuronal cell culture and treatment

Mouse P19 embryonic stem cells were differentiated to neurons by exposure to 0.5 μM *all-trans*-retinoic acid for 4 days (Ducharme *et al.*, 2010; Maltais *et al.*, 2003). On day 4, an amount of 3.8×10^5 neurons were seeded in gelatinized 12 well-plates containing supplemented Neurobasal (SNB) medium [Neurobasal containing 2% v/v B27 supplement (Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada), 0.5 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 U/mL streptomycin]. Neuron treatment with His, Ser, urea or biuret ligands as well as with their copper (II) complexes and CuCl_2 began on day 4, concomitantly with cell seeding into the SNB medium. The eight studied agents (ligands and corresponding Cu (II) complexes) were freshly solubilized in phosphate buffer saline (PBS) as 10-fold concentrated stock solutions and added individually to the culture medium at the indicated final concentrations. After 48 h of incubation (37°C, 5% CO_2), cultures were analyzed for cell viability. Control cultures contained only the cells in SNB medium.

3.4.6 Cell viability

Cell viability was determined by the Neutral Red (NR) uptake assay as recently described (Gomez Perez *et al.*, 2017). One mL of freshly prepared NR solution (138 μ M in 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM D-glucose, pH 7.2) was added to each culture well pre-washed delicately with PBS. After 2 h incubation (37°C, 5% CO₂), NR solution was removed and cultures were washed rapidly with 1% formaldehyde-1% calcium chloride. Then, 1 mL of NR eluent (EtOH:H₂O:acetic acid 50:49:1) was added to extract the NR from cells. After 10 min agitation at room temperature, the absorbance was read at 540 nm using an ELX800 UV universal microplate reader. The 100% viability was established with control (untreated) cultures. Assays were done in duplicate using three independent cell cultures.

3.5 Results and discussion

3.5.1 Chemical analysis of copper complexes

The elemental analysis of copper complexes prepared in isopropanol as well as their physical properties (color, molecular weight and melting point) are presented in Table 1. The results of elemental analysis as well as the proposed chemical formula were in good agreement with the expected stoichiometry (Table 3.1). The melting points of copper complexes were similar to those of previous investigations (Mandal *et al.*, 2015; Sigel and McCormick, 1971). The chemical formula of [Cu(Ser)₂] complex was corroborated by mass spectroscopy (data not shown). In dry phase (as powders), the complexes are stable in air, easily soluble in water, and insoluble in alcoholic media.

Tableau 3.1 Analytical and physical data of the Cu (II) complexes of Ser, His, Urea and Biuret

Compound	Formula	Elemental analysis ^a			Color	MW ^b g/mol	MP °C
		% Found (% Calc.)					
		C	H	N			
[Cu(His) ₂ Cl ₂]	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ CuN ₆ O ₄	32.64 (32.34)	3.96 (4.05)	17.96 (18.29)	Light blue	444.00	185 ± 1.6
[Cu(Ser) ₂]	C ₆ H ₁₂ CuN ₂ O ₆	26.28 (26.49)	4.35 (4.46)	10.08 (10.33)	Navy blue	271.72	186 ± 0.6
[Cu(Urea) ₂ Cl ₂]	C ₂ H ₈ Cl ₂ CuN ₄ O ₂	9.33 (9.42)	3.23 (3.14)	21.61 (21.99)	Blue-green	254.56	161.6 ± 2.3
[Cu(Biuret) ₂ Cl ₂]	C ₄ H ₁₀ Cl ₂ CuN ₆ O ₄	14.49 (14.11)	2.98 (2.94)	25.02 (24.67)	Blue-green	340.61	171.6 ± 1.1

^aThe calculated values of elemental analysis are given in parentheses. ^bThe MW were determined from the formula calculated from elemental analysis. MP, melting point.

3.5.2 X-ray crystal structure of copper complexes

Only [Cu(Ser)₂] and [Cu(Urea)₂Cl₂] generated adequate crystal for X-ray analysis. The [Cu(His)₂] and [Cu(Biuret)₂Cl₂] data were from references Deschamp *et al.*, (2004) and Freeman *et al.*, (1959), respectively. The X-ray structural analysis of single crystals of [Cu(Ser)₂] complex revealed two serine molecules each bound to the copper ion in a bidentate manner (Figure 3.1A). In amino acids with non-coordinating side chains, the more common mode of coordination is bidentate chelation (Harding, 2004).

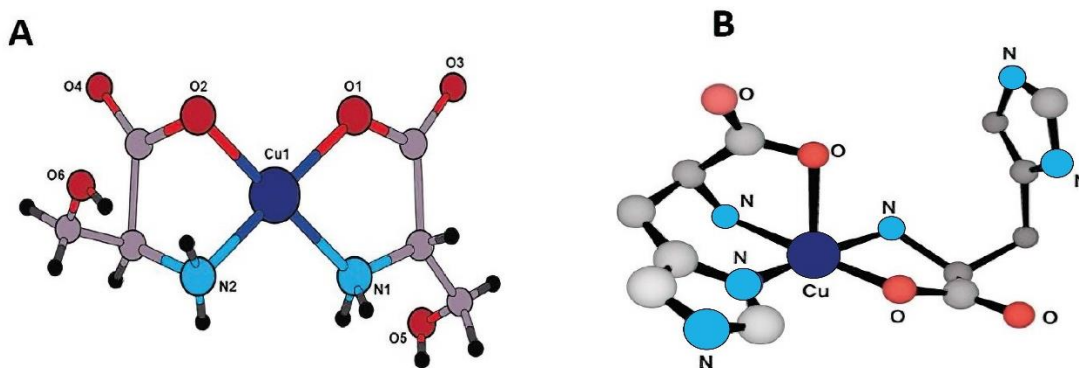


Figure 3.1 Structure of [Cu(Ser)₂] bidentate obtained from crystal X-ray diffraction (A) and of tridentate [Cu(His)₂] complex as elucidated by Gala *et al.*, (2014)

The structure of [ML₂] species showed that two amino nitrogen (N_{am}) and two carboxyl oxygen (O_{carboxyl}) are coordinated to the copper (II) ion (Figure 3.1A). The mode of coordination around the copper (II) center is a square pyramid that gives rise to the more thermodynamically stable five-membered chelate rings (Figure 3.1A). The length values of the Cu-O (1.97 Å) and Cu-N (2.00 Å) bonds in this study are in good agreement with the previously published theoretical values for this complex (Jeon *et al.*, 2005; Mandal and Askari, 2014). According to the elemental analysis (Table 3.1), chloride atoms are not present in structure of [Cu(Ser)₂] complex, differing from the other copper complexes of this study. This could be due to several factors influencing the structural arrangement, including metal-ligand bond strength, stereochemistry of the complex and proton displacement reactions (Bonamartni Corradi, 1992).

In the case of [Cu(His)₂Cl₂] prepared in conditions similar to those described for [Cu(Urea)₂Cl₂] by Pop *et al.*, (2002), we did not obtain single crystals. However, the X-ray patterns of our preparation showed structures similar to those of other related complexes previously described (Bujacz *et al.*, 2010; Deschamp *et al.*, 2004).

A neutral five-coordinated complex ($[\text{Cu}(\text{His})_2]$) was described by Deschamps *et al.*, (2004). This study proposed a distorted square pyramidal geometry with bidentate and tridentate L-histidine ligands (Figure 3.1B). On the other hand, the crystal X-ray diffraction structure of another $[\text{Cu}(\text{His})\text{Cl}_2]$ complex obtained by Bujacz *et al.*, (2010) showed copper coordinated (semi-coordination) by one histidine only, in a bidentate manner involving the carboxyl ($\text{O}_{\text{carboxyl}}$) and the amine (N_{am}) from the main chain group of His. Two additional chloride anions completed the square coordination of the central Cu^{2+} . The structures reported by Bujacz *et al.*, (2010) and Deschamps *et al.*, (2004) are not in agreement with the chemical formula ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{CuN}_6\text{O}_4$) found from elemental analysis in the present study. We have obtained a different copper histidine complex consistent with two molecules of His and two atoms of chloride bound to the central Cu^{2+} cation as $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$.

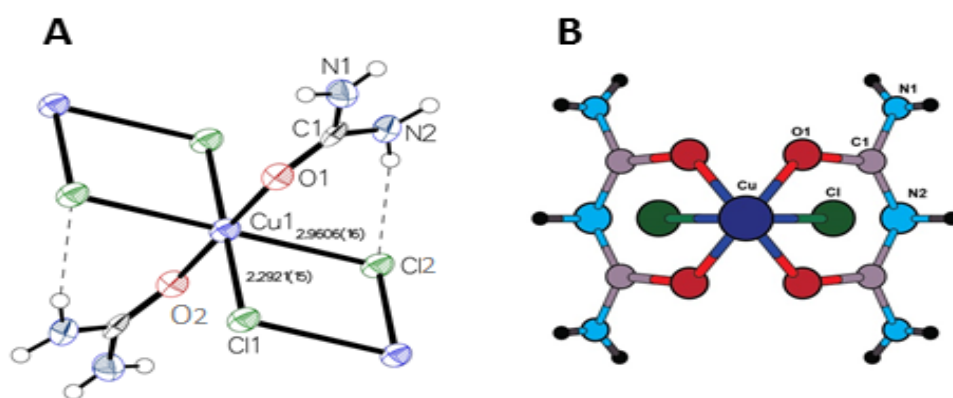


Figure 3.2 Structure of $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ obtained from crystal X-ray diffraction (A) and molecular structure proposed for $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ complex (B)

The crystallographic investigation of the urea complex, $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$, revealed a chain structure, with the chloride ions acting as bridges as shown in Figure 3.2A. The Cu (II) ions are hexacoordinated by two chloride bridges and by the oxygen atoms from two urea molecules, showing an elongated octahedral stereochemistry. The apical positions seem occupied by two semi-coordinated chloride bridging ligands ($\text{Cu1-Cl1} = 2.96 \text{ \AA}$); the equatorial plane consists of two urea ligands and two chloride bridges ($\text{Cu1-Cl1} = 2.29 \text{ \AA}$) (Table 3.2).

Tableau 3.2 Bond lengths for [Cu(Urea)₂Cl₂]

Atom	Atom	Length (Å)
Cu1	Cl1 ¹	2.9605(16)*
Cu1	Cl1	2.2921(15)
Cu1	Cl1 ²	2.9605(16)
Cu1	Cl1 ³	2.2921(15)
Cu1	O1	1.955(4)
Cu1	O1 ³	1.955(4)
O1	C1	1.262(8)
N1	C1	1.324(8)
N2	C1	1.345(9)

* The numbers in parentheses in this column refer to the unit cell defined by Bernal and Fowler (1933).

The Cu1-Cl1 distance (2.96 Å) seems too large for a covalent binding ($r_{\text{Cl}} = 0.99 \text{ \AA}$) and is more consistent with an ionic bonding ($r_{\text{Cl}^-} = 1.84 \text{ \AA}$, $r_{\text{Cu}^{2+}} = 0.81 \text{ \AA}$) (Bujacz *et al.*, 2010). Although urea has two potential electron donor atoms in its structure ($\text{O}_{\text{carbonyl}}$ and N_{am}), copper is frequently coordinated only through the oxygen atom in a monodentate pattern and the C=O--M angle is often smaller than 180° (Theophanides and Harvey, 1987; Gangopadhyay *et al.*, 2016). To the best of our knowledge, the crystal structure ascribed to [Cu(Urea)₂Cl₂] is novel.

As for [Cu(His)₂Cl₂], the crystallisation of [Cu(Biuret)₂Cl₂] has not been successful in isopropanol. Therefore, a possible structure for this complex is proposed (Figure 3.2B) on basis of the crystal X-ray diffraction previously described by Freeman *et al.*, (1959), which is in accordance with our elemental and FTIR analyses (Table 3.1 and cf. section 3.5. 3 below). In the [Cu(Biuret)₂Cl₂] complex, the copper atom has a coordination number 6 and a tetragonally distorted octahedral environment (Freeman *et al.*, 1959) Its binding to the four oxygen atoms of ligands is covalent, as indicated by the Cu-O bond lengths while the Cu-Cl distances revealed ionic bonding between Cl⁻ and Cu²⁺ ions, similar to those found for urea copper complexes (Freeman *et al.*, 1959). The biuret molecules act as bidentate chelates via their oxygen atoms (Freeman *et al.*, 1959). The coordination data and structural features of the four copper (II) complexes are summarized in Table 3.3.

Tableau 3.3 Structural features of the first coordination shell of copper for the four copper (II) complexes

Complexes	Coordination binding	Involved atom	Distance Cu–X (Å)	Reference
[Cu(His) ₂ Cl ₂]	Tridentate	N _{am} N _{im} O _{carboxyl}	2.003 1.984 2.277	Deschamps <i>et al.</i> , 2005*
[Cu(Ser) ₂]	Bidentate	N _{am} O _{carboxyl}	2.001 1.972	This work
[Cu(Urea) ₂ Cl ₂]	Monodentate	O _{carbonyl}	1.955	This work
[Cu(Biuret) ₂ Cl ₂]	Bidentate	O _{carbonyl}	1.982	Gangopadhyay <i>et al.</i> , 2016

3.5.3 FTIR characterization of copper complexes and ligands

FTIR pattern of [Cu(His)₂Cl₂] showed changes in the positions and profiles of some bands compared to that of free His (Figure 3.3 A,B). Generally, in amino acids, NH stretching vibration is observed in 3130-3030 cm⁻¹ region (El Khoury and Hellwig, 2009). Theoretically, in metal complexes, their NH stretching vibration (νNH_3^+) should disappear due to coordination (Wilson *et al.*, 1970). In the metal complexes, however, a band was observed at 3300 cm⁻¹, which could arise from other vibrations appearing in this region (Prenesti and Berto, 2002). Free His shows the antisymmetric COOH stretching frequency at 1634 cm⁻¹(Figure 3.3B), and [Cu(His)₂Cl₂] exhibits this band at 1616 cm⁻¹ (Figure 3.3A). This shift in the stretching frequency is consistent with the findings of Sarkar and Wigfield (Sarkar and Wigfield, 1967) who observed a similar shift for [Cu(His)₂] and other Cu (II)-amino acid complexes. These results indicate the participation of the amino acid groups in copper coordination and the tridentate chelation pattern of [Cu(His)₂Cl₂] complex.

Figure 3.3 (C,D) shows the FTIR spectra for [Cu(Ser)₂] and serine. The bands between 3444 and 3259 cm⁻¹ assigned to the NH stretching vibration in the spectrum of the amino acid are observed almost at the same respective frequencies in the [Cu(Ser)₂] spectrum. The NH stretching vibration bands of Ser (at 3346 and 3258 cm⁻¹ respectively) are shifted to higher wavenumbers (3481–3398 cm⁻¹) in metal complex (Mandal, 2014). These results clearly suggest deprotonation of the NH₃⁺ group of the Ser molecule and binding to the metal ion through its nitrogen atom (Herlinger, 1970). On the other hand, the Ser absorption bands at 1640 and 1601 cm⁻¹ (corresponding to the C=O stretching bond) are shifted to the lower wavenumbers (1631 and 1587 cm⁻¹) in the [Cu(Ser)₂] spectrum. Moreover, the symmetric (M-N) stretching band appearing at 523 cm⁻¹ in this study is in agreement with previous studies (Mandal, 2014). Altogether, these observations indicate that Ser binds the metal ion via its carboxyl and amino groups.

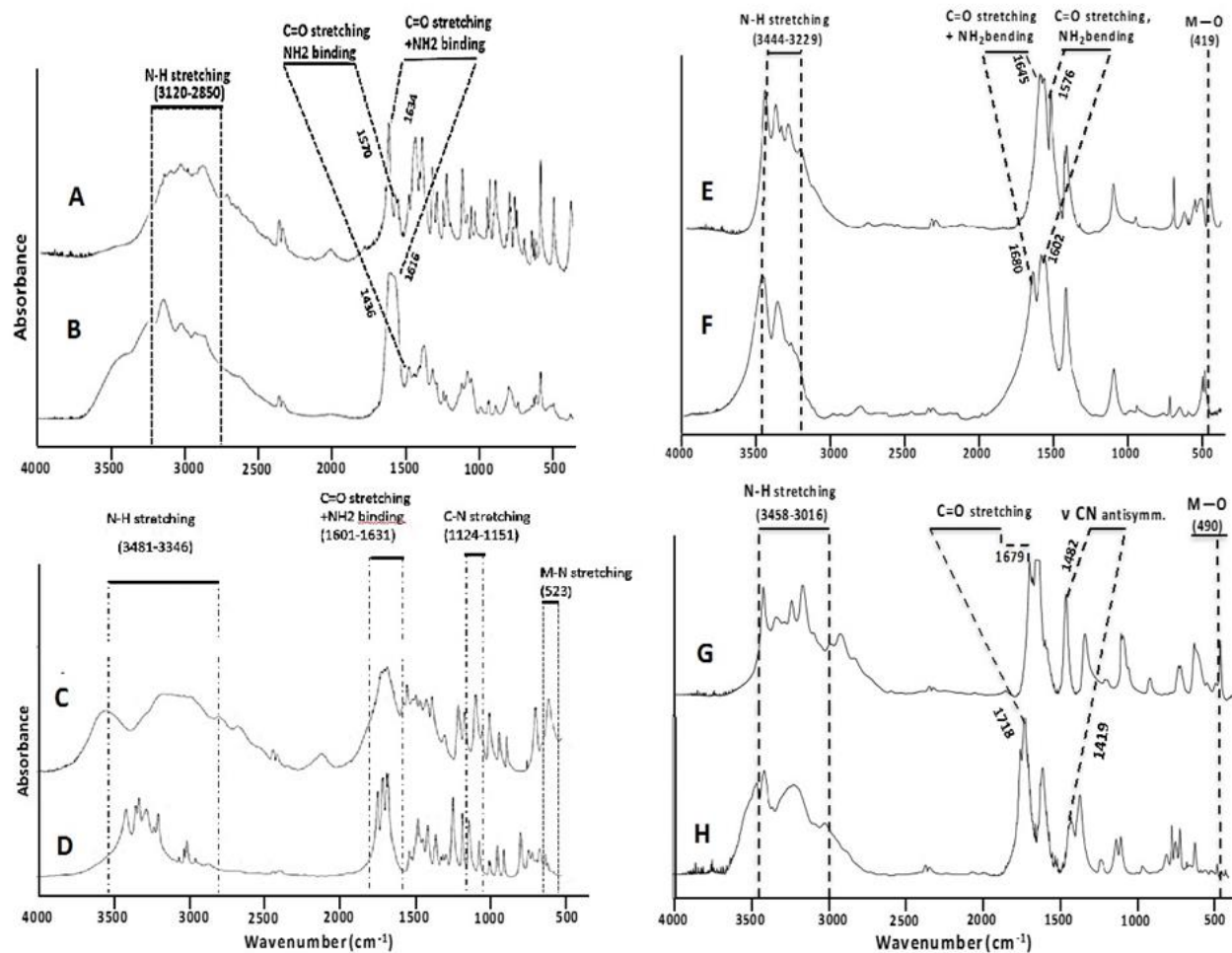


Figure 3.3 FTIR spectra of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ (A), His (B), $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ (C), Ser (D), $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ (E), urea (F), $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ (G) and biuret (H) in the wavenumber range of 4000–400 cm^{-1}

Figure 3.3 (E,F) presents the FTIR spectra obtained for urea and $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$. The bands between 3444 and 3259 cm^{-1} assigned to the NH stretching vibration in the spectrum of urea are observed almost at the same respective frequencies in the $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ spectrum. However, the intense absorption bands for urea at 1680 and 1602 cm^{-1} , corresponding to the C=O stretching and to the NH_2 bending vibrations, are shifted to lower frequencies (1616 and 1576 cm^{-1}) in the spectrum of the complex. This may indicate a possible implication of oxygen from the carbonyl group of urea in the coordination with copper (II) ions (Theophanides and Harvey, 1987). This is also supported by the 419 cm^{-1} band corresponding to M-O vibration (Gangopadhyay *et al.*, 2016; Wang and Chen, 2016) in $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ spectra.

The FTIR spectra of biuret and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ complexes are shown in Figure 3.3 (G,H). The bands ascribed to the NH stretching vibration observed in the $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ spectrum are similar but not

identical to the bands in the range of 3458-3016 cm^{-1} observed in the spectrum of free biuret. This might indicate that probably not all nitrogens are involved in the formation of the complex. A symmetric vibration frequency of C=O stretching appears near 1718 cm^{-1} in the biuret spectrum (Figure 3.3H). When coordination occurs, a shift of the C=O stretching mode to lower wavelength was reported (Wang and Chen, 2016) indicating that coordination could be produced with participation of the oxygen (Theophanides and Harvey, 1987). In fact, a vibration band in the $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ complex was detected at 1679 cm^{-1} (Figure 3.3H). As in the case of $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ complex, the presence of a 490 cm^{-1} band ascribed to M-O vibration suggests the participation of oxygen in a coordinative complexation between biuret and copper (II) ion fitting well previous data of Wang and Chen (2016). Overall, the FTIR results are in accordance with the structures depicted (Figur. 3.1 and 3.2).

3.5.4 Stability of copper complexes in physiologically-relevant media

Evaluation of the stability of copper complexes in physiologically relevant conditions will help in the design of their pharmaceutical formulations. As oral administration of copper complexes will be eventually sought in treatment of cardioencephalomyopathy and in Menkes disease, it was of interest to explore their stability in conditions simulating the gastric and intestinal system. Absorbance spectra and cyclic voltammetry were used as indications of structural conformation of studied complexes in various media. Figure 3.4 shows the UV-Vis spectra of the copper (II) complexes incubated for 2 h, at room temperature, in H_2O , SGF (pH 1.2), SIF (pH 7.2), and in physiological saline solution 0.9% NaCl (pH 7.2).

3.5.4.1 Stability at room temperature

The spectra of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ in H_2O , in physiological saline (0.9% NaCl) and in SIF showed maximal absorption at 620-640 nm (Figure 3.4A). The absorption in SIF was about twice than that observed in H_2O and in 0.9% NaCl, which could be attributed to the changes of pH. The addition of 20 mM copper (II)-histidine in H_2O or in 0.9% NaCl media decreased the pH to about 5.32 whereas the final pH of the complex in SIF was 6.8, probably due to better buffering capacity.

According to Deschamps *et al.*, (2005), distribution of the copper (II) histidine species differs as a function of pH. For instance, $[\text{MHL}_2]$ was found at pH 5 and below whereas $[\text{ML}_2]$ is found at pH 7. When the pH value is low ($\text{pH} \leq 5$), the nitrogen of imidazole group (similarly to carboxyl) is protonated and thus it is no more involved in binding to copper (II); therefore 50% or more of copper may be unbonded. The presence or absence of the hydrogen atom would have influence on the absorbance properties. In SGF, absorption was maximal at 750 nm probably due to unbonded copper in view of Deschamps *et al.*, (2005) suggesting that at $\text{pH} \leq 3.7$ most of the remaining ligand is unbound. At physiological pH, the major

structure proposed for $[\text{Cu}(\text{His})_2]$ in aqueous solution was $[\text{ML}_2]$ (Deschamps *et al.*, 2005). Upon increase of pH ($\text{pH} > 7$), the amine group is deprotonated to give a negatively charged ligand, and the addition of HO^- or the ionization of pyrrole-like nitrogen in the imidazole group may induce the complex to adopt, in basic medium, a $[\text{ML}_2(\text{OH})]$ form which in our case may be $([\text{Cu}(\text{His}_2\text{OH})])$.

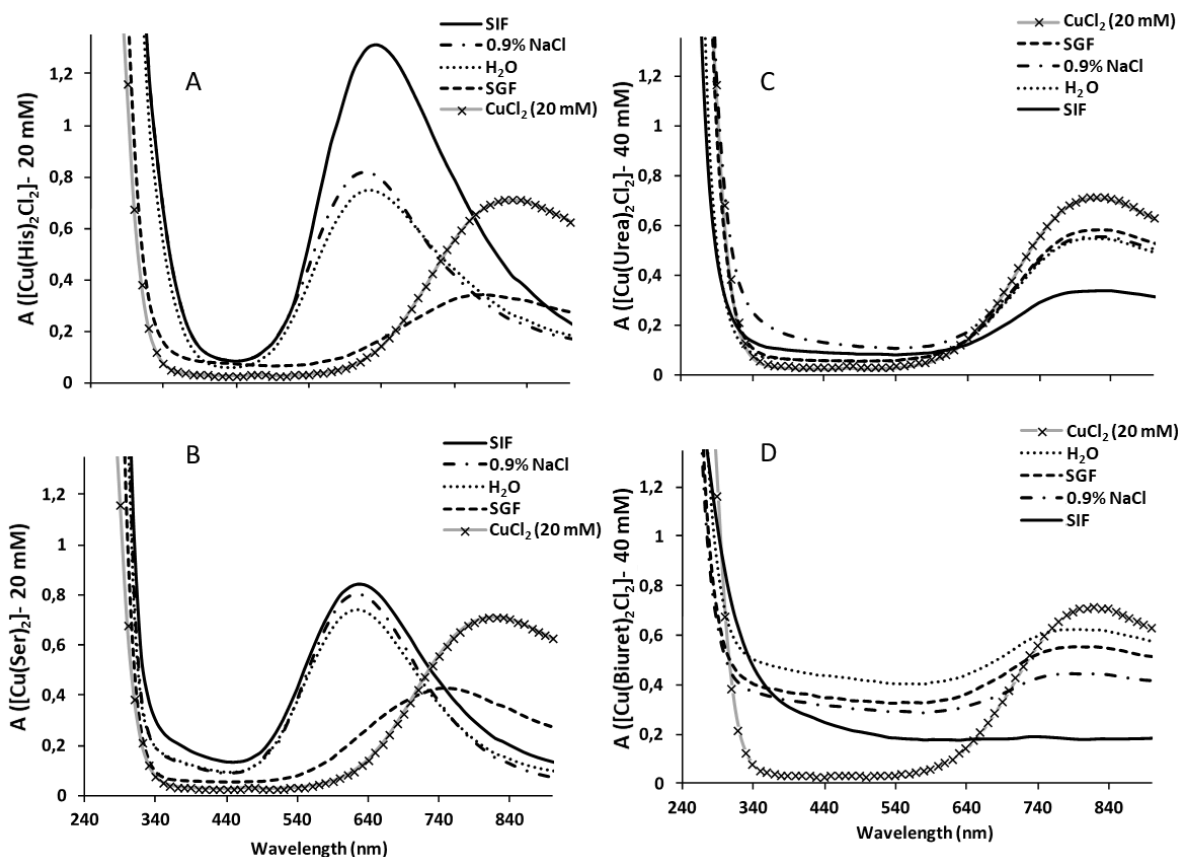


Figure 3.4 UV-Vis absorbance spectra of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ [A], $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ [B], $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ [C], and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ [D] in different physiologically-relevant media: H_2O , 0.9% NaCl (pH 7.4), SGF (pH 1.2), and SIF (pH 7.2), after 2 h at room temperature. The spectrum of aqueous solution of CuCl_2 is included for comparison

The addition of $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ did not change the pH of the four media. The spectra of this complex were similar in H_2O , NaCl 0.9%, and SIF with maximal absorption at 630 nm (Figure 3.4 B). However, in SGF, similarly to copper (II) histidine, the maximal absorption was at 750 nm, which could be attributed to protonation of coordinating groups and eventually to unbonded copper.

The $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ complexes showed a strong band in the visible light, similarly to amino acid copper complexes in acidic conditions. These data fit well those of Bonamartni Corradi (1992). The $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ spectra (Figure 3.4C) were similar in H_2O , 0.9% NaCl (neutral) and in acidic SGF, with maximal absorption at 810 nm. In SIF, the maximal absorbency was slightly shifted to 830 nm and with a

markedly lower signal intensity (about 50% from that in 0.9% NaCl) probably due to the presence of phosphate in SIF which can form a precipitate by the displacement of the two chloride anions generating copper (II) urea phosphate complex (Naumov *et al.*, 2001). Similarly, the spectra of $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ (Figure 3.4D) in H_2O , 0.9% NaCl and SGF exhibited maximal absorption at 810 nm and with various intensities of the signal in each medium. In SIF, the formation of a green precipitate was observed with $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$, which may explain the disappearance of the signal at 810 nm. An absorption still observed in the 800-830 nm region (copper region) suggests a degradation of the complex and the presence of free copper ions.

3.5.4.2 Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry measurements of each complex were carried out in physiological saline. Each complex (2 mM) showed a quasi-reversible response (Figure 3.5). A background voltammogram in physiological NaCl saline (Figure 3.5A) without the presence of a complex is shown for reference. The onset of the reduction, and mid-potential value of CuCl_2 , $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ are quite similar, suggesting a small difference in their reduction potential (Figure 3.5B). When compared with CuCl_2 , urea and biuret copper complexes, the onset of reduction of both $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ and $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ is cathodically shifted, and displays weakly defined peak current values making assignment of a mid-potential value difficult (Figure 3.5C). If the onset of reduction of each of the complexes is taken as an indication of stability, then based on the results from voltammetric measurements $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ and $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ have higher stabilities when compared with CuCl_2 , $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ (Daniele and Pena, 1993), in accordance with absorbance profiles.

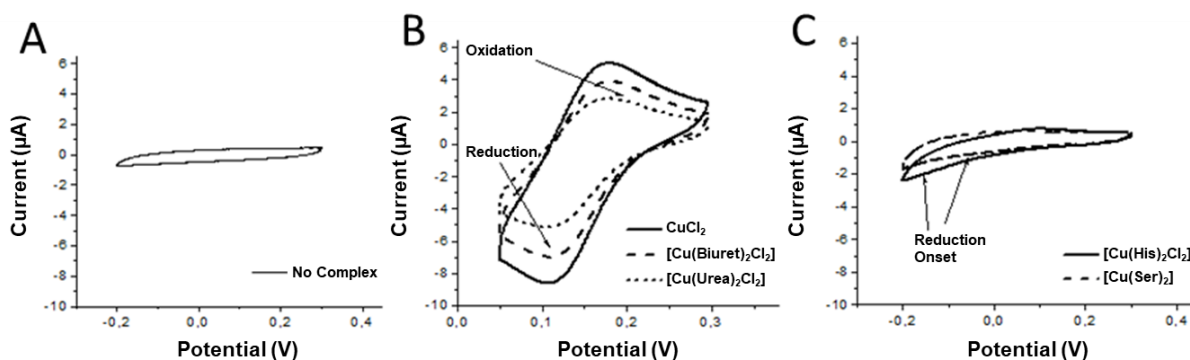


Figure 3.5 Cyclic voltammetry measurements of (A) background response of glassy carbon electrode (blank), (B) CuCl_2 (control), $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ and (C) $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ and $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, in physiological NaCl saline. A saturated Ag/AgCl reference electrode and a scan rate of 20 mV/s was used for all measurements

According to Deschamps *et al.*, (2005), the tridentate ligation confers greater stability compared to bidentate and monodentate ligations. Although the mode of coordination of Ser around copper (II) center is bidentate, the relative stability of the serine complex compared to that of the urea and biuret complexes could result from the thermodynamically stable five-membered chelate ring architecture. The differences in $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ spectra are due to the distribution of the copper (II) histidine species at different pH values (Deschamps *et al.*, 2005).

3.5.4.3 Stability at 37°C.

The stability of the copper complexes in the different media was also evaluated by absorbance over 48 h at the physiological temperature of 37 °C (Figure 3.6). The absorption values at 630 nm of the histidine copper complex (Figure 3.6A) in SIF, in water and in 0.9% NaCl were similar: the values gradually decreased with time up to 24 h and then remained constant. The absorption value in SGF was constant and low throughout the whole period. The absorption values of the serine copper complex (Figure 3.6B) at 620 nm were similar in H₂O and 0.9% NaCl and constant up to 48 h. In contrast, the absorbance in SIF decreased rapidly from 1 to 0.3 after 2 h (probably due to the phosphate ions). The absorbance value was low initially and remained low during the whole interval up to 48 h, indicating a lower stability of $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ in SIF at 37 °C compared to room temperature.

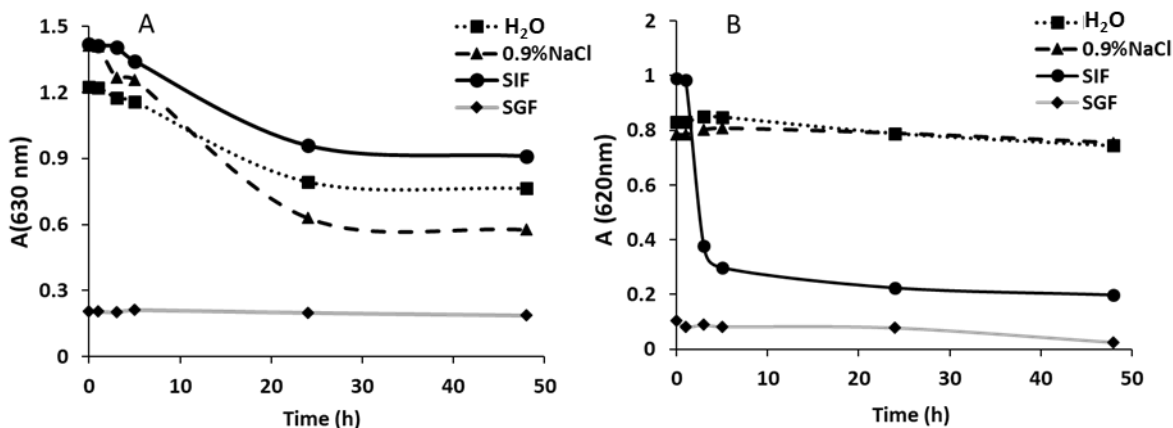


Figure 3.6 Time course of absorbance values of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ (A) and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ (B) complexes at their λ_{max} and 37 °C, and in different physiologically-relevant media (20 mM final concentration).

Readings were taken at 0, 1, 2, 3, 5, 10, 24 and 48 h, and values are presented as means of three separate determinations. The 360-960 nm individual absorbance spectra are given in Figure A 3.1, in Supplemental data

In the case of the urea and biuret complexes, the spectral profiles at 37°C (Figure A1 in Supplementary data), like those at room temperature (Figure 3.4), showed maximal absorbencies at 810-830 nm due to free

copper (II). It was not surprising that the absorbances at this wavelength range remained almost constant in view of the instability of these complexes (Supplementary data, Figure A 3.2).

In conclusion, compared to urea and biuret copper (II) complexes, the amino acid, His and Ser, copper (II) complexes presented relatively higher stability at room temperature as well as over 5 h at 37 °C. The highest stability was seen for copper (II)-serine in H₂O and 0.9% NaCl media.

3.5.5 *In vitro* Antioxidant Capacity

Given the complexity of oxidative processes and the diversified hydrophilic and hydrophobic nature of the antioxidants, there is no a unique well-defined method for quantitative measurement of antioxidant activity. In most cases it is necessary to combine the responses of different and complementary tests in order to have an indication of the antioxidant capacity of a sample (Huang *et al.*, 2005).

Practically, according to the reactions involved in the scavenging processes, the antioxidants can neutralize free radicals by two different mechanisms: Hydrogen Atom Transfer (HAT) and Single Electron Transfer (SET) (Wright *et al.*, 2001). HAT-based methods measure the ability of an antioxidant to scavenge free radicals by H-atom donation. SET-based methods measure the capacity of an antioxidant to transfer one electron to reduce an oxidant, often associated to a change of color (Jackson *et al.*, 1986; Niki and Noguchi, 2000). In the present study, the antioxidant capacities of the copper complexes and their ligands were evaluated by using two types of assays, the DPPH assay for the HAT mechanism and the DPD assay for the SET mechanism. The electrolysis of KH buffer (10 mA, 400 mV, 1 min) can generate ROS such as superoxide anion ($\bullet\text{O}_2^-$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) and their by-products: hydrogen peroxide (H₂O₂) and hypochlorite ion (ClO⁻) (Huang *et al.*, 2005). The generation of ROS is determined by the percentage of the oxidation of DPD. In the presence of the copper complexes or ligands, part of ROS may be scavenged leaving less of these species available to oxidize DPD.

Kohen *et al.*, reported that histidine and its derivatives having an imidazole group have an antioxidant activity due to hydrogen donation (Kohen *et al.*, 1988). [Cu(His)₂Cl₂] complex, at concentrations equal to or greater than 0.02 M, presented a higher scavenging activity than that of the ligand alone and of the other copper complexes (Figure 3.7A). Differently, serine and urea copper complexes presented ROS scavenging capacities close to that of their free ligand (Figure 3.7B,C). Interestingly, the antioxidant activity of [Cu(Biuret)₂Cl₂] was about twice that of its free ligand (Figure 3.7D) and about the same activity as that of urea and of [Cu(Urea)₂Cl₂]. The amide groups in the biuret and nitrogens of imidazole groups of His may act as efficient electron donating groups to neutralize ROS.

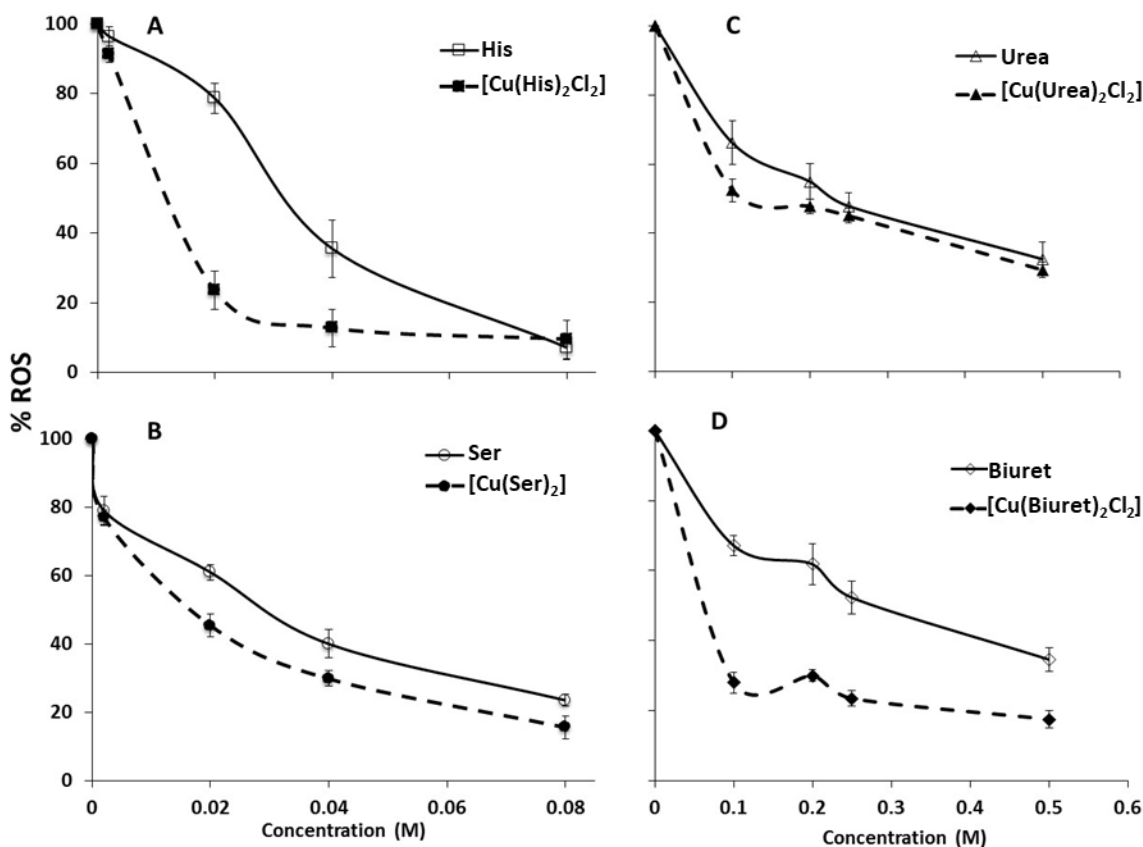


Figure 3.7 The ROS scavenging capacity of copper complexes and of free ligands determined by the DPD assay. The antioxidant capacities are inversely related to the percentages of remaining ROS after electrolysis of KH solutions in the presence of the indicated concentrations of copper (II) complexes or ligand. Notice the different concentration scales between A,B (0.002-0.08 M) and C,D (0.1-0.5 M). Values are presented as mean \pm SEM (n = 3)

The antioxidant capacity of copper (II) complexes and of their ligands were also evidenced by the DPPH assay which is recommended for compounds containing SH, NH and OH groups (Caillet *et al.*, 2011; Popovici *et al.*, 2009). Figure 3.8 shows that the eight compounds can scavenge DPPH \bullet . Among the amino acids and their copper complexes, [Cu(His) $_2$ Cl $_2$] exhibited the highest antioxidant capacity in comparison to histidine itself (Figure 3.8A) and to the other copper complexes and ligands (Figure 3.8 B, C, D). The Biuret and [Cu(Biuret) $_2$ Cl $_2$] (Figure 3.8D) also exhibited antioxidant capacity but at concentration 10 to 20-fold higher than those of [Cu(His) $_2$ Cl $_2$].

The ROS scavenging activities of [Cu(His) $_2$ Cl $_2$] and [Cu(Ser) $_2$] complex appear as concentration-dependent. Differently, in the case of [Cu(Urea) $_2$ Cl $_2$] and of [Cu(Biuret) $_2$ Cl $_2$], as for their ligands, there were two steps: an initial strong scavenging capacity exerted at low concentration (0-0.5 M) followed by another step when the scavenging capacity was almost maintained at high concentration (up to 5 M, Figure 3.8C,D).

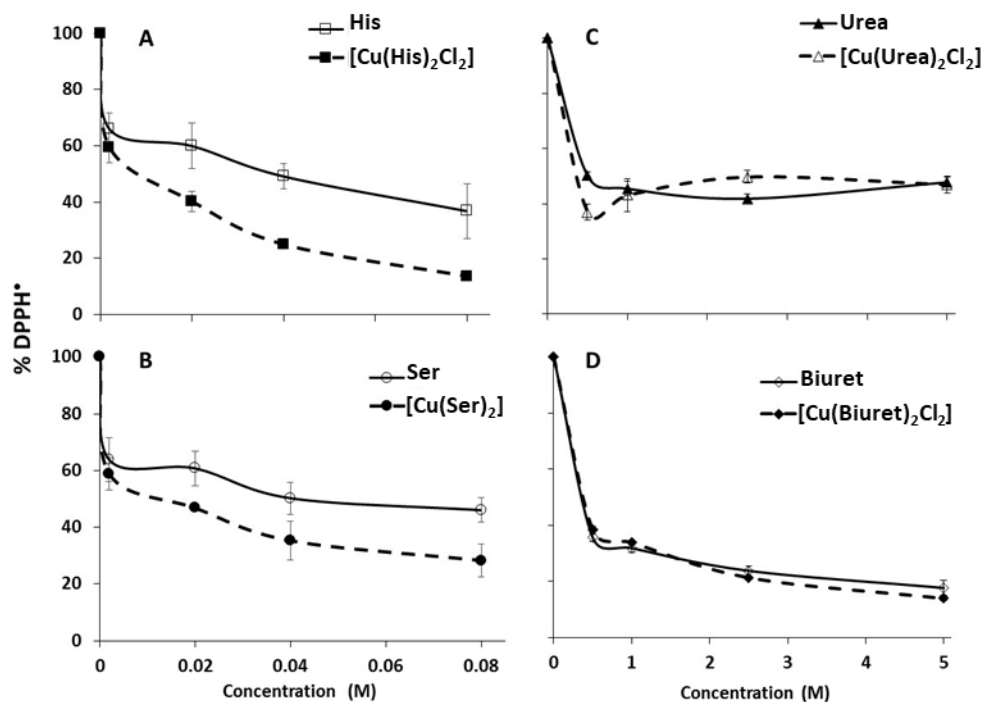


Figure 3.8 The free radical scavenging capacity of copper complexes and free ligands evaluated by the DPPH assay. The antioxidant capacities are inversely related to the percentages of remaining DPPH• in the presence of the indicated concentrations of the copper (II) complexes or ligands. Notice the different concentration scales between A, B (0.002-0.08 M) and C, D (0.5-5 M). Values are presented as mean \pm SEM (n = 3)

It has been reported that the reaction between an antioxidant and DPPH• apparently occurred in two steps (Zou *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2012): (i) a fast step (1-2 min) essentially consisting in the abstraction of the most labile H-atoms from the antioxidant, and (ii) a slow neutralization step (30 min) reflecting a remaining activity on the oxidation/degradation products derived from the first step. It is now reported that Cu (II) complexes have the capacity to scavenge DPPH radical by hydrogen donation from the NH-groups, with the mention that the ascorbic acid, an antioxidant used as a standard (0.002-5M), showed stronger antioxidant activity than that of synthesized copper complexes (data not shown). Worth to mention is that for the investigated copper complexes, as for their ligand, data obtained with the DPPH method also were in agreement with those of DPD method. Complexation with Cu (II) can modulate the feature of the amino acids and influence the antioxidant capacity. In the case of histidine, copper complexation markedly increased this capacity, whereas for [Cu(Ser)₂] this increase was lower. No differences were found for [Cu(Urea)₂Cl₂] and for [Cu(Biuret)₂Cl₂] in comparison with their ligands. Probably due to their lower stability the [Cu(Urea)₂Cl₂] and [Cu(Biuret)₂Cl₂] complexes may lose the Cu²⁺, liberating thus the ligands. The urea and biuret alone also exhibit marked radical scavenging capacity. These observations are in agreement with previous data on urea as antioxidant and as cardioprotector (Wang *et al.*, 1999)

3.5.6 Biocompatibility of copper complexes and ligands

The biocompatibility was evaluated using P19 neuronal cultures and the NR assay (Gomez Perez *et al.*, 2017) which was recommended for measuring the viability of cells exposed to concentrations of copper compounds exceeding those of physiological copper.

Histidine and urea presented good biocompatibility in concentrations up to 0.4 mM (Figure 3.9A,C). The good biocompatibility of urea is in line with urea levels of 2.3-6.5 mM encountered in normal adult human brain (Decaux, 2001). Serine and biuret caused a concentration dependent moderate loss of viability at 400 μ M concentration, with a remaining viability of about 70% in both cases (Figure 3.9B, D).

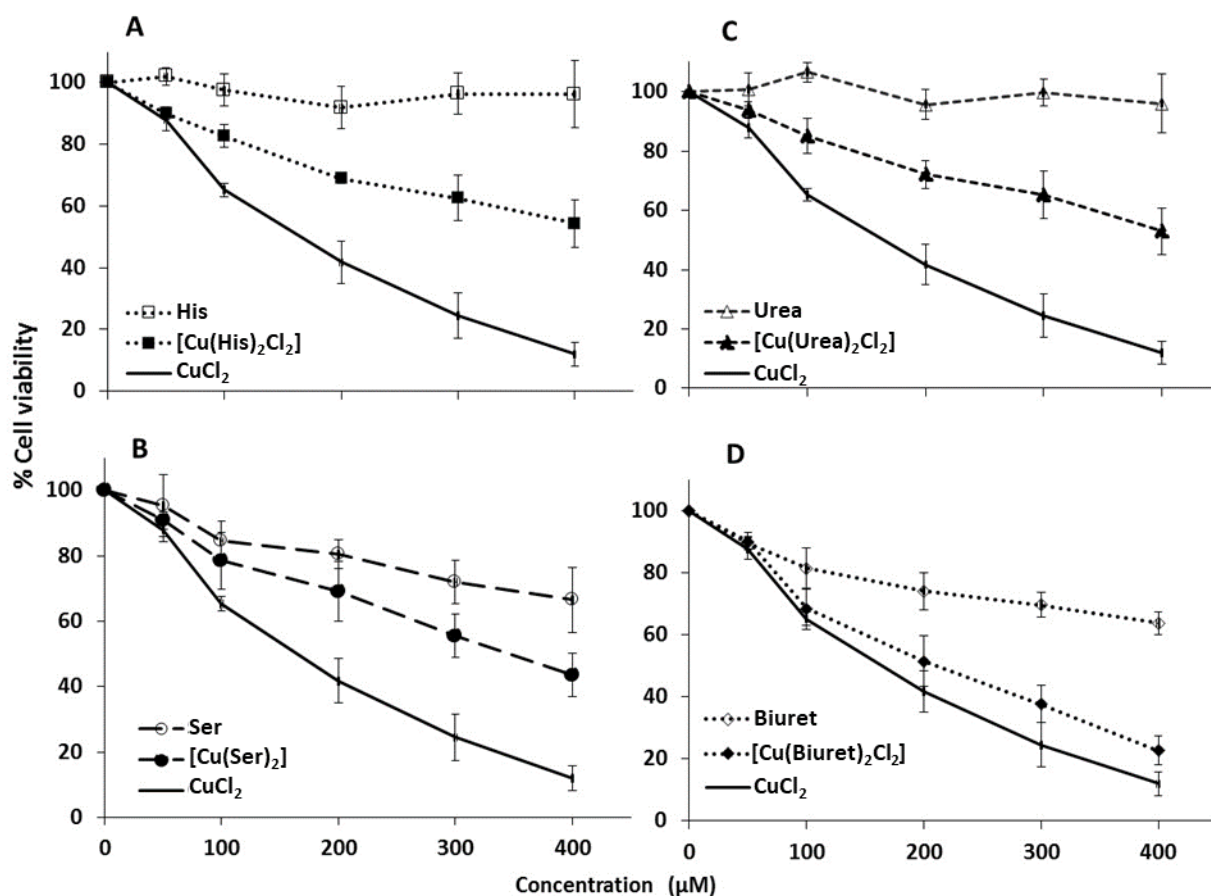


Figure 3.9 Cell viability in the presence of different concentrations of copper complexes and ligands. P19 neurons were incubated for 48 h in the presence of each complex or corresponding ligand, and their viability was evaluated by the NR uptake assay and reported as percentages from that of control cultures (no complex and no ligand). The viability of cells treated with CuCl_2 was included for comparison. Values (mean \pm SEM) are for three independent cell cultures

The cytotoxicity of serine could be due to the racemisation by a neuronal serine racemase of L-Serine into D-Serine known to be involved in neurodegeneration (Wolosker *et al.*, 2008). In contrast to urea, biuret was found to induce a decrease of viability (Figure 3.9D). This cytotoxicity could be due to the transformation of biuret into products different from urea or to an eventual stronger chaotropic action compared to urea. However, the metabolic action of biuret in neuronal cells is still unknown.

The normal physiological concentration of copper in brain parenchyma is 70 μM , and concentrations up to 1300 μM were found in the brain of patients affected by Wilson's disease (Scheiber *et al.*, 2014). Our findings of markedly decreased neuronal viability in the presence of CuCl_2 concentrations of 100 up to 400 μM (Figure 3.9) are in line with these data. Copper toxicity in cell culture is well known and can be attributed to its capacity to generate ROS. Worth of note, all copper complexes were less toxic to neurons than equivalent CuCl_2 concentrations (Figure 3.9).

Compared to free histidine, serine, urea and biuret, the corresponding copper complexes induced a loss in cell viability in a concentration dependent manner (Figure 3.9). In retrospective, $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ showed similar biocompatibility with P19 neurons (70% cell viability at 200 μM) while the toxicity of $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ was close to that of CuCl_2 (about 50% cell viability at 200 μM), in line perhaps with the low stability of this complex. Therefore, $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ but not His and urea, moderately altered neuronal viability. It is not excluded that the bidentate $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ and also the monodentate $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ copper complexes could release copper ions in the culture medium resulting in alteration of the environmental pH, generation of ROS, and promotion of apoptosis and DNA damages (Jazvinscak Jembrek *et al.*, 2014). In contrast, the tridentate $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ complex presented a good antioxidant activity and, in addition, a moderate cell viability loss up to 200 μM . The cytotoxicity of the synthesized copper (II) complexes was lower compared to equivalent concentrations of CuCl_2 . Although $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ appeared less stable than $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, the loss of viability was similar in both cases. It is not excluded that urea, which has an excellent antioxidant capacity [this report and Wang *et al.*, 1999] could protect cells against eventual oxidative damage due to the *in situ* liberation of copper (II) prooxidant. Among the studied compounds, $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ had the best cell biocompatibility and pronounced *in vitro* ROS scavenging activity.

3.6 Conclusion

Four copper complexes: $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, $[\text{Cu}(\text{Urea})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Biuret})_2\text{Cl}_2]$ have been synthesized in isopropanol and they structurally exhibited tridentate (His), bidentate (Ser and Biuret) or monodentate (Urea) coordination with copper (II). Furthermore, *in vitro* antioxidant activity of all copper

complexes presented effective scavenging of radicals when tested with DPD and DPPH assays. The results of biocompatibility studies showed that they may affect, in a concentration-dependent manner, the neuronal viability but to a lesser extent than does CuCl_2 . The copper complexes of amino acid ligands (His, Ser) presented higher stability in different simulating physiological media than those of urea and biuret, except simulated gastric fluid in which all complexes were instable. $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, closely followed by $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, was stable, biocompatible and the best in terms of antioxidant capacity. The other copper complexes showed a relatively higher cytotoxicity, but much lower than that of CuCl_2 generated by the free copper (II) ions

Acknowledgments

This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant number 06919 to MAM and 105730 to JP) and by the Courtois Foundation, Canada. MGP held studentships from Pharmaqam and the Foundation of the Université du Québec à Montréal. The authors declare no conflict of interest.

CHAPITRE 4
**BIOACTIVE COPPER(II) AGENTS AND THEIR POTENTIAL INVOLVEMENT IN
THE TREATMENT OF COPPER DEFICIENCY-RELATED ORPHAN DISEASES**

Mariela Gomez Perez¹, Narjara Gonzalez Suarez^{1,2}, Borhane Annabi^{1,2}, and Mircea Alexandru Mateescu¹

¹Department of Chemistry and Center CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada;

²Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada.

Cet article a été publié dans *J. Inorg. Biochemistry* 247 (2023) 112334
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2023.112334

CONTRIBUTION DE L'AUTEURE PRINCIPALE ET DES CO-AUTEURS

Auteure principale :

Mariela Gomez Perez : Conception du projet ; Méthodologie ; Réalisation de toute l'expérimentation ; Rédaction du manuscrit ; Analyse des données ; Rédaction - révision

Co-auteurs :

Narjara Gonzales Suarez : Contribution à la réalisation des expériences (RT-PCR) ; Participation à la Rédaction du manuscrit ; Analyse des données

Borhane Annabi : Discussion sur la Conception du projet ; Analyse formelle ; Acquisition de financement ; Méthodologie ; Rédaction - révision

Mircea Alexandru Mateescu : Conception du projet ; Analyse formelle ; Acquisition de financement ; Méthodologie ; Gestion de projet ; Supervision ; Rédaction - révision

4.1 Résumé

La dérégulation de l'homéostasie du cuivre est reliée avec diverses maladies telles que la maladie de Menkes ou la cardioencéphalomyopathie hypertrophique. Récemment, nous avons synthétisé des complexes solides de cuivre (II) $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ stables dans des milieux physiologiques ayant un potentiel en tant qu'agents thérapeutiques. Ce rapport décrit : i) la biocompatibilité de ces complexes à des concentrations allant jusqu'à $100 \mu\text{M}$ sur des cellules Caco-2 différenciées ; ii) le transport à travers l'épithélium intestinal fait par la mesure de la résistance transépithéliale et la quantité de complexes de cuivre sur le côté apical et basolatéral des cellules. Les résultats suggèrent leur passage par voie paracellulaire. La rétention intracellulaire de cuivre était inférieure à 2,7 % sans différences significatives dans la teneur en cuivre intracellulaire entre 6 h et 48 h, ce qui suggère un processus de rétention précoce du cuivre. De plus, ce rapport apparaît comme le premier à montrer la capacité des $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ pour induire une régulation transcriptionnelle négative des quatre principaux transporteurs de cuivre (CTR1, DMT1, ATP7A, ATP7B) et la régulation positive de l'expression des gènes de la métallothionéine observée uniquement à $100 \mu\text{M}$. Une découverte remarquable a été l'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase observée après le traitement des cellules Caco-2 différenciées avec les complexes de cuivre (II) à des concentrations de 50 et $100 \mu\text{M}$. La compréhension des mécanismes de transport de ces complexes de cuivre (II) à travers l'épithélium intestinal et de leurs activités biologiques contribue au développement de formes pharmaceutiques optimales pour le traitement des maladies liées à une carence en cuivre.

4.2 Abstract

The deregulation of copper homeostasis can promote various diseases such as Menkes disease or hypertrophic cardioencephalomyopathy. We have recently synthesized solid copper(II) complexes ($[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$), stable in physiological media and with potential as therapeutic agents. This report describes: *i*) the biocompatibility of these complexes at concentrations up to 100 μM using a differentiated Caco-2 cells model; *ii*) their transport across the intestinal epithelium using a transepithelial resistance assay and monitoring the amount of copper complexes at the apical and basolateral sides of the cells. The results suggest that the flow occurs through paracellular routes. The intracellular copper retention was less than 2.7% with no significant differences in intracellular copper content between 6h and 48h, suggesting an early copper retention process. Furthermore, this is the first evidence that demonstrates $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ induce transcriptional downregulation of the four major copper transporters (*CTR1*, *DMT1*, *ATP7A*, *ATP7B*), and the upregulation of the metallothionein gene expression. A remarkable finding was the increase in cytochrome c oxidase activity observed after the treatment of differentiated Caco-2 cells with copper(II) complexes at concentrations of 50-100 μM . The understanding of the transport mechanisms of these copper(II) complexes across the intestinal epithelium and of their subsequent biological activities could contribute to the development of optimal pharmaceutical formulations for the therapy of copper deficiency-related diseases.

Keywords: Amino acid; copper complexes; Copper transporters; Cytochrome c oxidase activity; Paracellular transport, Caco-2 differentiated cells.

Abbreviations: AP, Apical; ATP7A, ATPase copper transporting alpha, ATP7B, ATPase copper transporting beta; BL, Basolateral; BM, Copper-free buffer medium; CM, Complete medium; COX, Cytochrome c oxidase; CTR1, Copper uptake protein 1; DMT1, Divalent metal transporter 1, FBS, Fetal bovine serum; HA, Histamine; HCEM, Hypertrophic cardioencephalomyopathy; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; His, L-histidine; H_2O_2 , Hydrogen peroxide; Im, Imidazol; MD, Menkes disease; MT, Metallothionein; NR, Neutral red; PBS, Phosphate buffer saline; ROS, Reactive oxygen species; Ser, L-Serine; RT-PCR, Real-time polymerase chain reaction; TEER, Transepithelial electrical resistance

4.3 Introduction

Metal ions are involved in a wide range of biological functions in both intra- and extracellular contexts (O'Dell, 1976). Among these, copper plays an essential role in living organisms as a structural component of several enzymes including laccase, ascorbate oxidase, ceruloplasmin, amine oxidases, superoxide dismutase, cytochrome c oxidase (Bento *et al.*, 2007; Bertini *et al.*, 1995). It is well known that the function of these proteins is mainly due to the presence of this metal in their structures (Bento *et al.*, 2007). Moreover, copper bound to small biologically active molecules such as amino acids, have various physiological functions and may exert therapeutic properties (Gala *et al.*, 2014). In mammals, free copper ions are absent due to their reactivity and capacity to generate free radicals (Halliwell and Gutteridge, 1984). A complex system of molecules is involved in the uptake, distribution and delivery to their targets of these essential but potential toxic metals (Lutsenko, 2010). For most of the cells, copper absorption is mainly mediated by the high affinity copper uptake protein 1 (CTR1) (Kaplan and Maryon, 2016; Kim *et al.*, 2008). In addition, it is not excluded that divalent metal transporter 1 (DMT1) can be a vehicle for the entrance of copper into the cells (Gunshin *et al.*, 1997; Lönnnerdal, 2008). The ATP7A and ATP7B proteins are responsible for transporting extracellular copper into the secretory pathway (Lutsenko, 2010; Kim *et al.*, 2008). Numerous metallochaperons are involved in the cellular trafficking of this metal (Lutsenko, 2010; Kaplan, and Maryon, 2016). In particular, metallothionein (MT) has been largely studied mainly for its role in metal detoxification (Kim *et al.*, 2008; Roesijadi, 1996).

The deregulation of copper homeostasis leads to various diseases such as neutropenia, thrombocytopenia, anemia, or encephalopathy (Wazir and Ghobrial, 2017; Kumar, 2011). Menkes disease (MD) is a severe multi-systemic disease caused by deficient absorption of copper (II) due to an inherited genetic dysfunction of the gene encoding the intestinal ATP7A protein (Deschamps *et al.*, 2005; Vulpe *et al.*, 1993). Copper (II) complexed with L-histidine (His), when administered parenterally, has been used to treat MD (Deschamps *et al.*, 2005). However, daily injectable administration of this complex complicates its use, and alternative ways of administration are desirable. The decrease in cytochrome c oxidase (COX) activity has been shown in copper-deficiency diseases, including MD and hypertrophic cardioencephalomyopathy (HCEM) (Kumar, 2011, Freisinger *et al.*, 2004; Meguro *et al.*, 1991).

HCEM is a mitochondrial disease characterized by a large severe clinical multi-systemic disorder (Freisinger *et al.*, 2004). This disease is caused by mutations in the *SCO2* gene that encodes Sco2, a metallochaperone involved in the assembly of copper to the subunit I of COX (Fukai *et al.*, 2018; Baker *et al.*, 2017; Freisinger *et al.*, 2004). In contrast to MD, the intestinal absorption of copper induced by ATP7A is not affected in HCEM (Freisinger *et al.*, 2004; Baker, 2017), and oral administration of copper may be

more beneficial. Indeed, copper supplementation was demonstrated to reverse the cardiac dysfunction in patients suffering HCEM (Fukai *et al.*, 2018).

Copper (II) complexes have recently received increasing attention, especially for their potential in biomedical applications (Bukharov *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2010; Deschamps *et al.*, 2005). Copper bound to His was found to play a key role in the transport and availability of copper to cells and tissues (Deschamps *et al.*, 2005). L-serine (Ser) is a non-essential amino acid that can be synthesized by many cells (Gao *et al.*, 2014; Pecul, 2006) and that forms mixed copper (II) complexes also containing His ligand in physiologic conditions (Deschamps *et al.*, 2005). The copper (II)-L-amino acid complexes may be absorbed via the peptide or amino acid transport pathways, which could be increased when compared to commonly used inorganic sources (Gao *et al.*, 2014). Recently, we have synthesized and characterized the solid complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ and found a good biocompatibility (neuronal viability around 90%) at concentrations of copper complexes below 100 μM (Esmali *et al.*, 2014). These observations open new perspectives for the possible use of these complexes as therapeutic agents for the treatment of various diseases related to copper deficiency.

The present study first aims at evaluating the biocompatibility of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ in differentiated Caco-2 cells: the most common and extensively characterized cell-based model for the assessment of absorption of drugs via the intestinal membrane enterocytes (Artursson *et al.*, 2001). The flow of copper(II) complexes through the intestinal epithelium and their possible intracellular accumulation were investigated, as well as their transcriptional effect on the expression of metal transporters and metallothionein. To the best of our knowledge, this work is the first to investigate the impact of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ complexes on enhance of cytochrome c oxidase activity in enterocytes. This will contribute to increase our understanding of the mechanisms regulating the transport of copper(II) complexes across the intestinal epithelium and of their biological activity, in view of their oral administration as pharmaceutical forms for the therapy of copper deficiency related serious diseases such as HCEM.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Synthesis of copper (II) complexes

The copper (II) complexes were prepared according to the method described by Esmaili *et al.*, (2018). For $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ complex, a 1:2 M ratio of CuCl_2 :His was used and a 50:1 v/v ratio of isopropanol: H_2O . Briefly, a cold solution (400 mL) of CuCl_2 ($1.93 \cdot 10^{-3}$ mol/L) in isopropanol was added dropwise to an aqueous solution (8 mL) of His ($3.84 \cdot 10^{-3}$ mol/L) at pH 6.8. The mixture was stirred continuously on ice for 45 min.

The complexation was carried out in isopropanol to facilitate the recovery of the [Cu(His)₂Cl₂] which precipitates under these conditions. The resulting solid was collected by filtration, washed with cold isopropanol and dried at room temperature. The [Cu(Ser)₂] complex was prepared in ethanol using a 1:2:1 M ratio of CuCl₂:Ser:NaOH. Similarly, a cold solution (15 mL) of CuCl₂ (2.64×10^{-2} mol/L) in ethanol was added dropwise to a solution of 30 mL of Ser (5.19×10^{-2} mol/L) in ethanol containing sodium hydroxide (0.01 mol/L). The mixture was stirred on ice for 30 min and the resulting solid was filtered, washed with ethanol and dried at room temperature. The copper (II) histamine ([Cu(HA)₂Cl₂]) and copper (II) imidazol ([Cu(Im)₂Cl₂]) complexes were prepared using a 1:5 molar ratio of CuCl₂:ligand (HA; Histamine or Im; Imidazole) (Drożdżewski and Kordon, 2000; Smith *et al.*, 1985). Practically, an aqueous solution (10 mL) of CuCl₂ (0.5 mol/L) was added dropwise to a methanolic solution (0.1 mol/L; 10 mL) of HA or Im. The reaction was carried out at 40 C for 4 h with constant stirring. The final precipitated product was obtained by filtration, washed with ethanol and dried at room temperature. All chemicals used were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) and they were used as received without any further purification.

4.4.2 Culture, differentiation and treatment of Caco-2 cells

Human Caco-2 cells were used between passages 214 and 224 (Chantret *et al.*, 1988). Stock cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere at 5% CO₂ in complete medium [CM; Dulbecco's Modified Eagle (DMEM; ThermoFisher Scientific, ON, Canada), supplemented with 15% v/v inactivated (56°C for 30 min) fetal bovine serum (FBS; Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC, Canada), 0.1 mM non-amino acids essential, 19 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and 50,000 U/mL-50 µg/L penicillin-streptomycin (Gibco™, ThermoFisher Scientific) (Jumarie *et al.*, 2017). The CM was changed every two days until 70–80% of confluence, then cells were passaged by trypsinization using 0.05% v/v trypsin-1 mM EDTA solution (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) and seeded in 75 cm² flasks (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) at 10⁶ cells/flask. For viability assay, cells were seeded in 96-well plates (5 x10³ cells/well) and in 60 mm diameter Petri dishes (3x10⁵ cells) for RT-qPCR analysis and COX activity. As the differentiation of Caco-2 takes place spontaneously fourteen days after the confluence is reached (Natoli *et al.*, 2012), the cells were incubated (37°C, 5% CO₂) for 21 days and the CM was changed three times per week. After differentiation, the CM was removed and cells were washed three times with phosphate buffered saline [PBS: NaCl 0.8% (w/v), KCl 0.02% (w/v), KH₂PO₄ 0.02% (w/v), Na₂HPO₄ 0.12% (w/v), pH 7.3]. Subsequently, the medium was replaced by a copper-free buffer medium [BM; 137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 4 mM D-glucose, 1.2 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂ and 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), pH 7.4] containing copper (II) complexes or ligands (His, Ser, HA, Im) or CuCl₂ at defined concentrations and incubated (37°C, 5% CO₂) at the times indicated in the figures. The

control cultures contained only vehicle-treated cells. The viability of cells treated with ligands (His, Ser, HA or Im) and CuCl_2 was included for comparison. The treatments were done using stock solutions freshly prepared in BM and filtered through 0.2 μm Millex™ sterile syringe filters (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

For transepithelial transport, Caco-2 cells were seeded in polycarbonate filter cell culture chamber inserts (Corning® Transwell®, 12 mm Transwell with 0.4 μm pore diameter; Sigma-Aldrich, ON, Canada) at a density of 12×10^3 cells/cm² and were allowed to differentiate for 21 days changing the CM three times a week. This culture system is composed of two compartments physically divided: the upper or apical (AP) and the lower or basolateral (BL) layers that is particularly useful to study the transepithelial transport and the integrity of cells monolayers. After differentiation, the CM was removed, and cells were washed three times with PBS. Then, 0.5 mL of BM supplemented with $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ at 50 or 100 μM were added into the AP compartment. In the BL compartments, 1.5 mL of BM were added. Similarly, the AP exposure of cells to His, Ser or CuCl_2 (50 or 100 μM) was included for comparison.

4.4.3 Viability of Caco-2 cells

Following the treatments, the viability of cells was measured using the neutral red (NR) assay which measures the accumulation of NR dye via active transport in the lysosomes of living cells (Perez *et al.*, 2017). In short, 0.2 mL of freshly prepared NR solution (138 μM in 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgCl_2 and 20 mM D-glucose, pH 7.4) was added to each culture well prewashed with PBS. After 2 h of incubation (37°C, 5% CO_2), the NR solution was removed, and the cultures were washed quickly with 1% formaldehyde in 1% CaCl_2 . Then 0.2 mL of NR eluents (EtOH: H_2O : HAc 50:49:1) was added to extract NR from cells. After 10 min of stirring at room temperature, the absorbance was read at 540 nm using a microplate reader (Molecular SpectraMax EM Microplate Reader, CA, USA).

4.4.4 Effect of the copper (II) complexes on cell monolayers TEER

The transepithelial electrical resistance (TEER) was established as an indicator of the integrity of the cell monolayers (Srinivasan *et al.*, 2015). Prior, the intrinsic resistance (ohms, Ω) of the filters (without cells) and BM (blank resistance) was measured using a Millicel ERS-2 Voltohmmeter (Millipore, Bedford, MA, USA). In addition, the integrity of cell monolayers was verified before various treatments of differentiated cells by measuring the TEER. The Caco-2 cells monolayers grown on filters displayed resistance values $\leq 250 \Omega \times \text{cm}^2$ and were considered for this study. For the effect of various treatments on TEER of differentiated Caco-2 cell monolayers, the readings were taken at different times up to 48 h. All measures

were taken at three different places on the cell monolayer. The TEER was calculated using the following formula: $TEER (\Omega \times cm^2) = (Total\ resistance - blank\ resistance) (\Omega) \times Area (cm^2)$ and expressed in percentages referring to initial values of TEER before cell treatments.

4.4.5 Efflux and retention of copper (II) complexes in cells

Differentiated Caco-2 cells are an *in vitro* model commonly used to assess the uptake of bioactive molecules (Artursson *et al.*, 2001). After treatment of differentiated Caco-2 cells seeded in 12-well polycarbonate filter cell culture chamber inserts, the AP and the BL medium was harvested for further analysis. Untreated differentiated cells were included as control. Cells were harvested with 1 mL of PBS and centrifuged at 4,000 rpm for 5 min. The cell pellets were stored at -80°C overnight before lyophilisation. For standard curves, the solutions were prepared in BM alone (blank) or containing 0.01 to 10 ppm of copper(II). Subsequently, an acidic digestion with 500 µL of nitric acid (HNO₃) was carried overnight to lyophilized products and standard solutions. Then, 300 µL of H₂O₂ was added for others 24 h. Finally, the volume was adjusted for a final concentration of 5% of HNO₃. The concentration of Cu(II) was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP/OES, Agilent 5100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The values are presented as the percentage of Cu(II) in samples relative to the initial amount of Cu(II) added as [Cu(His)₂Cl₂] or [Cu(Ser)₂]. For copper(II) cell retention, the results are expressed in nmol/ mg protein. The protein content was determined by the Bio-Rad assay with bovine serum albumin (BSA) as the standard.

4.4.6 RT-qPCR assay of copper transporters and metallothionein

After differentiation, Caco-2 cells were treated with [Cu(His)₂Cl₂] or [Cu(Ser)₂] at concentrations of 50 or 100 µM for 6 h. Total RNA was extracted from the cell pellets using 1 mL TRizol reagent per well (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Next, 1-2 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and following the manufacturer instructions. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was then performed to determine the gene expression level of the copper transporters *ATP7A*, *ATP7B*, *CTRI*, *DMT1*, and of metallothionein (MT) using the SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Amplification was performed in a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, version 2.1). The resulting amplicons were detected by measuring the fluorescence elicited by the binding of the SYBR Green dye to the double strand DNA. QuantiTect primers were purchased from Qiagen (Montreal, QC, CA): *ATP7A* (Hs_ATP7A_QT00075852), *ATP7B* (Hs_ATP7B_QT00075782), *CTRI* (Hs_SLC31A1_QT00099267), *DMT1* (Hs_SLC11A2_QT00070308) and *MT* (Hs_MT1A_QT01004591) 18S ribosomal RNA (Hs_RRN1 8S_QT00199367) and Peptidylprolyl Isomerase A (Hs_PPIA_4_SG_QT01866137) were included as

housekeeping genes and their relative gene expression was used to normalize the expression of genes of interest. Quantification was performed following the Δ CT method, and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta CT}$. Finally, to confirm the specificity of product amplification, amplicons were electrophoresed on a 2% agarose gel, visualized with GreenGlow™ (Denville Scientific Inc., Saint-Laurent, QC, Canada) and using a ChemiDoc MP Imaging System (Figure B 4.1) Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The expected PCR product sizes are as follows: *ATP7A* (72 bp), *ATP7B* (111 bp), *CTRI* (90 bp), *DMTI* (72 bp) and *MT* (101 bp).

4.4.7 Cytochrome c oxidase activity

Cytochrome c oxidase (COX) activity was determined using a colorimetric assay by following the oxidation of reduced cytochrome c through the decrease of absorbance at 550 nm. Briefly, sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) is added to a solution of Cytochrome c (0.09 mM) in phosphate buffer (0.1 M; pH 7) to ensure the total reduction of Cytochrome c. After the treatments, the differentiated Caco-2 cells were harvested with 1 mL of PBS and centrifuged at 4,000 rpm for 5 min. Subsequently, 20 μL of lysis buffer (Triton X 0.1%; Tris 25 mM; pH 7.4) are added to the pellet to permeabilize the membranes. After 5 min of incubation, 300 μL of Tris buffer (25 mM; pH 7.4) were added and the mixture was homogenized using a scraper. The whole procedure is carried out at 4°C and 50 μL of the homogenate was used for the protein assay by the Bio-Rad assay with BSA as the standard. In a 96-well plate, 10 μL of the cell homogenate and 190 μL of the reduced Cytochrome c solution were added to each well. The absorbance was measured at 550 nm every 30 seconds for a total time of 10 min at 25°C. The enzymatic activity was calculated from the dilution of the fraction and the molar extinction coefficient at 25°C and pH 7 of ferrocytochrome ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). One unit of COX is the amount of enzyme that oxidizes 1 μmol of reduced Cytochrome c per minute at 25°C and pH 7.

4.5 Results and discussion

4.5.1 Biocompatibility of copper (II) complexes.

For biocompatibility assessment, the NR assay was used as a convenient method to measure cell viability when exposed to copper compounds at higher concentration than those of physiological copper levels (Perez *et al.*, 2017). As shown in figure 4.1 A, C and D, His, HA and Im ligands exhibited a good biocompatibility at concentration up to 300 μM . This result fit well the previous ones showing that the treatment of differentiated Caco-2 cells with His, HA ($\text{LC}_{50} \cong 10 \text{ mM}$) and Im, did not affect cell viability at concentrations up to 1 mM (Jumarie *et al.*, 2017). Differently, Ser concentration-dependently decreased cell viability until a plateau of remaining viability of ~60% at 300 μM Ser (Figure 4.1B). Interestingly, Ser was the only ligand toxic to cells in contrast to its copper(II) complex $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$. Such cytotoxicity could be attributed to racemization by a serine racemase of L-Serine to D-Serine, a process known to be toxic to cells

(Genchi, 2017; Bardaweel *et al.*, 2013). The present work is focused on $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ as potential therapeutic agents for the treatment of various diseases related to copper deficiency.

It is well known that free copper can be highly toxic due to its ability to promote the generation of reactive oxygen species (ROS), cell apoptosis and DNA damage (Kaplan and Maryon, 2016; Flemming and Trevors, 1989). A drastic decrease in cell viability was observed when Caco-2 cells were exposed to CuCl_2 at concentrations between 50 to 300 μM (Figure 4.1). The copper(II) complexes showed less cytotoxic effects than CuCl_2 at similar concentrations.

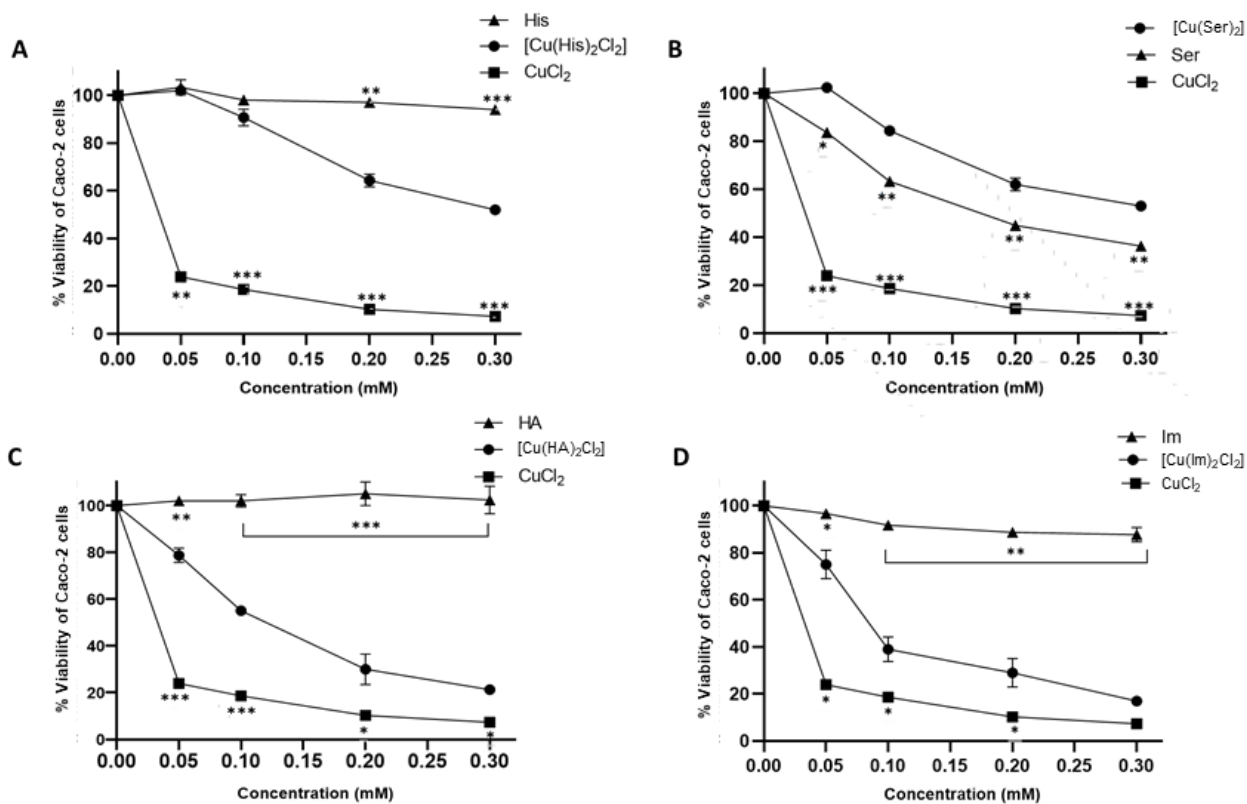


Figure 4.1 Effect of copper (II) complexes and ligands on viability of differentiated Caco-2 cells. Following differentiation, Caco-2 cells were treated with A) $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, B) $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, C) $[\text{Cu}(\text{HA})_2\text{Cl}_2]$, or D) $[\text{Cu}(\text{Im})_2\text{Cl}_2]$ for 24 h. Cell viability was also assessed upon treatment with His, Ser, HA or Im ligands, and CuCl_2 was used for comparison. Data are means \pm SD and reported as percentages of untreated control cultures (n = 3; * P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001; two-way ANOVA multiple comparisons)

As shown in figure 4.1, copper(II) complexes induced a moderate loss of cell viability in a concentration-dependent manner. The tridentate $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ ligation (Figure 3.1B) confers greater stability compared to bidentate and monodentate ligands (Deschamps *et al.*, 2005). The structural characterization of $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ revealed two serine molecules bound to the copper ion in a bidentate manner (Figure 3.1A) and showed that

two amino nitrogen and two carboxyl oxygen are coordinated to the copper (Esmaili *et al.*, 2018). The [Cu(His)₂] was described as neutral five-coordinated complex with a distorted square pyramidal geometry with bidentate and tridentate L-histidine ligands (Figure 3.1B). The tridentate chelation of one of the L-histidine ligands provides an additional stability over the binary [Cu(Ser)₂] complex. Moreover, the enhanced stability of [Cu(His)₂] regarding [Cu(Ser)₂] is evidenced when comparing the stoichiometric stability constant value of both complexes ($\log \beta \sim 18$ and 14 respectively) (Deschamps *et al.*, 2005; Brumas *et al.*, 1996). This fact can also explain the negligible concentrations of these complexes detected in human blood. Consequently, the [Cu(His)₂Cl₂] complex demonstrated a better biocompatibility than the bidentate [Cu(Ser)₂] and [Cu(HA)₂Cl₂] or the monodentate [Cu(Im)₂Cl₂] complexes, which can release copper ions into the culture medium. Among all copper(II) complexes, the [Cu(His)₂Cl₂] complexes, closely followed by [Cu(Ser)₂], were significantly more biocompatible (viability $\geq 90\%$) at concentration up to 100 μM . Similar results were previously obtained in a P19 neurons model (Esmaili *et al.*, 2018).

The understanding of copper(II) complexes retention and flow by intestinal cells is important for the design and development of therapeutic strategies, and for the use of these potential bioactive copper(II) agents in the treatment of copper deficiency disorders. It is worth noting that non-toxic concentrations (50-100 μM) of copper(II) complexes (Figure 4.1) were chosen for the rest of investigation. These concentrations are comparable or slightly higher than physiological concentrations are not impacting on cell permeability. Indeed, the range of normal physiological copper concentrations is between 1.6 μM in plasma (Brewer *et al.*, 2018) to 70 μM in the brain parenchyma. In contrast, in patients affected by Wilson's disease, higher concentrations up to 1300 μM copper(II) were found (Scheiber *et al.*, 2014).

4.5.2 Effects of copper (II) complexes on transepithelial electrical resistance (TEER)

Caco-2 cells have been described as a useful model for predicting drug transport through the intestinal epithelium comparable to *in vivo* models (Artursson *et al.*, 2001). They can spontaneously differentiate into cell monolayers reflecting mature intestinal enterocytes that exhibit a paracellular permeability close to physiological human conditions (Natoli *et al.*, 2012; Artursson *et al.*, 2001). The measure of transepithelial electrical resistance (TEER) in Caco-2 cells has been considered a strong indicator of tight junction integrity and is a widely used technique to assess the paracellular drug transport pathway (Artursson *et al.*, 2001). Figure 4.2 shows the impact of [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] on TEER of differentiated Caco-2 cell monolayers measured at up to 48 h and expressed as a percentage related to initial values of TEER. The exposure of cells to these copper (II) complexes did not trigger a significant change in TEER values compared to untreated control cultures for the first 6 h of treatment. These bioactive copper (II) agents are not stable in $\text{pH} \leq 5$ (Esmaili *et al.*, 2018). Thus, it will be necessary to use more convenient pharmaceutical formulations to for its release in the intestinal tract region with $\text{pH} 7$. The acidic pH (1.5-3.5) in the stomach

increases in the small intestine to approximately pH 5-6 in the duodenum and pH 7-8 in the distal jejunum and ileum while in colon it decreases to pH 6 (Stillhart *et al.*, 2020). As the estimated time for the transit of drugs through the small intestine is not longer than about 4.5 h (Stillhart *et al.*, 2020), the results suggest that intestinal membrane would not be affected during the intestinal transit of these complexes. Differently, both copper complexes promoted a significant time-dependent decrease of TEER after 24 up to 48 h.

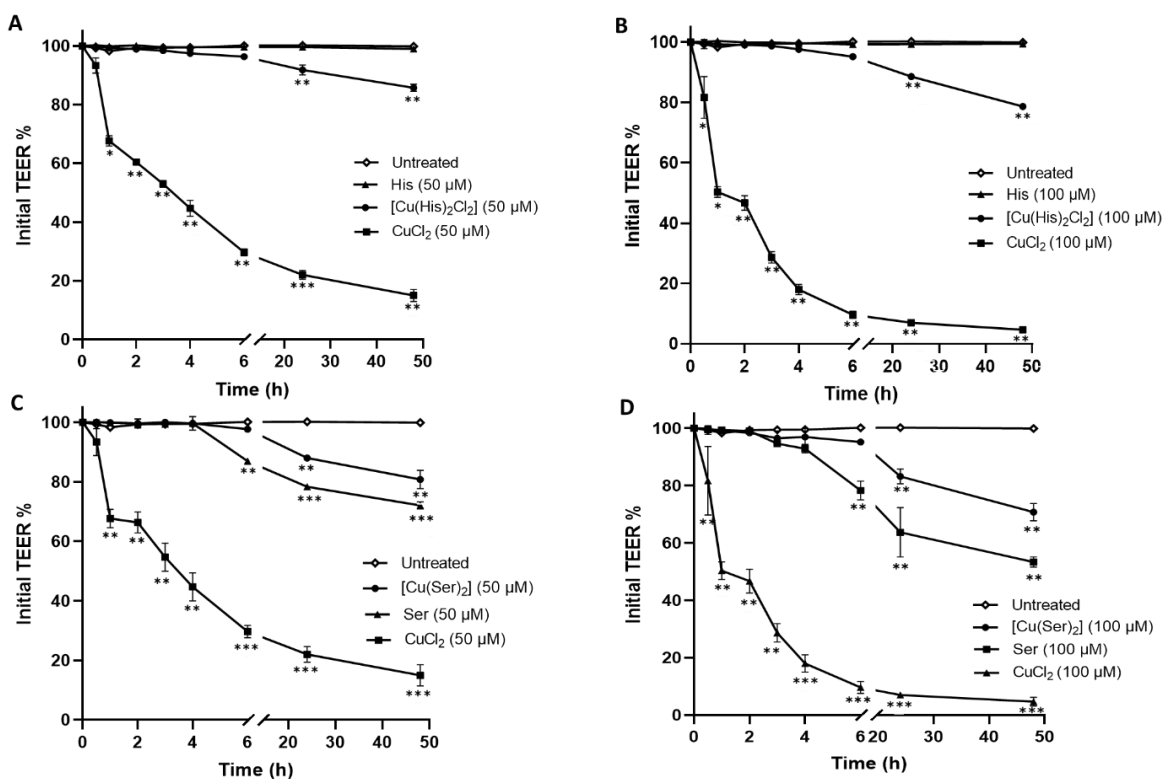


Figure 4.2 Effect of copper (II) complexes on transepithelial electric resistance (TEER) values in differentiated Caco-2 cell monolayers. Cells were exposed to $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$, His, CuCl_2 (A,B) and to $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, Ser, CuCl_2 (C, D) at concentrations of 50 μM (A, C) or 100 μM (B, D). The TEER values were measured for the times indicated in the figure. Data are expressed as means of a percentage of TEER \pm SD ($n = 3$) related to its initial values. The TEER values are calculated after subtracting the intrinsic resistance of the filters without cells ($135 \pm 7 \Omega \cdot \text{cm}^2$). The values of cells treated with CuCl_2 were included for comparison. The significant differences compared to untreated control cultures were estimated as statistically significant for P values lower than 0.05 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; two way ANOVA multiple comparisons).

These results point to the loss of the integrity of the cell monolayers and a related increased cell permeability after a long exposure time (Figure 4.2). Also, for $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ at 100 μM , the results could be correlated with the $15.3 \pm 1.5\%$ of loss on cell viability (Figure 4.1B) after 24 h of treatment. The presence of copper in the structure might be affecting the integrity of cell monolayers by damages caused to the membranes or the proteins involved in tight junctions (Kaplan and Maryon, 2016). However, the transcellular passage or the

active uptake via intestinal transporters of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ cannot be excluded. His did not affect the TEER values but Ser, at both concentrations, caused a time-dependent decrease of TEER. As discussed above, this amino acid has cytotoxic effects on differentiated Caco-2 cells (Figure 4.1B) which may have a direct influence on the increase of the cell monolayer permeation with moderate effect at 24-48 h. Contrary to copper(II) complexes, the CuCl_2 caused a marked decrease in TEER values in the first 6 h. This clearly suggest for the copper(II) complexes with lesser deleterious effects on cell monolayers integrity than CuCl_2 at similar concentrations.

4.5.3 Flow and retention of copper(II) complexes in Caco-2 cells

The flow time course of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ through AP to BL compartments was next estimated from the amounts of Cu(II) determined by ICP/OES. Figure 4.3 shows a time-dependent decrease of copper(II) concentrations, in AP compartments while an increase in BL compartments was observed.

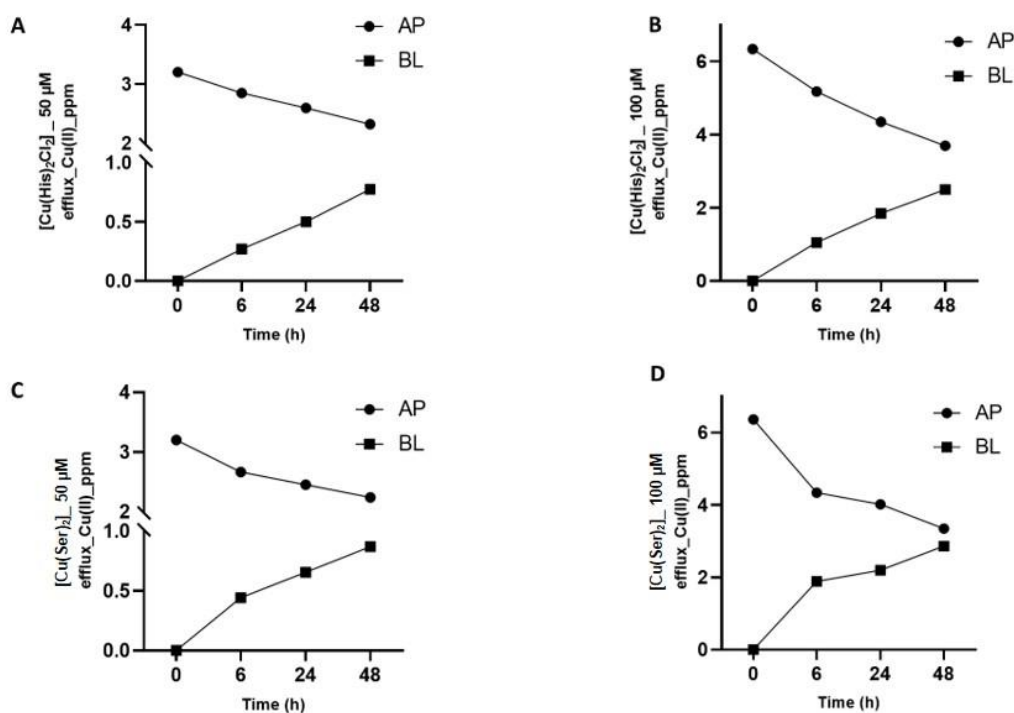


Figure 4.3 Time course of copper (II) efflux from the apical (AP) to the basolateral (BL) compartments. After differentiation, cells were exposed to $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ (A, B) or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ (C,D) at concentrations of 50 μM (A, C) or 100 μM (B, D) for 6, 24 and 48 h. Data are mean \pm SD of $n = 3$ independent experiments performed in duplicate.

From the initial amount of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ added to AP compartments at 50 or 100 μM , a decrease was found in both cases, and was more pronounced at 100 μM (from 6.5 ppm to 3.69 ± 0.04 ppm) after 48 h of treatment

(Figure 4.3A and B). On the contrary, Cu(II) was not detected in BL compartments at the beginning of experiments but the amount was constantly increase until the end of exposure. The amounts of copper(II) quantified were up to 2.49 ± 0.03 ppm during the exposure to $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$. Similar flow effect were found when cells were exposed to $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ (Figure 4.3C and D).

Cu(II) content was also quantified in differentiated Caco-2 cells exposed to $100 \mu\text{M}$ of copper(II) complexes. A rapid increase of the intracellular Cu(II) content was observed until 6 h, followed by a plateau (Figure 4.4). The intracellular concentration of copper(II) was increased 4.5-fold, compared to the initial intracellular copper content. Similar patterns were obtained when cells were treated with $50 \mu\text{M}$ $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ but with a moderate rise in the concentration of Cu(II) up to 2.5 folds after 48 h.

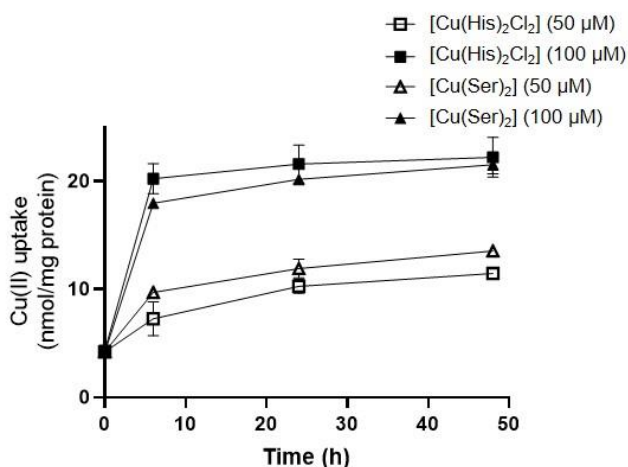


Figure 4.4 Time course of copper (II) retention (nmol/mg protein) in differentiated Caco-2 cells exposed to $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ at concentrations of $50 \mu\text{M}$ or $100 \mu\text{M}$ for 6, 24 and 48 h. Data are mean \pm SD of $n = 3$ independent experiments in duplicate.

The percentages of Cu(II) from the initial concentration of this cation as $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ in AP and BL compartments and on differentiated Caco-2 cells increased in a time-dependent manner on BL sides while they decreased on AP compartments. Worth to note, the relative percentage of copper(II) complexes were significantly different in the time for each compartment. Whereas, no significant differences between the percentage of copper(II) were found in cells (2.3-2.7%). The highest percentages in the BL compartments were found after 48 h of treatment of cells with $100 \mu\text{M}$ of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ reaching up to $39.4 \pm 0.2\%$ and $44.9 \pm 0.8\%$ respectively (Figure 4.5B, D). These results are agreement with the capacity of absorption of human gastrointestinal system estimated in 30–40% of ingested copper from the typical diets (Wapnir, 1998).

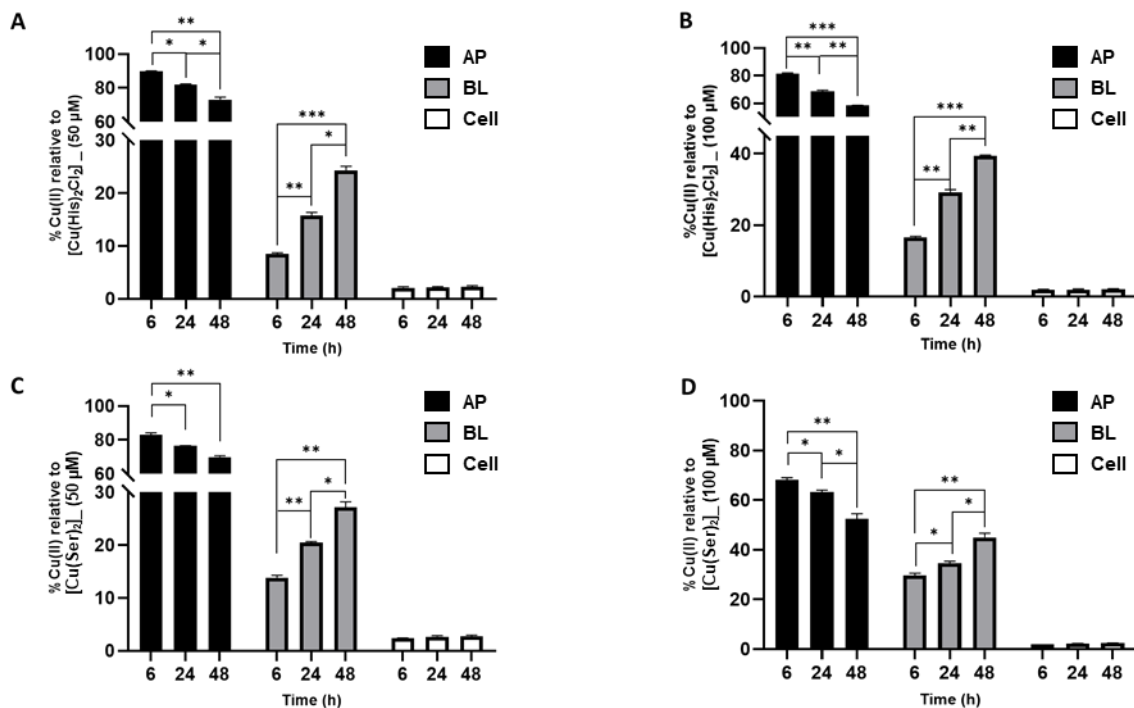


Figure 4.5 Percentages of copper (II) relative to the corresponding initial concentration of copper complexes on apical (AP) and basolateral (BL) compartments, and on differentiated Caco-2 cells exposed to (A, B) [Cu(His)₂Cl₂] or (C, D) [Cu(Ser)₂] at concentrations of 50 μM (A, C) or 100 μM (B, D) for 6 h, 24 h and 48 h. The concentrations of Cu (II) were determined by ICP-OES. Data are mean ± SD and reported as percentages related to each concentration of copper (II) complexes used in the experiments (n = 3; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001; two-way ANOVA multiple comparisons)

However, these could also be related to the loss of the integrity of the cellular monolayers demonstrated by the decrease in TEER (Figure 4.2B, D) and in the case of [Cu(Ser)₂] by the moderate cytotoxic effect observed on cellular viability (Figure 4.1A, B). These results support the novel concept of orally administered copper (II) complexes. During the first 6 h of treatment (Figure 4.5), the percentages of copper(II) found in BL compartment from the total added as complexes were in the range of 8.5 ± 0.2% (50 μM [Cu(His)₂Cl₂]) to 29.7 ± 0.8% (100 μM [Cu(Ser)₂]).

These results are important considering that the [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] complexes will be properly formulated for their release in the region of the small intestine with pH 7 and that the time of intestinal transit from pylorus to the colon is estimated at a maximum of 4.5 h (Flemming and Trevors, 1989). Another

valuable result is the fact that there is no retention of copper (II) at the level of intestinal cells suggesting a good absorption of the administered copper (II) complexes (Figure 4.5).

Furthermore, the results shown in figures 4.2-4.5 indicated that these copper (II) complexes could be using the paracellular route in their passage across the intestinal epithelium. Actually, the entrance by paracellular pathway of hydrophilic molecules with low molecular weight, like $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, was previously described (Srinivasan *et al.*, 2015). Moreover, considering that tight junctions restrict the paracellular transport of drugs (Srinivasan *et al.*, 2015), the design of a pharmaceutical formulation to enhance the transit of complexes by this route will be required.

4.5.4 Effects of copper (II) complexes on the expression of metal transporters and metallothionein.

The transport pathway of substances across the intestinal epithelium may occur by different routes (Artursson, *et al.*, 2001; Stillhart *et al.*, 2020). Free copper ions can generate free radicals via Fenton and Haber-Weiss reactions (Flemming and Trevors, 1989; Halliwell, and Gutteridge, 1984) and its homeostasis in biological systems is controlled by copper transport proteins (Kaplan and Maryon, 2016; Tennant *et al.*, 2012). It was then of interest to evaluate whether $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ promote changes in mRNA levels of copper transporters. The results shown in figure 4.4 and 4.5 suggested copper-transport processes in differentiated Caco-2 cells.

Figure 4.6 shows that the treatment with copper (II) complexes decreases significantly the relative *CTRI* and *DMTI* transcript levels. *CTRI* is a major transporter of cuprous (Cu^+) ions across the apical membrane of the intestinal cells (Lutsenko, 2010; Kaplan and Maryon, 2016), whereas *DMTI* could be involved in the uptake of divalent ions like cupric (Cu^{2+}) ions (Tennant *et al.*, 2012). It was previously shown that the intra and extracellular copper amounts could modify the gene expression of both copper transporter (Tennant *et al.*, 2012; Lutsenko, 2010). It was also found that the increase of copper concentration in the lumen reduces the absorption of copper through downregulation of *CTRI* expression in enterocytes (Lönnerdal; 2008). Similarly, reduced mRNA levels of *DMTI*, when Caco-2 cells were exposed to a high-copper environment, were observed elsewhere (Gao *et al.*, 2014; Arredondo *et al.*, 2003). It is widely accepted that regulating the expression of these transporters contributes to cell survival and to maintaining copper levels in the organism (Tennant *et al.*, 2012).

In line with the previous observation, the RT-qPCR results reported here showed that the treatment with copper (II) complexes, at both concentrations, decreased the relative *ATP7A* and *ATP7B* transcript levels in differentiated Caco-2 cells compared to untreated control cells. Both ATPases participate in the transfer of

copper across the basolateral membrane into the circulation (Verwilst *et al.*, 2015; Lutsenko, 2010). The under-expression of the relative mRNA levels of these four major copper transporters suggests that the copper (II) found in the BL compartments (Figures 4.3 and 4.5) might not originate from the copper trafficking machinery and supports the use of paracellular pathway by $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ complexes. It cannot exclude that these results are also related to the increase of intracellular copper observed (Figure 4.4), suggesting that differentiated Caco-2 cells can modulate their uptake of copper, thus preventing cell damage.

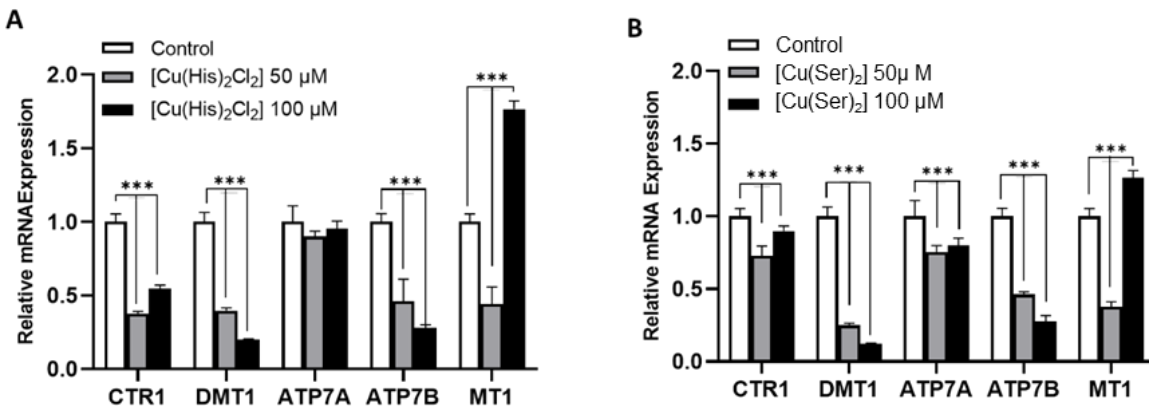


Figure 4.6 The relative gene expression of copper transporters *CTR1*, *DMT1*, *ATP7A* and *ATP7B*, and of metallothionein (*MT*) in differentiated Caco-2 cells treated with A) $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or B) $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ at concentrations of 50 or 100 μM . The gene expression levels of copper transporters and *MT* were evaluated by RT-qPCR. Data are mean \pm SEM of three independent experiments in duplicate ($n = 3$; *** $P < 0.001$; two-way ANOVA multiple comparisons).

On the other hand, a higher expression of *MT* mRNA genes was observed in cells treated with 100 μM of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ or of $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$. It is well known that the gene expression of *MT* is closely related to the metal detoxification (Roesijadi, 1996; Van Den Berghe *et al.*, 2009). Various copper chaperones are involved in copper delivery to its specific target (Kaplan and Maryon, 2016) whereas others, such as *MT*, are involved in maintaining the amount of intracellular copper relatively constant (Van Den Berghe *et al.*, 2009). *MT* diminishes the amount of copper ions available for delivery to the portal vein by binding the copper irreversibly as one of the mechanisms in which the cell is protected from copper toxicity (Verwilst *et al.*, 2015). This opposite responses in *MT* gene expression could be easily correlated with the differences in moderate cytotoxicity of $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ and $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ at 100 μM shown in figure 4.1. Differently, the treatment with 50 μM of copper (II) complexes significantly decrease the relative *MT* transcript level of mRNA in differentiated Caco-2 cells.

4.5.5 Effects of copper (II) complexes on the COX activity.

Cytochrome c oxidase (COX or complex IV) is the terminal enzyme of the electron transport chain. Its catalytic activity requires the insertion of two copper sites (Ruiz *et al.*, 2021). The availability of copper may be directly linked to the electron transfer chain and to the energy demands in the aerobics organisms, through the la modulation of the assembly of COX protein. It was shown that copper deficiency reduces the expression and the activity of complex IV (Ruiz *et al.*, 2014), but not the other respiratory complexes (Zeng *et al.*, 2007). More recent studies showed that the metalation of COX depends on the levels of a copper complex with a yet-unidentified ligand stored in the mitochondrial matrix (Cobine *et al.*, 2006). Hence, it was of interest to evaluate whether the copper (II) complexes reported here can increase the activity of the COX. After the treatment of Caco-2 cells with [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] (10 -100 μM) for 24 h, the COX activity was determined by spectrophotometry following the decrease of absorbance at 550 nm. Figure 4.7 shows that exposure of cells to copper (II) complexes at concentration higher than 50 μM induced an increase of COX activity. The enzyme activity was raised about 2-fold when cells were treated with 50 μM of [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] and about 3-fold at 100 μM of these complexes. It appears that the [Cu(Ser)₂] complex induced more change in enzymatic activity compared to [Cu(His)₂Cl₂]. These results could be related to the fact that bidentate complexes like [Cu(Ser)₂] can exchange copper more easily than tridentate complexes like [Cu(His)₂Cl₂]. Moreover, they fit well the previous studies showing that non-cytotoxic copper treatment was able to improve mitochondrial function by stimulating the biogenesis of COX and of the complex IV assembly in erythropoietin cell lines K562 or in mutant mouse deficient in COA6 cytochrome assembly factor (Ruiz *et al.*, 2016; Ghosh *et al.*, 2014).

The decrease of COX activity has been shown in copper-deficiency diseases such as Menkes disease and hypertrophic cardioencephalomyopathy (Vulpe *et al.*, 1993; Meguro *et al.*, 1991). Consequently, the treatment with copper supplements could improve the conditions of these patients (Deschamps *et al.*, 2005; Freisinger *et al.*, 2014). Therefore, the capacity of [Cu(His)₂Cl₂] and of [Cu(Ser)₂] at 50-100 μM to enhance the activity of COX clearly support the possible use of these complexes in the therapy of copper deficiency diseases. However, a further report will be aimed to the proper gastroprotective formulation of the describe copper complexes. Also, more fundamental research is still needed to understand how these copper(II) complexes may impact on mitochondrial copper machinery.

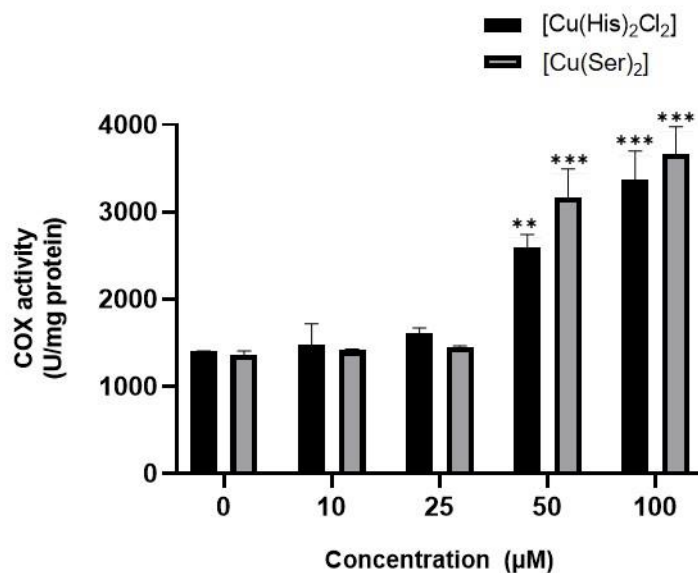


Figure 4.7 Effect of copper (II) complexes on Cytochrome c oxidase (COX) activity in differentiated Caco-2 cells treated with [Cu(His)₂Cl₂] or [Cu(Ser)₂] at concentrations up to 100 µM. Data are mean ± SD of three independent experiments in duplicate (n = 3; **P < 0.01, ***P < 0.001; two-way ANOVA multiple comparisons)

4.6 Conclusion

The data here describe show a good biocompatibility of [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] complexes at concentrations up to 100 µM. The copper(II) complexes were less cytotoxic than CuCl₂ at similar concentrations. The exposure of cells at biocompatible concentrations of copper(II) complexes did not induce significant changes in TEER for the first 6 h of treatment. These results suggest that [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] would not affect the intestinal epithelium during their intestinal transit (same duration of 4.5-6 h). Additionally, the amount of [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] complexes increased in a time-dependent manner on BL sides while decreased on AP compartments suggesting the use of a paracellular route by the copper(II) complexes. These results are particularly important for the future development of a pharmaceutical formulation designed to enhance the transit of copper complexes through the tight junctions (that restrict the paracellular transport of drugs). No significant differences in intracellular copper(II) were observed between 6 h and 48 h. The [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] reduced the transcript levels of the four major copper transporters *CTR1*, *DMT1*, *ATP7A*, and *ATP7B* after 6 h. The increase in *MT* transcript levels could be correlated with the moderate cytotoxicity shown by [Cu(His)₂Cl₂] and [Cu(Ser)₂] at 100 µM. Finally, the exposure of cells to copper(II) complexes at concentrations higher than 50 µM induced an increase in COX activity. Indeed, the rescue of COX activity is particularly useful as approach for the use

of these complexes as therapeutic agents to treat copper deficiency diseases such as Menkes disease and hypertrophic cardioencephalomyopathy..

Acknowledgments

The investigation was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to MAM (Grant No. 06919) and to BA (Grant No 06651) and by the “Fondation Courtois” (QC, Canada) to MAM. BA holds an Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment. MGP was granted a studentship from CERMO-FC. NGS is supported by a doctoral Fellowship from the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT).

CHAPITRE 5
**P19-DERIVED NEURONAL CELLS EXPRESS H₁, H₂, AND H₃ HISTAMINE
RECEPTORS: A BIOPHARMACEUTICAL APPROACH TO EVALUATE
ANTI-HISTAMINE AGENTS**

Mariela Gomez Perez^{1,2}, Georgiana Tanasie^{1,2}, Armelle Tchoumi Neree^{1,2}, Natjara Gonzalez Suarez^{1,4}, Clara Lafortune¹, Joanne Paquin¹, Lucia Marcocci³, Paola Pietrangeli³, Borhane Annabi^{1,4} and Mircea Alexandru Mateescu^{1,2}

¹Department of Chemistry and CERMO FC Center, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada.

²Research Chair on Enteric Dysfunctions “Allerdys”, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada.

³Department of Biochemical Sciences “A. Rossi Fanelli”, Sapienza University of Rome, 00185 Rome, Italy.

⁴Chaire en Prévention et Traitement du Cancer, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada.

Cet article a été publié dans *Amino Acids* 55 (2023) 821-833

DOI: 10.1007/s00726-023-03273-6

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Auteure principale :

Mariela Gomez Perez : Conception du projet ; Méthodologie ; Investigation ; Réalisation de toute l'expérimentation ; Analyse des données ; Rédaction du manuscrit ; Rédaction - révision

Co-auteurs :

Georgiana Tanasie : Méthodologie ; Investigation ; Contribution à la réalisation des expériences ; Analyse des données

Armelle Tchoumi Neree : Méthodologie ; Investigation ; Contribution à la réalisation des expériences ; Analyse des données

Narjara Gonzales Suarez : Méthodologie ; Investigation ; Contribution à la réalisation des expériences (RT-PCR) ; Analyse des données ; Rédaction du manuscrit

Clara Lafortune : Méthodologie ; Investigation ; Contribution à la réalisation des expériences ; Analyse des données

Joanne Paquin : Méthodologie ; Investigation ; Conception du projet ; Analyse formelle ; Acquisition de financement ; Rédaction du manuscrit ; Rédaction - révision

Lucia Marocci : Méthodologie ; Investigation ; Rédaction du manuscrit ; Rédaction - révision

Paola Pietrangeli : Méthodologie ; Investigation ; Rédaction du manuscrit ; Rédaction - révision

Borhane Annabi : Conception du projet ; Investigation, Analyse formelle ; Acquisition de financement ; Méthodologie ; Rédaction du manuscrit ; Rédaction - révision

Mircea Alexandru Mateescu : Investigation ; Conception du projet ; Analyse formelle ; Acquisition de financement ; Méthodologie ; Gestion de projet ; Supervision ; Rédaction du manuscrit ; Rédaction - révision

5.1 Résumé

L'histamine est une amine biogène impliquée dans divers processus biologiques et pathologiques. Des modèles cellulaires pratiques sont nécessaires pour cribler et développer de nouveaux agents antihistaminiques. Ce rapport visait à caractériser la réponse des neurones différenciés des cellules de carcinome embryonnaire P19 de souris au traitement à l'histamine et à étudier la modulation de cette réponse par les médicaments antihistaminiques, la diamine oxydase végétale et la catalase. L'exposition des neurones P19 à l'histamine a réduit la viabilité cellulaire à 65 %. Cet effet implique des récepteurs spécifiques de l'histamine puisqu'il a été prévenu par un traitement à la desloratadine et à la cimétidine, respectivement antagonistes H₁ et H₂, mais pas par l'antagoniste H₃ ciproxifan. L'analyse RT-PCR a montré que les neurones P19 expriment les récepteurs H₁ et H₂, ainsi que le récepteur H₃ bien qu'il ne semble pas impliqué dans l'effet de l'histamine sur ces cellules. Le récepteur H₄ n'a pas été exprimé. Les antagonistes H₁ et H₂ ainsi que la diamine oxydase végétale ont diminué la mobilisation intracellulaire du Ca²⁺ déclenchée par l'histamine. Le traitement avec de la diamine oxydase végétale ou de la catalase protège contre la mortalité et une réduction significative du niveau de H₂O₂, généré par les cellules sous l'action de l'histamine, a été trouvée lors de traitements avec desloratadine, cimétidine, diamine oxydase végétale ou catalase. Dans l'ensemble, les résultats indiquent l'expression des récepteurs fonctionnels de l'histamine et ouvrent la possibilité d'utiliser les neurones P19 comme système modèle pour étudier les rôles de l'histamine, des antihistaminiques et des médicaments apparentés dans la pathogenèse neuronale. Ce modèle est moins coûteux à exploiter et peut être facilement mis en œuvre par les laboratoires d'analyse actuels et par les organismes de recherche sous contrat.

5.2 Abstract

Histamine is a biogenic amine implicated in various biological and pathological processes. Convenient cellular models are needed to screen and develop of new antihistamine agents. This report aimed to characterize the response of neurons differentiated from mouse P19 embryonal carcinoma cells to histamine treatment and to investigate the modulation of this response by antihistamine drugs, vegetal diamine oxidase, and catalase. The exposure of P19 neurons to histamine reduced cell viability to 65% maximally. This effect involves specific histamine receptors since it was prevented by treatment with desloratadine and cimetidine, respectively H₁ and H₂ antagonists, but not by the H₃ antagonist ciproxifan. RT-PCR analysis showed that P19 neurons express H₁ and H₂ receptors, and the H₃ receptor although it seemed not involved in the histamine effect on these cells. The H₄ receptor was not expressed. H₁ and H₂ antagonists as well as vegetal diamine oxidase diminished the intracellular Ca²⁺ mobilization triggered by histamine. The treatment with vegetal diamine oxidase or catalase protected against mortality and a significant reduction of H₂O₂ level, generated from the cells under the histamine action, was found upon treatments with desloratadine, cimetidine, vegetal diamine oxidase or catalase. Overall, the results indicate the expression of functional histamine receptors and open the possibility of using P19 neurons as model system to study the roles of histamine and related drugs in neuronal pathogenesis. This model is less expensive to operate and can be easily implemented by current laboratories of analysis and by Contract Research Organizations.

Keywords: Antihistamine drugs; biogenic amine; catalase; cimetidine; ciproxifan, copper-containing diamine oxidase; desloratadine; histamine; histamine receptors; P19 embryonic carcinoma cells.

Abbreviations: AUC, area under the curve; Ca²⁺, calcium ions; CAT, catalase; CIM, cimetidine; CNS, central nervous system; CPX, ciproxifan; D, day; DAO, diamine oxidase; vDAO, vegetal DAO; DES, desloratadine; DM, differentiation medium; ENS, enteric nervous system; FBS, fetal bovine serum; GFAP, glial fibrillary acidic protein; H₁, histamine H₁ receptor; H₂, histamine H₂ receptor; H₃, histamine H₃ receptor; H₄, histamine H₄ receptor; H-receptor, histamine receptors; HA, histamine; HBBS, Hank's Balanced Salt Solution; H₂O₂, hydrogen peroxide; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HRP, horseradish peroxidase; HVA, homovanilic acid; NF-M, neurofilament M; NO, nitric oxide, NR, neutral red; PBS, phosphate buffered saline; PUT, putrescine; RA, retinoic acid; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, Real-Time polymerase chain reaction; SC, semicarbazide; sodium dodecylsulfate, SDS; SYP, synaptophysin.

5.3 Introduction

Histamine is involved in various physiological and pathological processes. This biogenic amine stimulates gastric secretion and modulates the immune system activating inflammatory processes (Rocha *et al.*, 2014; Branco *et al.*, 2018). The excess of exogenous histamine can generate pseudo allergies, whereas endogenous excess is associated with allergic phenomena and anaphylaxis (Kemp *et al.*, 2002; Maintz *et al.*, 2007). Histamine modulates heart rate and contractility, vasodilatation, and paracellular permeability (Obara *et al.*, 2020). It acts on neurons of the enteric nervous system (ENS) with effects on smooth muscle and intestinal contraction (Spencer *et al.*, 2020), and as a neuromodulator/neurotransmitter in the central nervous system (CNS). Histamine is involved in the sleep waking cycles, synaptic plasticity, learning, and in neurological disorders such as migraine, neuroinflammation, epilepsy, brain infarction (Haas *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2018), indicating the importance of drug development targeting the brain histamine system.

In the CNS, histamine synthesized by the enzymatic decarboxylation of L-histidine, is stored in synaptic vesicles via vesicular monoamine transporter 2 in histaminergic neurons. Upon stimulation, histamine is released to extra neuronal spaces and exerts its effects through interactions with histamine receptors (H-receptors) (Brown *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2018). Four histamine receptors (H₁-H₄) have been identified. In general, H₁, H₂, and H₃ are distributed in various tissues including the brain and the ENS while H₄ is found mostly on immune and intestinal cells. In the CNS, H₁ and H₂ are postsynaptic receptors present on neurons. Their activation by micromolar histamine levels excites neurons or potentiates excitatory inputs (Panula, 2021). Effects driven by histamine may interfere with cellular survival. Activation of H₁ and H₂ receptors in CNS neurons causes the release of calcium ions (Ca²⁺) from the endoplasmic reticulum followed by the production of arachidonic acid, nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) (Molina-Hernández *et al.*, 2008; Shahid *et al.*, 2009; Panula *et al.*, 2015). The production of ROS is controlled by defense systems which can involve superoxide dismutase, catalase (CAT), glutathione peroxidase, and glutathione reductase (Halliwell, 2007; Flora, 2009). H₃ is a pre- and postsynaptic receptor mainly present on astrocytes and histaminergic neurons (Tiligada *et al.*, 2011; Panula *et al.*, 2015; Panula, 2021). Its activation by nanomolar histamine regulates the release and synthesis of this biogenic amine (Schwartz *et al.*, 1991; Leurs *et al.*, 2012). In these cells, histamine is internalized via organic cation transporter 3 (OCT3) and via plasma membrane monoamine transporters (PMAT) and finally metabolised by histamine N-methyltransferase (Duan *et al.*, 2010; Yoshikawa *et al.*, 2019).

Antihistamine agents targeting H-receptors, such as desloratadine (DES), cimetidine (CIM) or ciproxifan (CPX) have been developed to alleviate histamine-induced dysfunctions (Leurs *et al.*, 2005; Canonica *et al.*, 2011; Jafarzadeh *et al.*, 2019). The spectrum of histamine functions in the CNS has been greatly

expanded during the last decades. However, much remains to be learned about H-receptors with respect to the development of new and improved antihistamine agents for histamine dysfunctions that cause pathophysiological processes in neurons. The use of convenient cellular models in preclinical studies is suitable for the development of new drugs. P19 embryonal carcinoma cells have been used extensively to generate the P19 neuronal model due to the ability of these cells to differentiate into neurons in culture (McBurney *et al.*, 1988). These P19 neurons can mimic those of the CNS based on the spectra of neurotransmitters and neuropeptides they produce (Staines *et al.*, 1994; Ulrich *et al.*, 2006). Previous works mentioned functional H₁ receptors on undifferentiated P19 embryonal carcinoma cells (Bloemers *et al.*, 1993), whereas our report is on P19 differentiated neurons. More recently, Molina-Hernández *et al.*, (2008) have used E14 embryos extracted from pregnant Wistar rats to obtain multipotent neural stem cells. This is a longer and probably more expensive method. The advantage of cultured P19 differentiated neurons for serial drug evaluation of antihistamine drugs is that the whole procedure is shorter, easier to operate and avoids regulatory limitations for the use and handling of animals. Since the ENS contains a diversity of neurons, it is not excluded that P19 neurons could further serve as a model for the investigations of this system embedded in the lining of the gastrointestinal tract, which contains many of the neurotransmitters and neuropeptides found in the CNS (Furness. 2000; Mittal *et al.*, 2017; Kulkarni *et al.*, 2018; Spencer *et al.*, 2020).

Considering that neurons in the CNS and the ENS express H₁, H₂ and H₃ receptors (Breunig *et al.*, 2007), it was of interest to investigate to which extent P19 neurons can serve as a model to evaluate the effect of histamine and of antihistamine agents involved in the treatment of histamine-induced dysfunctions. Also, as histamine antagonists may have undesirable side effects, vegetal diamine oxidase (vDAO), such as that from *Fabaceae*, was suggested as an alternative treatment to alleviate various histamine-related dysfunctions associated with allergic conditions (Mondovi *et al.*, 2013) and intestinal disorders (Neree *et al.*, 2020). This enzyme (EC 1.4.3.22), in fact, can catalyze the oxidative deamination of histamine to the corresponding aldehyde, with the production of H₂O₂ and NH₃. It also reduces neutrophil activation (Pietrangeli *et al.*, 2020) and the consequent cellular oxidative damage (Masini *et al.*, 2007). The aim of this work was thus to characterize the response to histamine of cultured P19 neurons and the modulation of this response by three common antihistamine agents (DES, CIM and CPX) as well as by vDAO or CAT.

5.4 Materials and Methods

5.4.1 vDAO purification and characterization

The vDAO was purified from *Lathyrus sativus* seedlings as previously reported (Blemur *et al.*, 2016), but samples were homogenized in 50 mM phosphate buffer (pH 5.5) containing 200 mM NaCl. The vDAO

samples were lyophilized and stored at -80°C until characterization. They contained 0.35 ± 0.05 mg protein/mg solid, as determined by the Bio-Rad assay with bovine serum albumin (BSA) as the standard. The vDAO specific activity of 19.0 ± 2.6 U/mg solid was measured as reported (Jumarie *et al.*, 2017). One enzyme unit was the amount of DAO enzyme able to catalyse the oxidation of $1\ \mu\text{mol}$ of putrescine substrate per minute.

5.4.2 Cell culture

Murine P19 embryonal carcinoma cells (1×10^6) were cultured in 100 mM tissue-grade Petri dishes (Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada) containing 10 mL complete alpha-Modified Eagle's Essential Medium (α -MEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Wisent Inc, St-Bruno, QC, Canada), 50 U/mL penicillin and 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada, Oakville, ON, Canada) at 37°C in a 5% CO_2 -95% humidified air atmosphere. Cells were passaged every two days by trypsinization (0.025% v/v trypsin-1 mM EDTA; Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) (Ducharme *et al.*, 2010). The P19 cell line was obtained from Dr. M. W. McBurney (Université d'Ottawa, Ottawa, ON, Canada).

Neuronal differentiation was carried out by culturing P19 cells for 4 days in the presence of retinoic acid (RA) (McBurney *et al.*, 1988). Briefly, 1.5×10^6 cells were seeded in a 100 mM diameter bacteriological Petri dish (Fisher Scientific Montreal, QC, Canada) containing 10 mL of differentiation medium [DM: α -MEM supplemented with 5% (v/v) FBS, 5% (v/v) newborn calf serum (Wisent Inc, St-Bruno, QC, Canada), 50 U/mL penicillin, 50 $\mu\text{g/mL}$ of streptomycin and 0.5 μM all-trans-RA (Sigma-Aldrich Oakville, ON, Canada)]. After two days the differentiation medium containing RA was refreshed, and the cells were incubated for two more days. During the four days (D0 – D4) of exposure to RA, the cells differentiated while forming floating spheroids in the DM. At D4, the cellular suspensions were collected and incubated at room temperature for about 5 min to allow the sedimentation of the spheroids which were then resuspended in phosphate buffer saline [PBS: NaCl 0.8% (w/v), KCl 0.02% (w/v), KH_2PO_4 0.02% (w/v), Na_2HPO_4 0.12% (w/v), pH 7.3)] and sedimented again. After repeating this procedure for three times, the sedimented spheroids were dissociated by adding 2 mL of 0.025% (v/v) trypsin-1 mM EDTA. Then 2 mL DM not containing RA was added to stop the reaction. Cell suspension was centrifuged for 1 min at 1000g, then resuspended in synthetic medium [α -MEM supplemented with 5 $\mu\text{g/mL}$ transferrin, 1 $\mu\text{g/mL}$ insulin (Fisher Scientific Montreal, QC, Canada), 50 U/mL penicillin, and 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin].

5.4.3 Cell treatment with antihistamine drugs, vDAO and CAT and H₂O₂

D4 resuspended cells were seeded (3.8×10^5 cells/well) in gelatinized 12 well-plates containing 2 mL of synthetic medium and incubated at 37° C in a 5% CO₂ and 95% humidified air atmosphere for two days (D6). After this period, the culture medium was then renewed, and histamine, DES, CIM, CPX, vDAO, bovine liver catalase (CAT), putrescine (PUT), semicarbazide (SC) or hydrogen peroxide (H₂O₂) prepared in PBS, were added alone or in association with HA for the times and the final concentrations indicated in the figures. As controls, vDAO and CAT inactivated by heating at 60° C for 10 minutes (Andrews *et al.*, 1979; Mondovi *et al.*, 1992) were also used. All agents, except vDAO, were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Cell phenotypic analysis, cell viability and RT-PCR assay of H-receptors were then performed as indicated below.

5.4.4 Cell phenotypic analysis by immunoblotting

For analysis of phenotypic markers, cells differentiated by RA for 4 days (D4) and collected as above reported were seeded in 4 mL of synthetic medium in 60 mm-diameter tissue-grade Petri at densities varying from 1.47×10^6 to 0.37×10^6 cells/Petri according to the duration of the subsequent cultures (D6 - D12). Densities were adjusted to obtain similar final cell confluences between cultures while avoiding reseeding which could have disturbed cell culture composition. The synthetic medium was refreshed every two days. At different intervals of time, cells were washed in PBS and lysed for 30 min, 4° C, in radioimmunoprecipitation buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6, 1% (w/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) deoxycholate and 0.1% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS) (w/v)] containing 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF and 1/300 protease inhibitors Cocktail-1 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). The resulting cell protein extracts were analyzed for their protein contents using a bicinchoninic acid microassay kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA), and submitted to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, electrontransfer, and immunoblotting procedures as described by Ducharme *et al.*, (2010) with few modifications. Briefly, protein samples migrated for 15 min at 100V and 1.25 h at 150V through 10% polyacrylamide gels and were then transferred from gels onto polyvinylidene difluoride membranes for 35 min at 15V in transfer buffer [10 mM Tris, 96 mM glycine, 0.01% SDS (w/v) and 20% (v/v) methanol]. After transfer, membranes were washed and incubated with antibodies in TBS-Tw buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, and 0.1% Tween-20 (v/v)] supplemented with 3% (w/v) bovine serum albumin. Primary antibodies were used in the indicated dilutions: mouse IgG₁ anti-neurofilament-M (NF-M; 1/1000; Cat. No. 2838; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); mouse IgG anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1/400; Cat. No. G3893; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada); rabbit IgG anti-synaptophysin (SYP; 1/200; Cat. No. sc9116; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and mouse IgG anti-β-Actin (1/10000; Cat. No. A5441; Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada). Secondary

antibodies, conjugated to horseradish peroxidase were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Mississauga, ON, Canada (Cat. Nos. 115-035-062 and 711-035-152; 1/2500 each). Immune complexes were revealed with Immobilon Western Chemiluminescent Substrate (Millipore, Nepean, ON, Canada) and exposed to HyBlot CL films (Denville Scientific Inc., Toronto, ON, Canada) or to a Fusion FX7 imaging system (MBI, Montreal, QC, Canada).

5.4.5 Cell viability assay

The viability of the cells following treatments was measured by the neutral red (NR) assay (based on the accumulation of the dye via active transport in the lysosomes of live cells (Perez *et al.*, 2017). At the end of the treatments, above indicated, cells were delicately pre-washed with PBS, then 1 mL of 20 mM HEPES, pH 7.4 containing 138 μ M NR, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂ and 20 mM D-glucose, was added to each culture well. After 2 h of incubation at 37° C and under 5% CO₂, the solution was removed, and cells were washed rapidly with 1 mL of solution containing 1% formaldehyde (v/v) and 1% CaCl₂ (w/v). NR contained in the cells was then extracted by incubation for 10 min, under agitation, with 1 mL of ethanol: H₂O: acetic acid solution (50:49:1), and the absorbance read at 540 nm using a microplate reader (Molecular SpectraMax EM Microplate Reader, CA, USA). The viability of cells was calculated as percentages, referring to the absorbance of untreated living cells. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). The half maximal effective concentration (EC₅₀) was estimated as the concentration of HA which induced a response halfway between maximum of viability and the baseline when viability remained constant after a 48 h of exposure to HA.

5.4.6 RT-PCR assay of H-receptors

At the end of exposure time to histamine alone or in association with DES, CIM or CPX, the total RNA was isolated from the cell pellets using 1 mL TRizol reagent per well (LiTechnologiesies, Gaithersburg, MD, USA). Next, 1-2 μ g of RNA was reverse-transcribed to cDNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and following the manufacturer instructions. Real-Time polymerase chain reaction (RT-PCR) was then performed to determine the gene expression level of the H₁, H₂ and H₃ receptors using the SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and 30 cycles of amplification in a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, version 2.1). The resulting amplification products were detected by measuring the fluorescence elicited by the binding of the SYBR Green dye to the double stranded DNA. QuantiTect primers for H₁ (Hrh1_PPM04806B), H₂ (Hrh2_PPM04805A) H₃ (Hrh3_QT00158375) and H₄ (Hrh4_PPM04894A) receptors were purchased from Qiagen (Montreal, QC, Canada). The RPS18 (RRN18S_QT00199367) and Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA_QT01866137) were included as house-keeping genes. Finally, RT-PCR amplicons

were electrophoresed, adding molecular weight standards (FroggaBio, Concord, ON, Canada) on a 2% agarose gel, visualized with GreenGlow™ (Denville Scientific Inc., Saint-Laurent, QC, Canada) and using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

5.4.7 Cellular Ca²⁺ mobilization

Cells, grown in synthetic medium for two days (D6) were exposed for 1 h to Hank's Balanced Salt Solution containing 10 mM HEPES, pH 7.2 (HBBS-HEPES) and 1 μM Fluo-4 acetoxymethyl ester calcium probe (Fluo-4 AM; Thermo Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada), 1 μM pluronic acid F127 (Thermo Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada), 2.5 mM probenecid (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada-Aldrich) at 37° C in a 5% CO₂-95% humidified air atmosphere. Then, the cells were washed three times with HBBS-HEPES and maintained in 1 mL of the same buffer for 30 min. Cells were then added with 100 μM histamine in the absence or presence of 5 μM DES, 0.1 μM CIM or 0.4 μM vDAO and fluorescent images were acquired by a confocal microscopy by measuring the fluorescence of Fluo4-Ca²⁺ signal at 525 nm, upon excitation at 488 nm. Nikon A1 confocal microscope equipped with a 10X objective (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada) was used. The acquisition was operated in kinetic scan mode, at 2.5 min with a rate of 2 seconds per scan, a pinhole diameter of 11.9 μm, a detector sensibility or high voltage of 45 and an offset of -5. The ImageJ software (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) was used to quantify the Ca²⁺-fluorescence. Results are expressed as area under the curve (AUC) for the first 120s following the addition of HA.

5.4.8 H₂O₂ spectrofluorimetric assay

The generation of H₂O₂ was measured using a spectrofluorimetric assay based on the oxidation of homovanilic acid (HVA) under the catalysis of horseradish peroxidase (HRP) forming a fluorescent dimer in the presence of H₂O₂ (Baggiolini *et al.*, 1986). Briefly, Day 6 P19 neuron cultures, obtained as described above, were delicately prewashed with PBS and received 1.75 mL of a reaction mixture containing HVA (100 μM)-HRP (1U/mL) in HBSS. The reaction was started by the addition of 0.25 mL of HA (100 μM in HBSS) alone or in association with DES (5 μM), CIM (1 μM) or CPX (0.01 μM). The blank control cultures received HBSS alone and the positive control cultures received HBSS containing 10 nmol H₂O₂. Cultures treated with DES (5 μM), CIM (1 μM) or CPX (0.01 μM) in the absence of HA were also included for comparison. After a 4 h of incubation at 37°C, 5% CO₂, the reaction was stopped with 0.25 mL of 0.1M NaOH (pH 12). The reaction mixtures were collected, centrifuged for 10 min at 1200g, and their fluorescence measured at 25°C in a PerkinElmer LS45 fluorimeter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), using 315 nm (excitation) and 425 nm (emission) wavelengths. The standard curves were performed in the absence of cells. The standard solutions were prepared by the addition of 0.25 mL HBSS alone (blank) or

containing 0.1 to 10 nmol H₂O₂, to 1.75 mL of HBSS containing HVA (100 μM)-HRP (1U/mL). The reaction was stopped after 4 h by the addition of 0.25 mL of 0.1M NaOH. The fluorescence value of each culture sample and standard solution was corrected from that of its own blank before its report to the standard curve. Upon verification, there was no background fluorescence in these additional blanks: H₂O₂ ± cells, HVA± cells, HRP ± cells, (HVA + HRP) ± cells, (H₂O₂ + HVA) ± cells, and (H₂O₂ + HRP) ± cells.

5.4.9 Statistics

All experiments used a minimum of three replicates. Where relevant, data are expressed as the mean ± SD. Statistical tests were performed with the GraphPad software, using either 1-way, 2-way ANOVA (for comparison between 3 groups) or 2-tailed Student's t-test (for comparison between 2 groups). Differences were deemed statistically significant when the associated P-value was lower than 0.05 (P < 0.05).

5.5 Results and Discussion

5.5.1 Differentiation of cultured P19 cells into neurons by retinoic acid

The treatment of mouse P19 embryonal carcinoma cells with RA for four days have been reported to induce their differentiation into a population of cells consisting of neurons and other cell types such as fibroblasts and glial cells. Neurons express a variety of neuronal markers, develop neurite processes presenting characteristics of axons and dendrites, and form synapses (Staines *et al.*, 1994; Poirier *et al.*, 2006). Immunoblotting analysis of NF-M neuronal marker showed the presence of neurons from D6 to D12, the last day analysed (Figure 5.1).

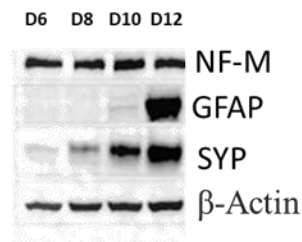


Figure 5.1 Time course of the expression of phenotypic markers in P19 neuron cultures. A representative immunoblot of 3 independent studies. β-Actin was used as a protein loading control

Neurons mature in these cultures as indicated by the increasing levels of SYP synaptic marker (Figure 5.1). The GFAP glial marker was almost undetectable until D10 indicating a very low number, if not the absence

of astrocytes in the cell populations during this time interval (Figure 5.1) This is in line with our reported immunofluorescence studies showing that D10 RA-treated cultures contain mainly neurons since about 95% of the cells expressed the neuronal nuclear marker NeuN and about 5% were GFAP positive (Poirier *et al.*, 2006). As our objective was to characterize the response to histamine of cultured P19 neurons in absence of astrocytes, the following studies were carried out with D6 cultures. This is pertinent to the fact that astrocytes participate in the regulation of histamine metabolism and function (Jurič *et al.*, 2016; Otsuka *et al.*, 2022).

5.5.2 Loss of cell viability in P19 neurons treated with histamine

The incubation of D6 P19 neurons with histamine for 48 h caused a loss of viability (Figure 5.2A). Indeed, viability dropped to 65% in a histamine-dependent concentration for up to 100 μ M histamine. The EC50 value of this histamine effect was $54.1 \pm 1.2 \mu$ M, that is the concentration for the median value between 100% and 65% viability (or between 0% and 35% mortality). This calculation considers that the loss of viability remained constant ($64 \pm 2\%$) for concentrations equal to or higher than 100 μ M histamine. This behavior differs from what was previously observed with Caco-2 cells, in which the loss of viability consistently increased with the concentration (Jumarie *et al.*, 2017).

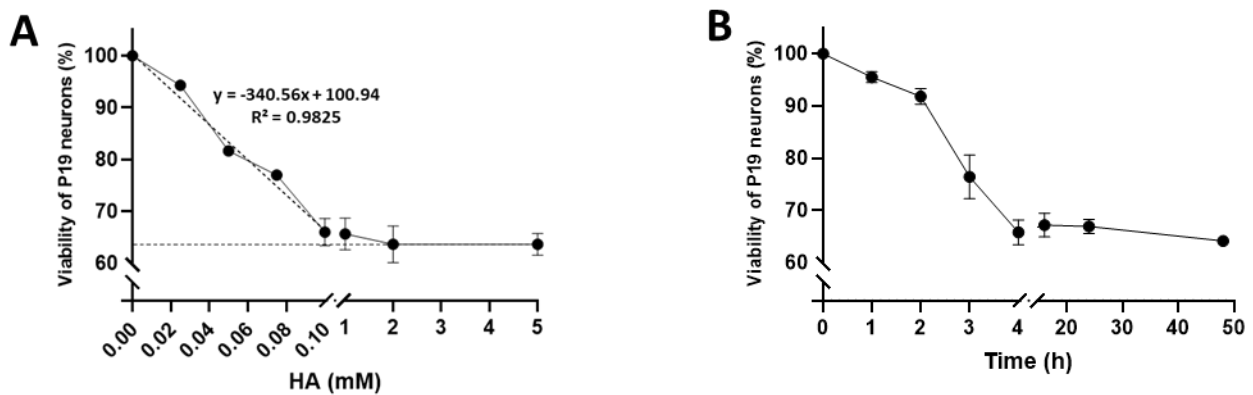


Figure 5.2 Effect of histamine on P19 neurons viability: (A) D6 P19 neurons were treated for 48 h with various concentrations of histamine (HA) and analyzed for viability. The dotted lines show the linear relationship of histamine action at concentrations $\leq 100 \mu$ M, and the plateau effect at higher concentrations. (B) Time course of P19 neurons viability upon exposure to 100 μ M histamine at D6. Data are means \pm SD of 3 independent experiments and reported as percentages of untreated control cultures.

The results here reported suggest that 65% of the cells remained unaffected or cannot respond to histamine action. This would be in line with the fact that, like primary neuronal cultures, P19 neuronal cultures contain mixed populations of neurons (McBurney *et al.*, 1988). Another possibility is that the H-receptors are progressively impacted by the amount of histamine administered. When the whole amount of H-receptor is

saturated, a larger amount of histamine would not generate a further decrease of viability. Accordingly, in the present work, 100 μM histamine was chosen as the reference concentration to carry out subsequent tests.

The time-dependent effect of 100 μM histamine was also analyzed. As reported in Figure 5.2B, histamine caused a marked linear decrease in cell viability during the first 4 hours of exposure. Then, cell viability remained constant (about 65%) for up to 48 h. It is not excluded that the first step of HA impacting the H-receptors was followed by a period related to an arrest of signalization. The effect of histamine on neuronal viability could involve its metabolites or its receptors. This possibility has been next evaluated.

5.5.3 No involvement of DAO activity in the histamine-induced loss of cell viability

The histamine effect on the viability of P19 neurons could have been related to: (i) the oxidative deamination of this biogenic amine by an endogenous DAO which would have produced cytotoxic H_2O_2 , imidazole-4-acetaldehyde and NH_3 or (ii) the activation of H-receptors leading to the release of ROS, and nitric oxide (NO). To investigate the possible involvement of an endogenous DAO, P19 neurons were treated with putrescine (PUT) and semicarbazide (SC) (Figure 5.3). The DAO can metabolize not only histamine but also putrescine (the substrate for which DAO displays the highest rate of enzymatic oxidation (Pietrangeli *et al.*, 2007). Also, as a copper enzyme, DAO is inhibited by semicarbazide (Obata, 2002).

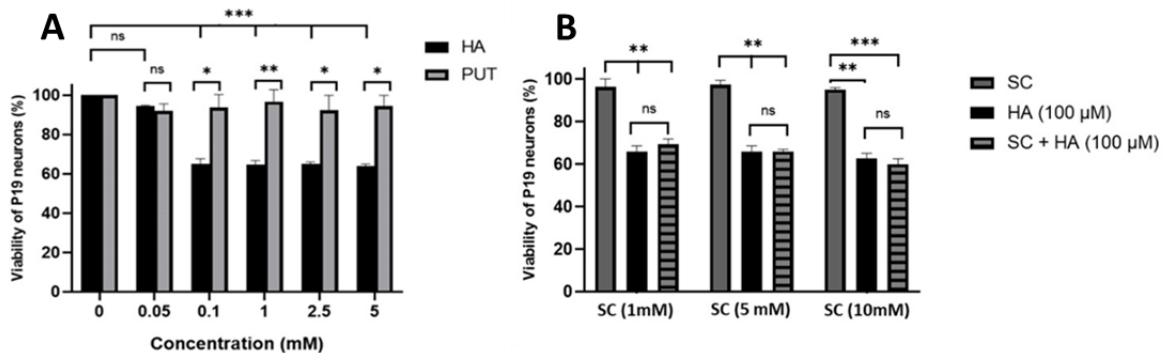


Figure 5.3 Effect of putrescine and semicarbazide in relation with the action of histamine on P19 neurons viability. Cells were incubated for 4 h in the presence of histamine (HA) or putrescine (PUT) at different concentrations (A), or in the presence of 100 μM of histamine with or without semicarbazide (SC) at various concentrations (B). Data are means \pm SD of 3 independent experiments in duplicate and reported as percentages of untreated control cultures (n = 3; ns: non-significant; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; two-way ANOVA multiple comparisons)

Figure 5.3A presents the comparative effects on cell viability of HA and PUT used at the same concentrations. PUT did not affect the viability of cells despite its higher degradation by DAO. As already observed above, the viability of cells decreased to 65% for histamine concentrations ≥ 0.1 mM. On the

contrary, PUT presented good biocompatibility, preserving cell viability even at concentrations up to 5 mM. These data suggest that the decreased viability was specifically related to histamine only and not to putrescine. Moreover, if an endogenous copper-containing DAO was present on P19 neurons, this DAO would have modulated the viability of P19 neurons, and this modulation would have been modified in the presence of SC known as a specific inhibitor of copper-containing enzymes and is largely used to confirm the presence of these enzymes in biological systems (Obata. 2002).

Practically, Figure 5.3B shows that SC itself (1-10 mM) was not toxic to cells. Furthermore, SC did not prevent the loss of cell viability induced by histamine since the viability remained at about 65%. Therefore, the results with SC provided an argument supporting the absence of an endogenous DAO and agreed with other data showing that DAO expression in the CNS is low or absent (Yoshikawa *et al.*, 2019). Data of this section indicated that the toxic effect of histamine was not related to its degradation by an endogenous DAO but involved other cellular mechanisms such as activation of receptors.

5.5.4 Involvement of H-receptors in histamine-induced loss of cell viability

To evaluate the involvement of H-receptors in histamine-induced loss of cell viability, P19 neurons were treated with H₁ (DES), H₂ (CIM) or H₃ (CPX) antagonists for 4 h, in the presence of 100 μM histamine (Figure 5.4). DES is known as a non-competitive antihistamine agent acting on H₁ by binding to a site different from that of histamine binding site (Agrawal, 2001) and CIM is a competitive inhibitor of H₂ (Jafarzadeh *et al.*, 2019). CPX is considered as a potent and selective H₃ antagonist/inverse agonist that binds to the histamine binding site on the receptor (Leurs *et al.*, 2005). None of the three antihistamine agents exerted a toxic effect by themselves (Figure 5.4).

Both DES and CIM decreased the histamine-induced loss of viability in an apparent concentration-dependent manner, with a complete abolition of the cytotoxic effect at concentrations greater than 0.1 μM (Figure 5.4A, B). The apparent EC₅₀ values for this protection were about 0.044 ± 0.01 μM and 0.059 ± 0.005 μM respectively. Differently, CPX did not alleviate the loss of cell viability triggered by histamine (Figure 5.4C). These results point to the activation of H₁ and H₂, but not H₃, as being involved in the neuronal cytotoxic effect of histamine.

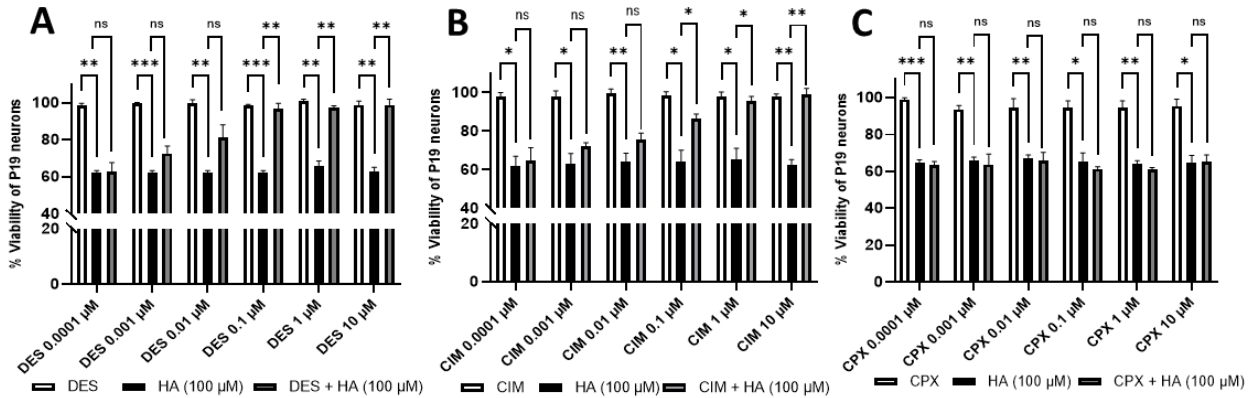


Figure 5.4 Effect of histamine (HA, 100 μM) on cell viability after 4 h of treatment in the absence or presence of the antihistamine agents: Desloratadine (DES) (A) Cimetidine (CIM) (B) and Ciproxifan (CPX) (C). Notice the absence of an effect on viability for DES, CIM and CPX used alone (A, B, C). Data are means \pm SD of 3 independent experiments in duplicate ($n = 3$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; two-way ANOVA multiple comparisons)

5.5.5 Histamine-induced cellular Ca^{2+} mobilization

The activation of H_1 and H_2 has previously been reported to trigger Ca^{2+} mobilization from the endoplasmic reticulum stores (Jones *et al.*, 2011) through the activation of the phospholipase-C pathway (Panula *et al.*, 2015; Obara *et al.*, 2020). The activation of $\text{G}\alpha_{i/o}$ proteins may lead to the mobilization of intracellular Ca^{2+} levels upon the activation of H_3 (Bongers *et al.*, 2007). Since, the H_3 receptor did not seem to be involved in the loss of neuron viability by histamine stimulus (Figure 5.4C), the modulation of Ca^{2+} mobilization under histamine stimulation by CPX was not included. The concentrations used of DES and CIM were higher than their respective Kd values ($\text{Kd} = 1.1$ for DES (Anthes *et al.*, 2002); $\text{Kd} = 0.8 \mu\text{M}$ CIM (Khateb *et al.*, 1995), to afford a possible saturation of receptors by this antihistamine agents. The fluorescence measurements of intracellular Ca^{2+} level showed that Ca^{2+} mobilization was induced by exposure to histamine (Figure 5.5A). This was significantly attenuated when cells were co-treated with histamine and the antihistamine DES (Figure 5.5B, C) or CIM (Figure 5.5B, D). These results support the hypothesis of the presence of H_1 and H_2 in P19 neurons and their involvement in histamine-induced Ca^{2+} mobilization. The Ca^{2+} signal induced by histamine was also lowered by the addition of vDAO (Figure 5.5B, E) which should be due to the oxidative decomposition of histamine by this enzyme. Overall, it appears that P19 neurons express functional H_1 and H_2 receptors and their inhibition or blockage is sufficient to abolish the histamine-induced loss of neuronal viability.

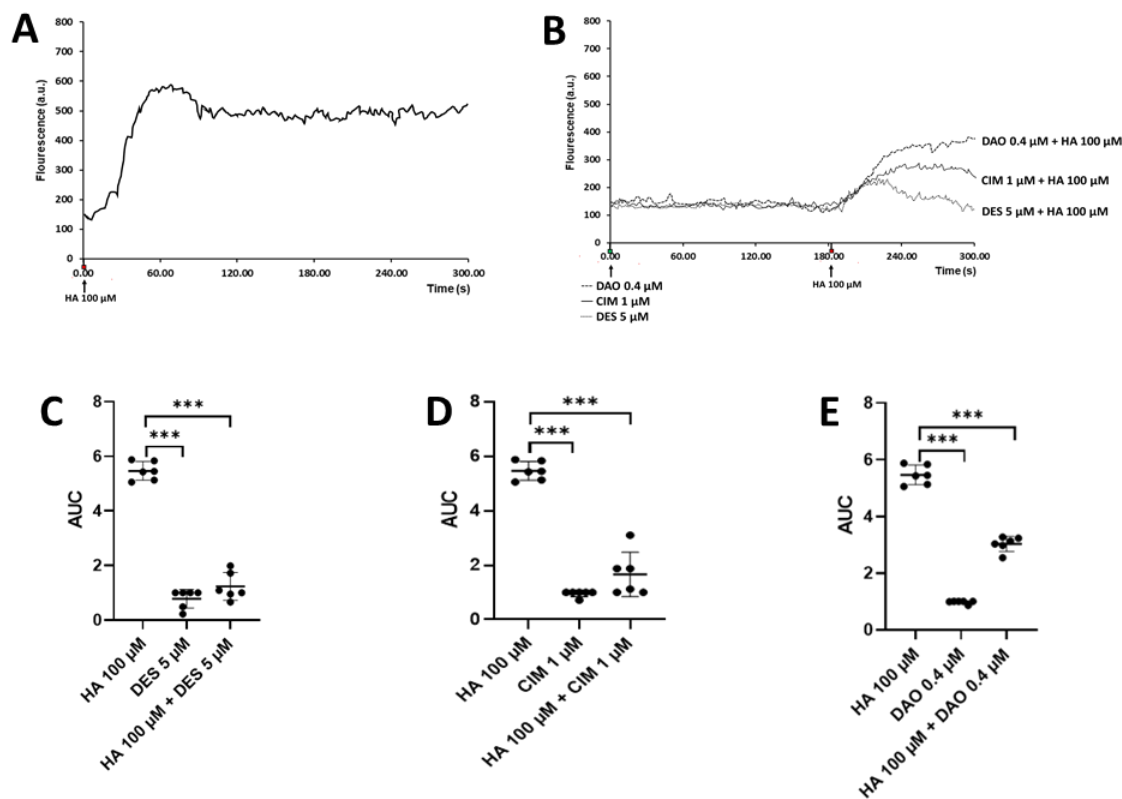


Figure 5.5 Effect of histamine, antihistamine drugs and vDAO on intracellular calcium levels in P19 neurons. Neurons were pre-loaded with the Fluo-4AM calcium probe before treatment with the different agents. Time-course of fluorescence profile related to Ca^{2+} mobilization induced by histamine (HA, 100 μM) stimulation alone (A) or following a 180s pretreatment with DES (5 μM), CIM (1 μM) or vDAO (0.4 μM) (B) as measured by real-time confocal microscopy. The quantified area under the curve (AUC) was obtained by ImageJ software (C, D, E). Data are expressed as means \pm SD of at least three experimental runs in duplicate ($n = 3$; *** $P < 0.001$; two-way ANOVA multiple comparisons)

5.5.6 Expression of H_1 , H_2 and H_3 receptors in P19 neurons

We used RT-PCR to address whether P19 neurons do express H-receptors (Figure 5.6). The presence of H_1 , H_2 and H_3 was clearly revealed by the generation of specific amplicons of the expected sizes (73 bp for H_1 , 137 bp for H_2 and 87 bp for H_3). The expression of the H_1 receptor has been reported in undifferentiated P19 cells (Bloemers *et al.*, 1993) but, to the best of our knowledge, this is the first report of the expression of H_1 , H_2 and H_3 receptors in P19 neurons. On the contrary, H_4 seemed to not be expressed in view of the absence of specific amplicons (84 bp for H_4) (Figure 5.6D).

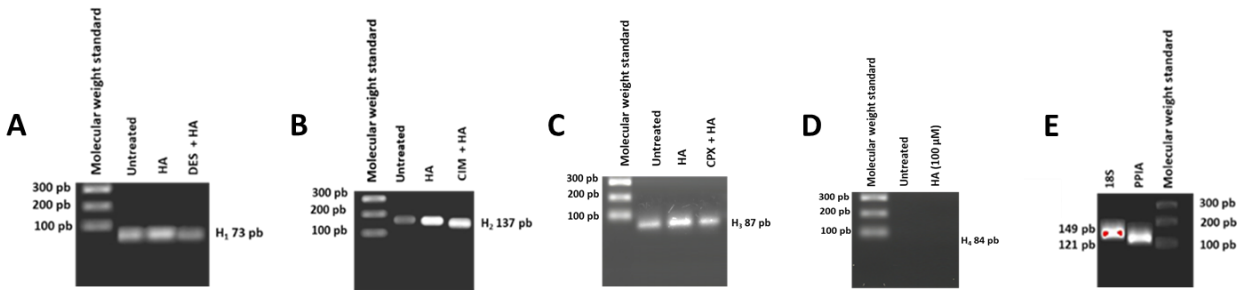


Figure 5.6 Agarose gels of H₁ (A), H₂ (B), H₃ (C) and H₄ (D) amplicons obtained by RT-PCR analysis. P19 neurons were incubated for 4 h with histamine (HA, 100 μM) in the absence or presence of DES (1 μM), CIM (0.1 μM) or CPX (0.01 μM). The 18S was used as endogenous RNA standard and Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) as an internal standard (E). The gels are representative of three repeated experiments

5.5.7 Modulation of histamine effect on P19 neurons by exogenous diamine oxidase and catalase

To evaluate whether the effect of histamine on cell viability is derived from the H₂O₂ produced from its own interaction with H-receptors, we next treated cultured P19 neurons with vDAO (acting on histamine) or with CAT (decomposing H₂O₂).

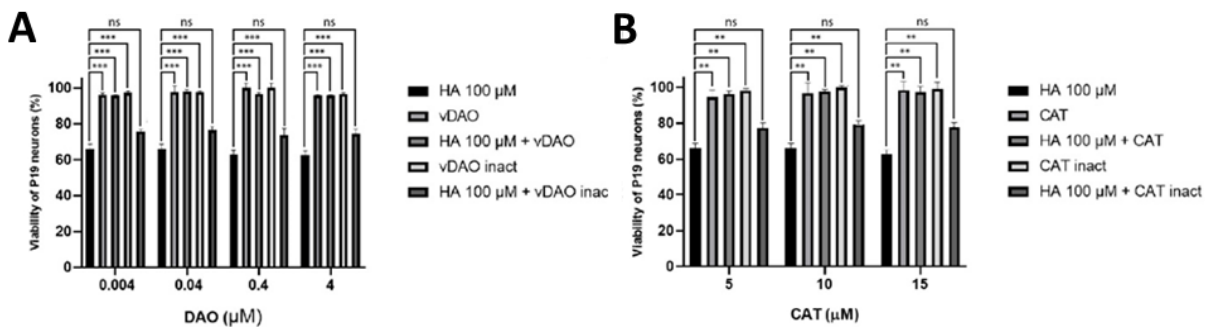


Figure 5.7 Effect of vDAO and CAT on histamine induced loss of neuron viability. P19 neurons were treated for 4 h with 100 μM histamine (HA) in the absence or presence of active or heat-inactivated vDAO (A) or CAT (B), at various concentrations. The results (means ± SD of 3 independent experiments in duplicate) are reported as percentages of untreated cells (n = 3; ** P < 0.01, *** P < 0.001; two-way ANOVA multiple comparisons

Figure 5.7A shows that vDAO alone, whether active or inactivated, did not alter cell viability. When associated to histamine, vDAO under its active form (even at nanomolar concentrations), almost completely canceled the toxic effect of histamine. This protection tended to slightly diminish at higher concentrations, possibly due to the production of H₂O₂ by its oxidase reaction and was abolished in the case of inactivated vDAO indicating that the involvement of its enzymatic activity is requested for this protection.

Figure 5.7B shows that active and inactivated CAT alone did not affect cell viability and that active CAT protected P19 neurons against histamine toxicity. These results suggest an involvement of H₂O₂ generated by the cells in histamine toxicity. The activation of H-receptors triggers a series of reactions leading to the generation of ROS, NO, and H₂O₂ that are detrimental to cells since they can cause *in situ* oxidative damage to cell structures or components such as membranes, proteins, and DNA. Previous studies have shown that histamine induced the production of ROS in N9 microglial cell line and in primary murine microglia cells via the activation of H-receptors by 100 μM histamine (Rocha *et al.*, 2016). This concentration was the same as that used in this report. Also, Medina *et al.*, (2009) showed that histamine (100 μM) stimulated the production of H₂O₂ in WM35 melanoma cells and this effect was reversed by CAT treatment.

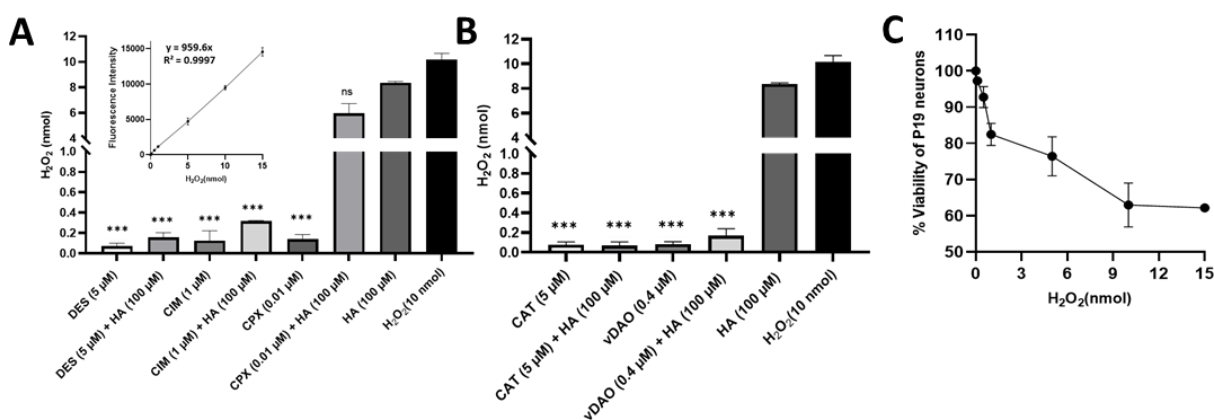


Figure 5.8 Production and toxic effect of the H₂O₂ in P19 neuronal cultures. Determination of H₂O₂ released *in vitro* by P19 neurons after 4 h of treatment with histamine (HA, 100 μM) in the presence or in the absence of the antihistamine agents: (A) Desloratadine (DES), Cimetidine (CIM) or Ciproxifan (CPX), or (B) Catalase (CAT) or vDAO, using a H₂O₂ standard curve (inset in A). The 10 nmol H₂O₂ standard were included as positive control. It was noticed the low levels of H₂O₂ production when DES, CIM, CPX, CAT and vDAO were used alone. (C) Effect of H₂O₂ (0-15 nmol) on cell viability. The results are means ± SD of 3 independent experiments done in duplicate (n = 3; *** P < 0.001; one-way ANOVA multiple comparisons)

To investigate if histamine should stimulate the production of H₂O₂ in P19 neurons, these cells were treated with histamine (100 μM) alone or in association with antihistamine drugs, vDAO or CAT (Figure 5.8). The fluorometric measure of oxidation product of HVA catalyzed by HRP was used to quantify the H₂O₂ produced by cells. The medium recuperated from cells treated with histamine (100 μM) contained 8.36 ± 0.08 nmol of H₂O₂ (Figure 5.8A, B). An important reduction of the amount of H₂O₂ was observed when cells were exposed to histamine in association with DES or CIM at the concentrations showed in Figure 5.8A. In contrast, CPX (H₃ antagonist) was not able to reduce the generation of H₂O₂ (Figure 5.8A). The inhibition or blockage of H₁ and H₂ receptors by DES or CIM respectively, was also sufficient to avoid

the loss of neuronal viability (Figure 5.4A, B) as well as the reduction of Ca^{2+} signal, both induced by histamine (Figure 5.5A-D).

The vDAO and CAT also decreased the production of H_2O_2 (Figure 5.8B). CAT could protect cells against histamine-mediated loss of viability by scavenging H_2O_2 while exogenous vDAO, although a generator of H_2O_2 , could provide protection by decreasing the amount of histamine capable of binding to H-receptors. In aerobic organisms, CAT, as an enzyme involved in the scavenging of ROS, transforms H_2O_2 into molecular oxygen and H_2O . It is important to note that H_2O_2 is a stable nonradical oxidative species that can easily cross biological membranes and move from the interior to the exterior of the cell (Flora *et al.*, 2009) where it can be decomposed by CAT (Medina *et al.*, 2009). The viability of P19 neurons is affected by H_2O_2 quantities as those produced by histamine treatment (Figure 5.8C).

5.6 Conclusions

The results provide evidence that P19 neurons express functional H_1 , H_2 and H_3 and that their exposure to histamine results in a loss of cell viability. The observed histamine dependent cytotoxic effect was prevented by the treatment with DES and CIM (H_1 and H_2 antagonists) as well as by the addition of vDAO or CAT but not by H_3 antagonist. The H_4 seemed to not be expressed on these cells. The vDAO likely protects by decreasing extracellular histamine levels, and CAT by scavenging H_2O_2 escaped from the cells following activation of H-receptors. Also, DES and CIM can significantly reduce the amount of H_2O_2 released by cells treated with histamine. P19 neurons appear as sensitive to histamine (being affected by low concentrations of this compound), pointing to their usefulness as a pertinent model in the search for histamine roles in neuronal system. Furthermore, P19 neurons, easy to cultivate, can be used in the investigation of pharmaceuticals such as antihistamine agents, and neuropharmaceuticals, particularly for histamine-related neuronal dysfunctions. As a perspective, they can be considered in the biopharmaceuticals studies to evaluate novel antihistamine drugs or the association of antihistamine drugs with other bioactive agents in histamine neural neuronal pathogenesis. The major advantages of the proposed approach consist in the fact that various antihistamine drugs can be simply and directly evaluated in the presence of histamine. The robustness of P19 neurons together with their easy handling, make the P19 neuronal model an interesting choice for rapid *in vitro* screening of antihistamine drugs. This model presents properties like those of cultured mammalian brain and it is less expensive to operate than primary cell cultures. This model can be easily implemented by current laboratories of analysis and by Contract Research Organizations (CROs).

Acknowledgments

This project was supported by the “Fondation Courtois” (Québec, Canada) and by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to MAM and to BA. MAM holds an Institutional Research Chair in Enteric Dysfunctions and BA holds an Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment. MGP was granted a studentship from CERMO-FC, GT received an NSERC Undergraduate Student Research Award and ATN was a holder of a doctoral scholarship from the Fonds de la Recherche du Québec Santé (FRQS, Québec, Canada) and of a Mobility Fellowship from CRIPA/FRQNT.

CHAPITRE 6

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le cuivre est nécessaire au bon fonctionnement de notre organisme. Du fait que ce métal peut alterner entre deux états d'oxydation Cu^+ (aussi considéré comme cuivre réduit) et Cu^{2+} (considéré en état oxydé), il est utilisé comme cofacteur par diverses enzymes dans un large nombre des réactions physiologiques fondamentales discutées à la section 1.1. Ainsi, le cuivre coordonné avec des ligands de type acides aminés est essentiel au fonctionnement de nombreuses protéines et pour le transport et le stockage du cuivre. Cependant, le caractère redox des ions cuivre libres peut mener à la production de radicaux hydroxyles en conditions physiologiques (réaction de Fenton, section 1.1.3) qui sont hautement toxiques.

La carence en cuivre peut entraîner des troubles cardiovasculaires, nerveux, respiratoires, intestinaux, musculaires. La défaillance multisystémique causée par la carence en cuivre a été mise en évidence dans diverses maladies orphelines comme la maladie de Menkes, le syndrome de la corne occipitale et des maladies orphelines mitochondriales comme la cardioencéphalomyopathie hypertrophique. Une réduction de l'activité ou de la concentration des enzymes cuivre-dépendantes (ex : céruloplasmine, cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase) est observée chez les patients atteints de ces maladies. Comme mentionné dans la section 1.13, le traitement avec des injections sous-cutanées du complexe cuivre(II)-L-histidine, a montré une amélioration significative des paramètres biochimiques des patients. La limitation de ces traitements vient de l'instabilité dans la solution de cet agent bioactif. Le besoin d'utiliser une formulation solide a été suggéré (Deschamps 2005). Nous avons donc émis l'hypothèse que la complexation du cuivre (II) avec des molécules actives biologiquement, comme des acides aminés adéquatement formulés pour l'administration orale pouvant être absorbés dans l'intestin surtout dans le cas des maladies comme la cardioencéphalomyopathie hypertrophique, pour lesquelles les systèmes d'absorption du cuivre ne sont pas affectés et ainsi augmenter l'activité de la cytochrome c oxydase dans l'organisme.

Le développement préclinique compte plusieurs étapes commençant par l'identification d'un candidat de médicament parmi plusieurs molécules. Ainsi, nous avons synthétisé des complexes solides à cuivre (II) avec quatre ligands (L-histidine, L-sérine, urée et biuret). Ensuite, les caractéristiques structurales et la stabilité dans les milieux physiologiques simulés de ces molécules avec potentiel thérapeutique ont été investiguées. L'analyse élémentaire, la diffraction des rayons X et la FTIR (Tableau 3.1 ; Figures 3.1-3.3) ont suggéré que deux molécules de ligands seraient impliquées dans la coordination avec un ion cuivre (II) de manière tridentée (L-histidine), bidentée (L-sérine et biuret) ou monodentée (urée).

Les capacités oxydoréductrices du cuivre sont bien connues ainsi que les dommages pour les organismes vivants dérivés de cette activité. C'est pourquoi nous avons trouvé intéressant d'évaluer leur activité antioxydante. La revue de la littérature a révélé de nombreuses recherches consacrées à différents complexes synthétisés à partir de métaux de transition (fer, manganèse, cuivre, nickel, cobalt et zinc) avec des ligands (flavonoïdes, polyphénols ou peptides) montrant une activité de piégeage de radicaux libres plus élevée par rapport à des ligands libres correspondants (Joseph *et al.*, 2017; Ching *et al.*, 2016, Roman *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.* 2015, Kelso *et al.*, 2012). De même, les complexes du présent travail : [Cu(His)₂Cl₂], [Cu(Ser)₂], [Cu(Urée)₂Cl₂] et [Cu(Biuret)₂Cl₂] ont présenté des capacités à piéger des EROs plus élevées que les ligands seuls. Les propriétés antioxydantes de ces complexes présentent plusieurs avantages. En raison de leur faible poids moléculaire et de leur solubilité élevée dans l'eau, ils pourraient être absorbables et plus mobiles dans l'organisme que d'autres antioxydants naturels ou synthétiques.

Comme l'administration orale de complexes de cuivre (II) sera éventuellement réalisée dans un futur proche, il était important d'explorer leur stabilité dans des conditions simulant le système gastrique et intestinal. Les spectres d'absorption et la voltamétrie cyclique ont été utilisés comme indicateurs de la conformation structurale des complexes étudiés dans divers milieux. Les profils d'absorbance UV-Vis dans des solutions physiologiques simulées (Figure 3.4) et la voltamétrie cyclique (Figure 3.5) ont révélé que contrairement à [Cu(Urée)₂Cl₂] et [Cu(Biuret)₂Cl₂], les complexes [Cu(His)₂Cl₂] et [Cu(Ser)₂] étaient stables dans différents milieux, y compris l'eau, la solution physiologique et la solution intestinale simulée. Cependant, les complexes étaient instables dans la solution gastrique simulée, ce qui pourrait être attribué à la protonation des groupes de coordination et finalement la libération du cuivre des complexes lorsque la valeur du pH est basse ($\text{pH} \leq 5$). Ces résultats sont particulièrement importants pour le développement d'une formulation orale pour laquelle il sera fortement recommandé d'utiliser des excipients favorisant la protection gastrique.

L'utilisation d'une formulation gastro-résistante permettra le transport et la libération de ces complexes dans divers segments du tractus intestinal ayant un $\text{pH} \geq 5$. Cependant, physiologiquement le cuivre est absorbé dans des régions de l'intestin grêle qui ont un $\text{pH} \leq 5,8$. De ce fait, il était imposé l'étude du transport des complexes [Cu(His)₂Cl₂] et [Cu(Ser)₂] à travers l'épithélium intestinal. À cette fin, les cellules Caco-2 différenciées ont été utilisées comme modèle de référence dans les prévisions de l'absorption intestinale des molécules bioactives (Artursson *et al.*, 2001). Cependant, il faudrait d'abord évaluer la biocompatibilité de ces composés dans cette lignée cellulaire. Les résultats montraient une bonne biocompatibilité de ces complexes à des concentrations allant jusqu'à 100 μM (Figure 4.1), similaire aux résultats obtenus dans les neurones P19. Dans les maladies de carence en cuivre, telles que la maladie de Menkes, le développement

neurologique est fortement touché par de faibles niveaux de céruloplasmine. Un traitement avec les complexes de cuivre à des concentrations non toxiques pourrait renverser ce déficit.

Généralement, les composés liposolubles ont une bonne absorptivité tandis que pour les hydrosolubles, comme les complexes de cuivre (II), objets du présent rapport, la voie paracellulaire est prévue avec une absorptivité moins efficiente (Artursson *et al.*, 2001). Par conséquent, l'étude du transport à travers l'épithélium intestinal était impérative. La résistance électrique transépithéliale (TEER) est une méthode fiable pour confirmer l'intégrité et la perméabilité de la monocouche (Srinivasan *et al.*, 2015). La mesure du TEER est un indicateur du passage des molécules par voie paracellulaire ainsi comme de l'intégrité des jonctions serrées et de la monocouche cellulaire (Srinivasan *et al.*, 2015). La combinaison de cette technique avec méthodes spectrométriques de quantification appropriée permet la caractérisation du transport et de l'accumulation d'un composé dans l'épithélium intestinal. Les résultats obtenus ont montré que les complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ ont causé une diminution significative des valeurs du TEER de la monocouche des cellules Caco-2 différenciées après de 24 h de traitement (Figure 4.2). L'impact sur la TEER est reliée à la perte de l'intégrité de la monocouche cellulaire et à une augmentation indésirable de sa perméabilité. Considérant que le temps de résidence estimé d'un médicament dans la région de l'intestin ayant un $\text{pH} \approx 7$ est d'approximativement 4,5 h (Flemming and Trevors, 1989), les résultats les plus remarquables sont ceux d'avant 6 h de traitement avec les complexes où il n'a pas été montré un endommagement de la TEER de la monocouche cellulaire. Cependant, une augmentation de la concentration de $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et de $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ a été observée dans le compartiment basolateral.

L'ensemble des résultats (Figure 4.3-4.5) suggère le passage par voie paracellulaire des complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$, ce qui est particulièrement relevant considérant que la maladie de Menkes, est provoquée par une absorption déficiente du cuivre en raison du dysfonctionnement de la protéine ATP7A responsable du transport de ce métal du lumen intestinal vers le sang. La supplémentation du cuivre avec une source pouvant traverser la barrière intestinale par une autre voie que l'ATP7A, pourrait être une alternative intéressante pour le traitement de la maladie de Menkes. Également, ces résultats devront être considérés pour le design d'une formulation pharmaceutique, qui devra maximiser le transit des complexes de cuivre à travers les jonctions serrées qui restreignent le transport paracellulaire des molécules (Srinivasan *et al.*, 2015).

La concentration de cuivre intra et extracellulaire peut réguler l'expression des transporteurs de cuivre qui facilitent le passage de ce cation à travers l'épithélium intestinal. Pour cela, il a été considéré d'étudier si les transporteurs du cuivre pourraient être impliqués dans le passage des complexes de cuivre à travers la

monocouche des cellules Caco-2 différenciées. Ce rapport semble le premier à montrer la capacité de $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et de $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ à induire la régulation à la baisse des niveaux relatifs d'ARNm pour les quatre principaux transporteurs de cuivre (CTR1, DMT1, ATP7A, ATP7B) (Figure 4.6). Ces résultats pourraient suggérer qu'il est moins probable que la voie transcellulaire médiée par ces protéines ait été utilisée dans le passage des complexes de cuivre (II) du compartiment apical vers le basolatéral. Également, il a été observé une régulation à la hausse de l'expression génétique de MT quand les cellules ont été traitées avec $100 \mu\text{M}$ de $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$. La MT a un rôle dans le stockage et dans la livraison des ions $\text{Cu}(\text{II})$ aux cuproenzymes dans les cellules. Ce résultat est important en considérant les faibles niveaux de protéines à cuivre caractéristiques dans les maladies orphelines, comme la maladie de Menkes, la cardioencéphalomyopathie hypertrophique ou le syndrome de la corne occipitale. Plus des études sont recommandées pour déterminer si le cuivre des complexes peut être pris en charge par le MT pour finalement être libéré aux protéines dépendant du cuivre comme la céruloplasmine, la superoxyde dismutase ou encore la cytochrome c oxydase qui a montré une augmentation de son activité après les traitements des cellules Caco-2 différenciées avec les complexes de cuivre (II) à une concentration supérieure à $50 \mu\text{M}$. Cette trouvaille ouvre des nouvelles perspectives pour l'utilisation $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ dans le traitement des maladies orphelines reliées avec la carence du cuivre dans lesquelles une diminution de son activité a été reportée.

Des protéines à cuivres comme la DAO sont impliquées dans le métabolisme de l'histamine. Cette amine biogène participe dans un large éventail des processus physiologiques et pathologiques. Récemment, l'intérêt pour l'étude de l'implication de l'histamine dans le SNC et le SNE est en croissance. Les antihistaminiques agissent comme antagonistes de l'histamine en se liant aux récepteurs histaminiques (H_1 - H_4). La vDAO a été suggérée comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour diminuer les effets de l'histamine dans les MICI (Mateescu *et al.*, 2017). L'excès d'histamine dans le lumen intestinal cause divers problèmes par son lien aux récepteurs histaminiques (H_1 - H_4) présents, entre autres cellules, sur des neurones du SNE. Pour favoriser le développement des nouvelles molécules pouvant réduire les effets nocifs de l'histamine au niveau neuronal, il est important de disposer des modèles cellulaires pratiques. Les cultures de neurones différenciés à partir de cellules souches embryonnaires P19 de souris sont accessibles et faciles à utiliser. De plus, ils sont semblables aux neurones du SNC. Le spectre de neurotransmetteurs et de neuropeptides des neurones P19 a été décrit auparavant. (Staines *et al.*, 1994 ; Ulrich *et al.*, 2006). Cependant, le présent travail semble le premier à montrer que l'histamine, connue comme neurotransmetteur et neuromodulateur, peut avoir un certain effet sur la cytotoxicité qui est totalement prévenu par l'action de la desloratadine et de la cimétidine, toutes les deux antagonistes antihistaminiques agissant sur des

récepteurs H₁ et H₂, respectivement. Ces résultats suggèrent la présence des récepteurs histaminiques fonctionnels sur les neurones P19.

Les avantages mentionnés des cellules P19 font des neurones P19 un modèle *in vitro* prometteur dans le développement de médicaments ciblant le cerveau pour le dysfonctionnement de l'histamine. La phase préclinique nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Les modèles *ex vivo* et d'animaux sont les plus fiables pour évaluer les candidats-médicaments. Cependant, leurs coûts, les exigences réglementaires et éthiques, et l'investissement en temps, sont les principaux inconvénients de leur utilisation. Dans les études *in vitro*, le coût est moindre, elles sont plus rapides à réaliser et faciles à accepter d'un point de vue éthique. Par conséquent, le développement de modèles *in vitro*, tels que les neurones P19, est essentiel pour faciliter l'étude de candidats médicaments. Molina-Hernández *et al.*, (2008) ont utilisé des embryons E14 extraits de rats Wistar gravides pour obtenir des cellules souches neurales multipotentes. C'est une méthode longue, laborieuse et plus coûteuse. L'avantage de la culture des neurones P19 pour l'évaluation en série des médicaments antihistaminiques est que l'ensemble de la procédure est plus court, plus facile à utiliser et qui permet d'éviter les limitations réglementaires pour l'utilisation et la manipulation des animaux. En plus, dans certains cas, il n'est pas exclu que les neurones P19 puissent en outre servir de modèle pour les recherches des neurones du SNE qui contiennent de nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides trouvés dans le SNC (Furness 2000 ; Mittal *et al.*, 2017 ; Kulkarni *et al.*, 2018 ; Spencer *et al.*, 2020).

CONCLUSION

Le présent projet de recherche contribue à l'avancement des connaissances proposant une nouvelle approche dans la thérapie des maladies orphelines reliées aux déficits en cuivre. Le passage par voie paracellulaire des complexes a été montré. Cette observation indique (i) que le $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et le $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ pourraient être de bons candidats pour le traitement de maladies dans lesquelles les protéines impliquées dans le transport du cuivre du lumen intestinal vers le sang sont affectées et (ii) que des excipients qui maximisent le passage à travers des jonctions serrées devront être considérés dans la conception de la formulation.

Une autre contribution vient du fait que ce travail est le premier à montrer l'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase dans les cellules Caco-2 différenciées. Ces résultats confirment le potentiel des complexes $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et le $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ comme agents thérapeutiques pour le traitement des patients ayant montré un déficit de la cytochrome c oxydase. La compréhension du système de transport à travers l'épithélium intestinal des complexes de cuivre (II) à la suite de leur administration par voie orale, pourrait améliorer la qualité de vie des patients et de la population atteinte.

Cette étude est la première à montrer la capacité de $[\text{Cu}(\text{His})_2\text{Cl}_2]$ et de $[\text{Cu}(\text{Ser})_2]$ à induire la régulation à la baisse du niveau relatif d'ARNm de CTR1, DMT1, ATP7A, ATP7B ce qui suggère qu'il est moins probable que la voie transcellulaire médiée par ces protéines ait été utilisée dans le passage des complexes de cuivre (II) du compartiment apical vers le basolatéral.

La régulation à la hausse de l'expression génétique de MT pourrait suggérer que le cuivre apporté par les complexes peut être pris en charge par la MT pour finalement être libéré aux protéines dépendantes du cuivre qui sont aux faibles niveaux dans les maladies orphelines, comme la maladie de Menkes, la cardioencéphalomyopathie hypertrophique ou le syndrome de la corne occipitale.

Perspectives

L'importance majeure du projet réside dans la réalisation des complexes cuivriques en phase solide capables d'être absorbés permettant le rehaussement de l'activité de la cytochrome c oxydase, enzyme métabolique clé. Des formulations pharmaceutiques adéquates permettront des traitements novateurs des maladies graves liées au déficit du cuivre comme la cardioencéphalomyopathie hypertrophique.

Une autre réalisation du projet est de montrer que les neurones P19 expriment des récepteurs de l'histamine (H₁, H₂ et H₃) ce qui ouvre la possibilité d'utiliser les neurones P19 comme modèle pour étudier les rôles de l'histamine et le screening pour le développement des médicaments visant des maladies neuronales. Ce modèle cellulaire est moins coûteux, et peut être facilement mis en œuvre par les laboratoires d'analyse actuels et par les Organismes de Recherche sous Contrat (Sociétés de recherche contractuelle).

ANNEXE A

DONNÉES SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE « COPPER COMPLEXES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS: STRUCTURAL INSIGHTS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND NEURON COMPATIBILITY » (CHAPITRE 3)

Tableau A 3.1 Crystal data and structure refinement for [Cu(Ser)₂] and [Cu(Urea)₂Cl₂]

Parameters	[Cu(Ser) ₂]	[Cu(Urea) ₂ Cl ₂]
Temperature (°K)	100	100
Crystal system	monoclinic	monoclinic
Space group	<i>P2₁</i>	<i>P2₁/n</i>
<i>a</i> /Å	5.6127(3) *	3.7887(2) *
<i>b</i> /Å	8.3523(5)	8.4675(4)
<i>c</i> /Å	9.9008(9)	12.4449(5)
<i>α</i> /°	90	90
<i>β</i> /°	90.506(2)	92.467(3)
<i>γ</i> /°	90	90
<i>V</i> /Å ³	464.12(5)	398.87(3)
<i>Z</i>	2	2
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.944	2.120
μ/mm^{-1}	12.822	18.698
<i>F</i> (000)	254.0	254.0
Radiation	GaK α ($\lambda = 1.34139$)	GaK α ($\lambda = 1.34139$)
Final <i>R</i> indexes [<i>I</i> ≥ 2σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0355, <i>wR</i> ₂ = 0.0926	<i>R</i> ₁ = 0.0509, <i>wR</i> ₂ = 0.1490
Final <i>R</i> indexes [all data]	<i>R</i> ₁ = 0.0368, <i>wR</i> ₂ = 0.0934	<i>R</i> ₁ = 0.0534, <i>wR</i> ₂ = 0.1498

* The numbers in parentheses in this column refer to the unit cell defined by Bernal and Fowler [65].

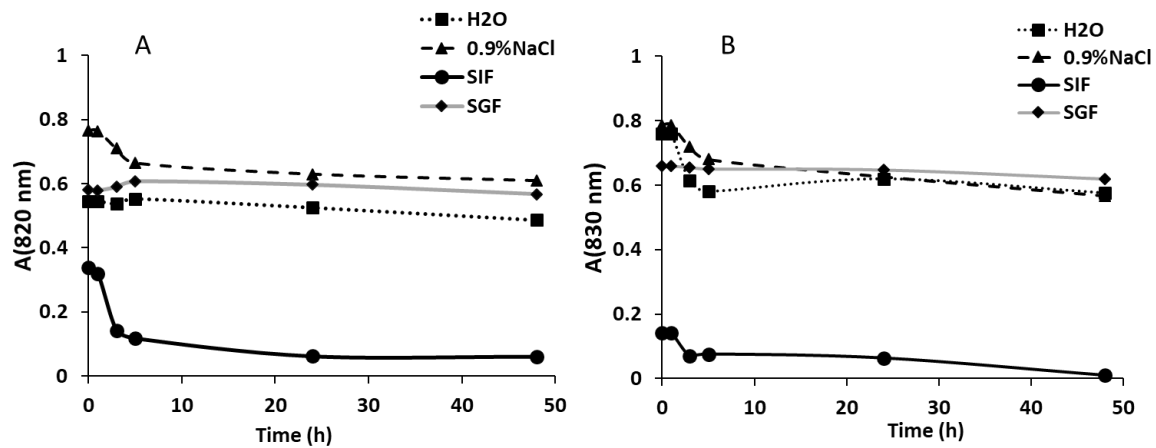
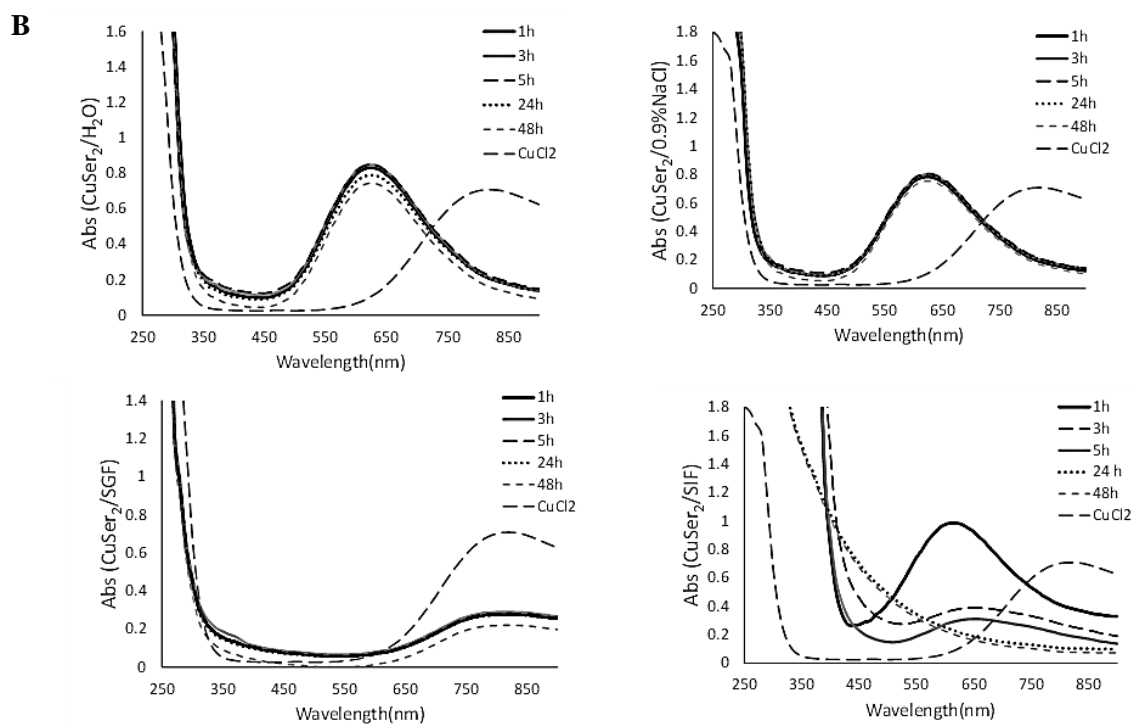
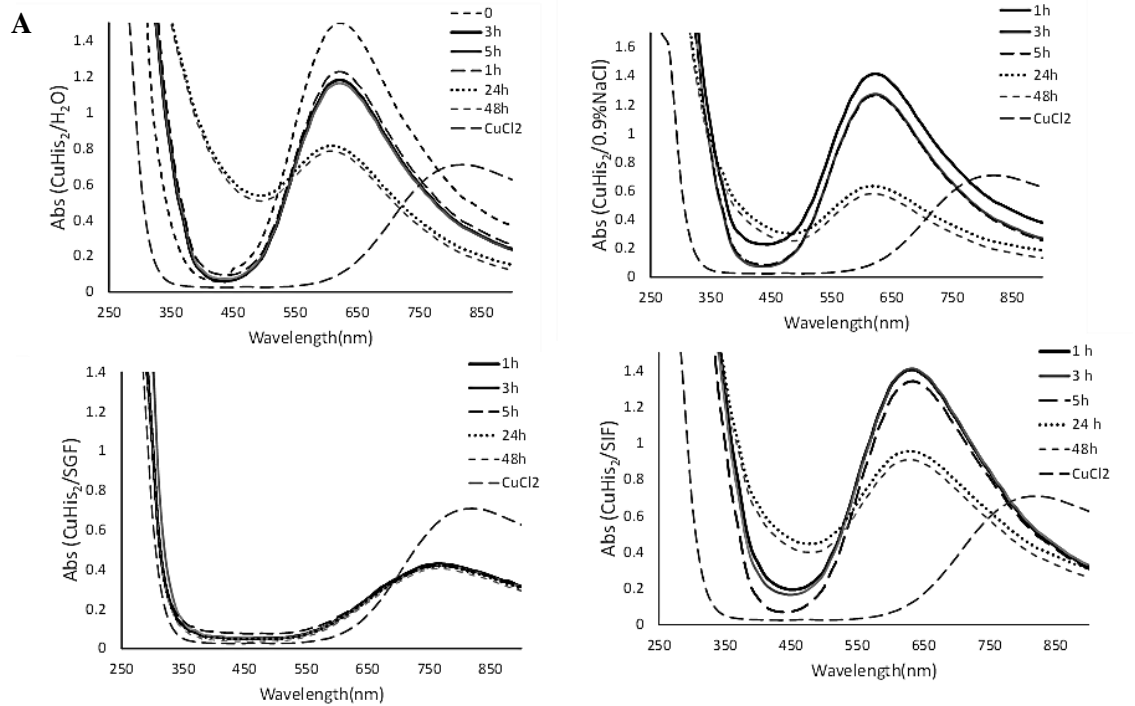


Figure A 3.1 Time course of absorbance values of the complexes at their λ_{max} and 37 °C, in different physiologically relevant media of 40 mM $[Cu(Urea)_2Cl_2]$ (A) and $[Cu(Biuret)_2Cl_2]$ (B). Readings were taken at 0, 1, 2, 3, 5, 10, 24 and 48 h, and values are presented as means of three separate determinations



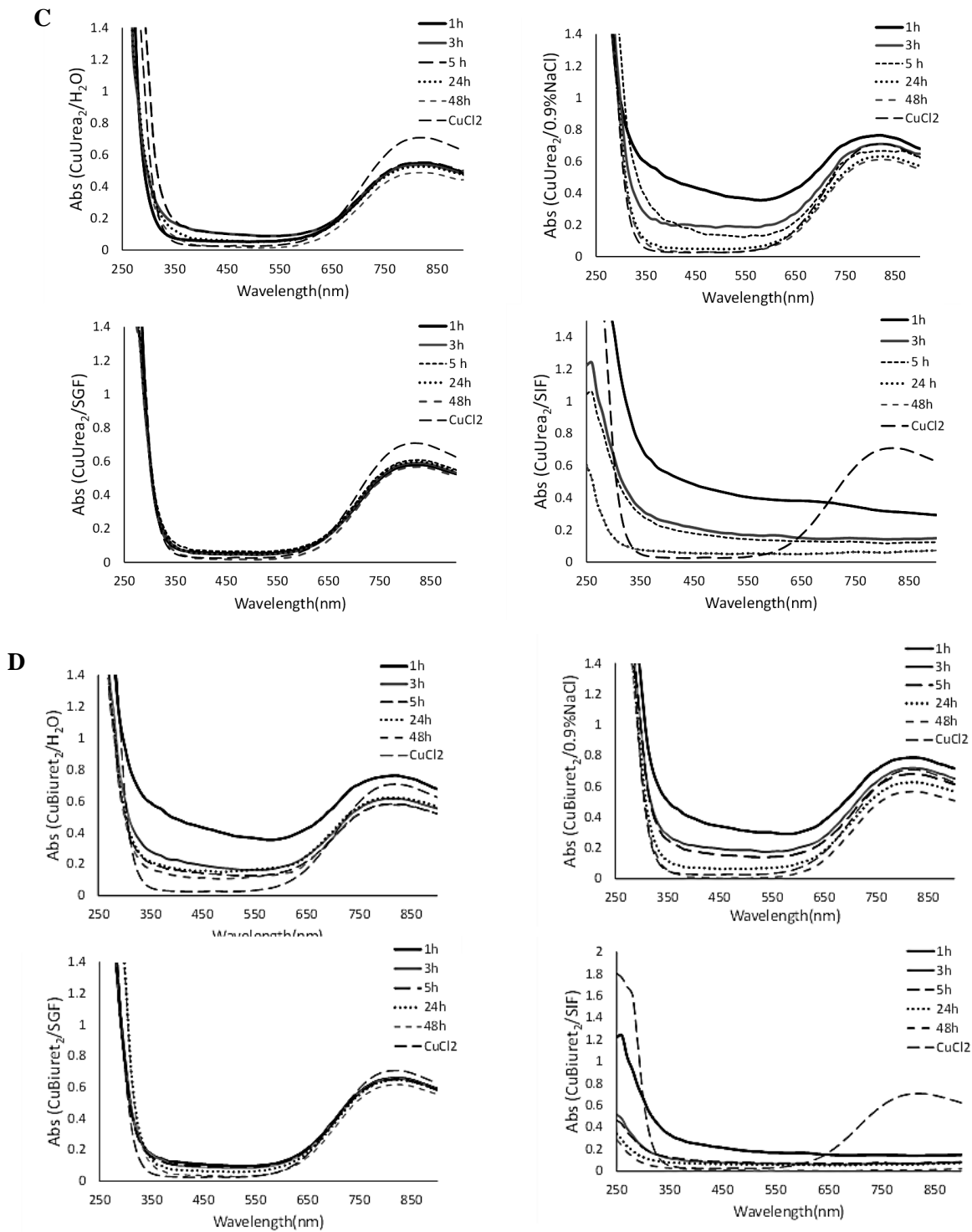


Figure A 3.2 UV-Vis absorbance spectra of [Cu(His)₂Cl₂] [A], [Cu(Ser)₂] [B], [Cu(Urea)₂Cl₂] [C], and [Cu(Biuret)₂Cl₂] [D] in different physiologically relevant media: H₂O; NaCl 0.9% (pH 7.4); SGF (pH 1.2); and SIF (pH 7.2). Readings were taken at 0, 1, 2, 3, 5, 10, 24 and 48 h at 37 °C

ANNEXE B
SUPPLEMENTARY DATA
BIOACTIVE COPPER(II) AGENTS AND THEIR POTENTIAL INVOLVEMENT IN
THE TREATMENT OF COPPER DEFICIENCY-RELATED ORPHAN DISEASES
(CHAPITRE 4)

Mariela Gomez Perez, Narjara Gonzalez Suarez, Borhane Annabi, and Mircea Alexandru Mateescu*

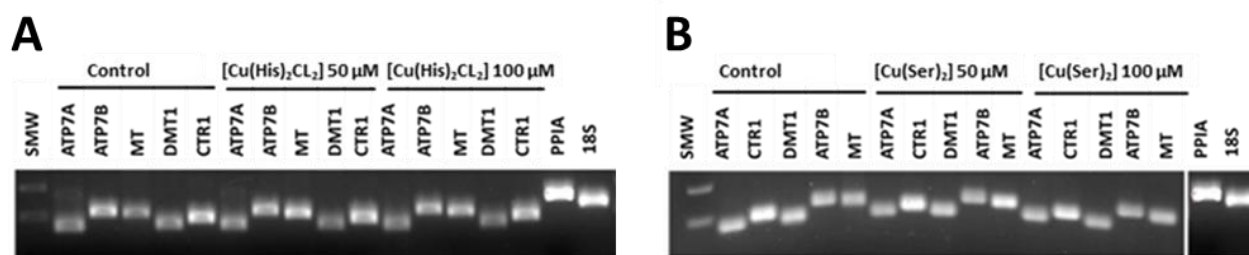


Figure B 4.1 The agarose gels of CTR1, DMT1, ATP7A, ATP7B and MT amplicons as amplified by RT qPCR are representative of three repeated experiments (SMW; standard molecular weight). The differentiated Caco-2 cells were treated with: A) [Cu(His)₂Cl₂] or B) [Cu(Ser)₂] at concentrations of 50 or 100 μM.

APPENDICE A

PRINCIPALES RÉALISATIONS : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Les travaux réalisés dans le cadre du présent projet de recherche ont permis la publication de trois articles. L'article présenté dans le chapitre 3, Gomez Perez, M. est co-première auteure avec Esmaeili, L. Gomez Perez, M. a contribué à la réalisation de la majeure partie des expériences au laboratoire. Elle a participé au design du projet de recherche, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. Quant aux articles présentés dans les chapitres 4 et 5, Gomez Perez, M. a réalisé la majeure partie de la rédaction, de la préparation de protocoles, de la réalisation des expériences, du traitement des résultats et de la recherche bibliographique.

Gomez Perez, M., Esmaeili, L., Jafari, M., Paquin, J., Ispas-Szabo, P., Pop, V., Andruh, M., Byers, J., Mateescu, M. A. (2019). Copper complexes for biomedical applications: Structural insights, antioxidant activity and neuron compatibility. *J. Inorg. Biochem.*, 192, 87-97. (Chapitre 3)

Gomez Perez, M., Gonzales Suarez, N., Annabi, B., Mateescu, M. A. (2023). Bioactive copper (II) agents and their involvement in orphan disease. *J. Inorg. Biochem.* (in preparation; Chapitre 4)

Gomez Perez, M., Tanasie, G., Neree, A.T., Gonzalez Suarez, N., Lafortune, C., Paquin, J., Marcocci, L., Pietrangeli, P., Annabi, B., Mateescu, M.A. (2023). P19-derived neuronal cells express H₁, H₂, and H₃ histamine receptors: a biopharmaceutical approach to evaluate antihistamine agents. *Amino Acids*. (in press, Chapitre 5)

Dans le cadre du Doctorat, la réalisation de ce projet pluridisciplinaire a permis d'avoir des résultats pour la réalisation de présentations orales et par affiches dans divers congrès internationaux comme :

Gomez Perez, M., Neree, A.T., Paquin, J., Jumarie, C., Gonzalez Suarez, N., Annabi, B., Ispas-Szab,P., Mateescu, M.A. (2022). Expression of histamine receptors in neuronal P19 cells and their pharmacological impact on the evaluation of antihistaminic drugs. 50th Anniversary European Histamine Research Society Meeting, Hannover, Germany.

Gomez Perez, M. G., Esmaeili, Paquin, J., Ispas-Szabo, Mateescu, M. A. (2018) Copper (II) complexes and their implications in rare diseases. Keystone symposia From Rare to Care: Discovery, Modeling and Translation of Rare Diseases (S4) 11-14- Vienna BioCenter - Vienna, Austria.

BIBLIOGRAPHIE

- Andrews GP, Martin SE (1979) Heat inactivation of catalase from *Staphylococcus aureus* MF-31. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 37, 1180-1185.
- Anthes, J. C., Gilchrest, H., Richard, C., Eckel, S., Hesk, D., West Jr, R. E., Williams, S. M., Greenfeder, S., Billah, M., Kreutner, W., Egan, R. W. (2002). Biochemical characterization of desloratadine, a potent antagonist of the human histamine H1 receptor. *European journal of pharmacology*, 449, 229-237.
- Atanasiu, R. L.; Stea, D.; Mateescu, M. A.; Vergely, C.; Dalloz, F.; Briot, F.; Maupoil, V.; Nadeau, R.; Rochette, L. (1998). Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 189, 127-135.
- Baggiolini M, Walter R, Philip HC (1986) [22] Measurement of hydrogen peroxide production by phagocytes using homovanillic acid and horseradish peroxidase. *Methods in enzymology*. Academic Press, 132, 395-400.
- Baker, Z. N., Cobine, P. A., Leary, S. C. (2017). The mitochondrion: a central architect of copper homeostasis. *Metallomics*, 9, 1501-1512.
- Barcik W., Pugin B., Westermann P., Perez N.R., Ferstl R., Wawrzyniak M., Smolinska S., Jutel M., Hessel E.M., Michalovich D. (2016) Histamine-secreting microbes are increased in the gut of adult asthma patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138, 1491-1494.
- Bento, I., Peixoto, C., Zaitsev, V. N., Lindley, P. F. (2007). Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, 63, 240-248.
- Bernal, J. D., & Fowler, R. H. (1933). A theory of water and ionic solution, with particular reference to hydrogen and hydroxyl ions. *The Journal of Chemical Physics*, 1, 515-548.
- Bertini, I., Messori, L., Viezzoli, M.S., Berthon G. (Ed.), *Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*, vol. 1, Marcel Dekker, New York, 1995, 156–174.
- Blemur L, Le TC, Marcocci L, Pietrangeli P, Mateescu MA (2016) Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63, 344-353.
- Bloemers SM, Leurs R, Smit MJ, Verheule S, Tertoolen LGJ, Timmerman H, Delaat SW (1993) Mouse P19 embryonal carcinoma cells express functional histamine H1 receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 191, 118-125.

- Bongers G, Bakker RA, Leurs R (2007) Molecular aspects of the histamine H3 receptor. *Biochemical Pharmacology*, 73, 1195-1204.
- Branco, A. C. C. C., Yoshikawa, F. S. Y., Pietrobon, A. J., & Sato, M. N. (2018). Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. *Mediators of inflammation*, 2018.
- Breunig E, Michel K, Zeller F, Seidl S, Weyhern CWHV, Schemann M (2007). Histamine excites neurons in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. *The Journal of Physiology*, 583, 731-742.
- Brown, R. E., Stevens, D. R., & Haas, H. L. (2001). The physiology of brain histamine. *Progress in neurobiology*, 63, 637-672.
- Brumas, V., Alliey, N., & Berthon, G. (1993). A new investigation of copper (II)-serine, copper(II)-histidine-serine, copper(II)-asparagine, and copper(II)-histidine-asparagine equilibria under physiological conditions, and implications for simulation models relative to blood plasma. *Journal of inorganic biochemistry*, 52, 287-296.
- Bujacz, A., Turek, M., Majzner, W., & Lodyga-Chruscinska, E. (2010). X-ray structure of a novel histidine-copper (II) complex. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 36, 430-435.
- Bukharov, M. S., Shtyrlin, V. G., Mukhtarov, A. S., Mamin, G. V., Stapf, S., Mattea, C., Krutikov, A. A., Il'in, A. N., Serov, N. Y. (2014). Study of structural and dynamic characteristics of copper (II) amino acid complexes in solutions by combined EPR and NMR relaxation methods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16, 9411-9421.
- Cadet, N., Paquin, J. (2000). Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons. *Developmental Brain Research*, 120, 211-221
- Caillet, S., Côté, J., Doyon, G., Sylvain, J. F., & Lacroix, M. (2011). Antioxidant and antiradical properties of cranberry juice and extracts. *Food Research International*, 44, 1408-1413.
- Canonica GW, Blaiss M (2011) Antihistaminic, anti-inflammatory, and antiallergic properties of the non-sedating second generation antihistamine desloratadine: a review of the evidence. *The World Allergy Organ. J.* 4, 47–53.
- Casarin, A., Giorgi, G., Pertegato, V., Siviero, R., Cerqua, C., Doimo, M., Basso, G., Sacconi, S., Cassina, M., Rizzuto, R., Brosel, S., Davidson, M. M., DiMauro, S., Schon, E. A., Clementi, M., Trevisson, E., Salviati, L. (2012). Copper and bezafibrate cooperate to rescue cytochrome c oxidase deficiency in cells of patients with SCO2 mutations. *Orphanet journal of rare diseases*, 7, 1-8.

- Cobine, P. A., Pierrel, F., Winge, D. R. (2006). Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763, 759-772.
- Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., & Vidal-Carou, M. D. C. (2020). Histamine intolerance: The current state of the art. *Biomolecules*, 10, 1181.
- Corradi, A. B. (1992). Structures and stabilities of metal (II) (Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II), Pd (II), Cd (II)) compounds of N-protected amino acids. *Coordination chemistry reviews*, 117, 45-98.
- Cucci, L. M., Satriano, C., Marzo, T., & La Mendola, D. (2021). Angiogenin and copper crossing in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 10704.
- Currier, T. A., Bohnert, D. W., Falck, S. J., & Bartle, S. J. (2004). Daily and alternate day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: I. Effects on cow performance and the efficiency of nitrogen use in wethers. *Journal of Animal Science*, 82, 1508-1517.
- Członkowska, A., Litwin, T., Dusek, P., Ferenci, P., Lutsenko, S., Medici, V., Rybakowski, J. K., Weiss, K. H., Schilsky, M. L. (2018). Wilson disease. *Nature reviews Disease primers*, 4, 21.
- Dam, A. N., Berg, A. M., & Farraye, F. A. (2013). Environmental influences on the onset and clinical course of Crohn's disease—Part 1: An overview of external risk factors. *Gastroenterology & hepatology*, 9, 711.
- Daniele, S., & Pena, M. J. (1993). Cyclic voltammetric investigation of the Cu—histidine system at platinum conventional and microelectrodes. *Electrochimica acta*, 38, 165-174.
- Danks, D. M., Campbell, P. E., Stevens, B. J., Mayne, V., & Cartwright, E. (1972). Menkes's kinky hair syndrome: An inherited defect in copper absorption with widespread effects. *Pediatrics*, 50, 188-201.
- Datta, A. K., Ghosh, T., Nayak, K., & Ghosh, M. (2008). Menkes kinky hair disease: A case report. *Cases journal*, 1, 1-4.
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical journal*, 473, 805-825.
- Decaux, G. (2001). Long term treatment of inappropriate secretion of ADH by the vasopressin receptor antagonist conivaptan, urea or furosemide. *American Journal of Medicine*, 110, 582-584.
- Deschamps, P., Kulkarni, P. P., & Sarkar, B. (2004). X-ray structure of physiological copper (II)–bis (l-histidinato) complex. *Inorganic Chemistry*, 43, 3338-3340.
- Deschamps, P., Kulkarni, P. P., Gautam-Basak, M., Sarkar, B. (2005). The saga of copper(II)–l-histidine. *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 895-909

- Diaz, F. (2010). Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802, 100-110.
- Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A. K., & Puschmann, H. (2009). *Journal of Applied Crystallography*, 42 (2009) 339–341.
- Duan, H., & Wang, J. (2010). Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335, 743-753.
- Ducharme, P., Maltais, D., Desroches, D., Mateescu, M. A., & Paquin, J. (2010). Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage. *Neuroscience*, 167, 633-643.
- Duchesne, R., Klein, J. D., Velotta, J. B., Doran, J. J., Rouillard, P., Roberts, B. R., McDonough, A. A., Sands, J. M. (2001). UT-A urea transporter protein in heart: increased abundance during uremia, hypertension, and heart failure. *Circulation research*, 89, 139-145.
- Dumoulin, M. J., Chahine, R., Atanasiu, R., Nadeau, R., Mateescu, M. A. (1996). Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin. *Arzneimittel-forschung*, 46, 855-861
- El Khoury, Y., & Hellwig, P. (2009). Infrared spectroscopic characterization of copper–polyhistidine from 1,800 to 50 cm⁻¹: model systems for copper coordination. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14, 23-34.
- Esmaeili, L., Perez, M. G., Jafari, M., Paquin, J., Ispas-Szabo, P., Pop, V., Andruh, M., Byers, J. and Mateescu, M. A. (2019). Copper complexes for biomedical applications: Structural insights, antioxidant activity and neuron compatibility. *Journal of inorganic biochemistry*, 192, 87-97.
- Fabisiak, A., Włodarczyk, J., Fabisiak, N., Storr, M., & Fichna, J. (2017). Targeting histamine receptors in irritable bowel syndrome: a critical appraisal. *Journal of neurogastroenterology and motility*, 23, 341.
- Fitzpatrick, P. F. (2010). Oxidation of amines by flavoproteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 493, 13-25.
- Flemming, C. A., Trevors, J. T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 44, 143-158.
- Flora SJ (2009) Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 191-206
- Freeman, H. C., Smith, J. E. W. L., & Taylor, J. C. (1959). Crystallographic studies of the biuret reaction. *Nature*, 184, 707-710.

- Freisinger, P., Horvath, R., Macmillan, C., Peters, J., Jaksch, M. (2004). Reversion of hypertrophic cardiomyopathy in a patient with deficiency of the mitochondrial copper binding protein Sco2: is there a potential effect of copper? *Journal of inherited metabolic disease*, 27, 67-79.
- Furness JB (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81, 87-96.
- Gala, L., Lawson, M., Jomova, K., Zelenicky, L., Congradyova, A., Mazur, M., & Valko, M. (2014). EPR spectroscopy of a clinically active (1: 2) copper (II)-histidine complex used in the treatment of Menkes disease: a Fourier transform analysis of a fluid CW-EPR spectrum. *Molecules*, 19, 980-991.
- Gangopadhyay, D., Singh, S. K., Sharma, P., Mishra, H., Unnikrishnan, V. K., Singh, B., & Singh, R. K. (2016). Spectroscopic and structural study of the newly synthesized heteroligand complex of copper with creatinine and urea. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 154, 200-206.
- Garnica, A., Chan, W. Y., & Rennert, O. (1994). Copper-histidine treatment of Menkes disease. *The Journal of pediatrics*, 125, 336-337.
- Gershon, M. D. (2004). serotonin receptors and transporters—roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 20, 3-14.
- Gomez Perez, M., Fourcade, L., Mateescu, M. A., & Paquin, J. (2017). Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Analytical Biochemistry*, 535, 43-46.
- Gomez Perez, M., Fourcade, L., Mateescu, M. A., Paquin, J. (2017) Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Analytical Biochemistry*, 535, 43-46.
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiological reviews*, 88, 1183-1241.
- Halliwell B. (2007) *Biochemistry of oxidative stress*. *Biochemical Society Transactions*. 35, 1147-1150
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57, 715S-725S.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Harding, M. M. (2004). The architecture of metal coordination groups in proteins. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60, 849-859.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., Schulzke, J. D. (2005). Interleukin-13 is the

key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129(2), 550-564.

Heller, F., Fromm, A., Gitter, A. H., Mankertz, J., & Schulzke, J. D. (2008). Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal immunology*, 1, S58-S61.

Herlinger, A. W., Wenhold, S. L., & Long, T. V. (1970). Infrared spectra of amino acids and their metal complexes. II. Geometrical isomerism in bis (amino acidato) copper (II) complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 92, 6474-6481.

Heuts, D. P., Gummadova, J. O., Pang, J., Rigby, S. E., & Scrutton, N. S. (2011). Reaction of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) with primary amines: mechanistic insights from isotope effects and quantitative structure-activity relationships. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 29584-29593.

Hlynialuk, C. J., Ling, B., Baker, Z. N., Cobine, P. A., Lisa, D. Y., Boulet, A., Wai, T., Hossain, A., El Zawily, A. M., McFie, P. J., Stone, S. J., Diaz, F., Moraes, C. T., Viswanathan, D., Petris, M. J., Leary, S. C. (2015). The mitochondrial metallochaperone SCO1 is required to sustain expression of the high-affinity copper transporter CTR1 and preserve copper homeostasis. *Cell reports*, 10, 933-943.

Holeček, M. (2020). Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement. *Nutrients*, 12, 848.

Hoving, J. C. (2018). Targeting IL-13 as a host-directed therapy against ulcerative colitis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 395.

Hu, W., & Chen, Z. (2017). The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. *Pharmacology & therapeutics*, 175, 116-132.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 1841-1856.

Huang, H., Li, Y., Liang, J., & Finkelman, F. D. (2018). Molecular regulation of histamine synthesis. *Frontiers in immunology*, 9, 1392.

Inesi, G. (2017). Molecular features of copper binding proteins involved in copper homeostasis. *Iubmb Life*, 69, 211-217.

Jackson, C. V., Mickelson, J. K., Stringer, K., Rao, P. S., Lucchesi, B. R. (1986). Electrolysis-induced myocardial dysfunction: a novel method for the study of free radical mediated tissue injury. *Journal of pharmacological methods*, 15, 305-320.

- Jafarzadeh, A., Nemati, M., Khorramdelazad, H., & Hassan, Z. M. (2019). Immunomodulatory properties of cimetidine: Its therapeutic potentials for treatment of immune-related diseases. *International immunopharmacology*, 70, 156-166.
- Jaksch, M., Paret, C., Stucka, R., Horn, N., Müller-Höcker, J., Horvath, R., Trepesch, N., Stecker, G., Freisinger, P., Thirion, C., Müller, J., Lunkwitz, R., Rödel, G., Shoubridge, E. A., Lochmüller, H. (2001). Cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in SCO2, encoding a mitochondrial copper-binding protein, is rescued by copper in human myoblasts. *Human molecular genetics*, 10, 3025-3035.
- Jazvinščak Jembrek, M., Vlainić, J., Radovanović, V., Erhardt, J., & Oršolić, N. (2014). Effects of copper overload in P19 neurons: impairment of glutathione redox homeostasis and crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis. *Biometals*, 27, 1303-1322.
- Jeon, I. S., Ahn, D. S., Park, S. W., Lee, S., & Kim, B. (2005). Structures and isomerization of neutral and zwitterion serine–water clusters: Computational study. *International journal of quantum chemistry*, 101, 55-66.
- Jin, N. Z., & Gopinath, S. C. (2016). Potential blood clotting factors and anticoagulants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 356-365.
- Jones, B. L., & Kearns, G. L. (2011). Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89, 189-197.
- Jorgensen, E. A., Knigge, U., Warberg, J., & Kjær, A. (2007). Histamine and the regulation of body weight. *Neuroendocrinology*, 86, 210-214.
- Jumarie, C., Séide, M., Marcocci, L., Pietrangeli, P., & Mateescu, M. A. (2017). Diamine oxidase from white pea (*Lathyrus sativus*) combined with catalase protects the human intestinal Caco-2 cell line from histamine damage. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182, 1171-1181.
- Jurić, D. M., Kržan, M., & Lipnik-Stangelj, M. (2016). Histamine and astrocyte function. *Pharmacological Research*, 111, 774-783.
- Kemp, S. F., & Lockey, R. F. (2002). Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *Journal of allergy and clinical immunology*, 110, 341-348.
- Khateb A, Fort P, Pegna A, Jones BE, Mühlethaler M. (1995) Cholinergic nucleus basalis neurons are excited by histamine in vitro. *Neuroscience*. 69, 495-506.
- Kim H., Dwyer L., Song J.H., Martin-Cano F.E., Bahney J., Peri L., Britton F.C., Sanders K.M., Koh S.D. (2011) Identification of histamine receptors and effects of histamine on murine and simian colonic excitability. *Neurogastroenterology & Motility* 23, 949-967.

- Kim, B. E., Nevitt, T., & Thiele, D. J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature chemical biology*, 4, 176-185
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., & Hocevar, B. A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology*, 38, 96-109.
- Klema, V. J., & Wilmot, C. M. (2012). The role of protein crystallography in defining the mechanisms of biogenesis and catalysis in copper amine oxidase. *International journal of molecular sciences*, 13, 5375-5405.
- Klevay, L. M. (2008). Alzheimer's disease as copper deficiency. *Medical Hypotheses*, 70, 802-807.
- Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C., & Ames, B. N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 3175-3179.
- Kovač, V., & Čurin Šerbec, V. (2022). Prion protein: the molecule of many forms and faces. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1232.
- Kulkarni, S., Ganz, J., Bayrer, J., Becker, L., Bogunovic, M., & Rao, M. (2018). Advances in enteric neurobiology: the “brain” in the gut in health and disease. *Journal of Neuroscience*, 38, 9346-9354.
- Kumar, G., Goyal, M. K., Lucchese, S., Dhand, U. (2011). Copper deficiency myelopathy can also involve the brain stem. *American Journal of Neuroradiology*, 32, E14-E15.
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., Alvarez, M. A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 145-156.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Talon, R., Aymerich, T., Garriga, M., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Elias, M., Drosinos, E. H., Lauková, A., Vidal-Carou, M. C. (2010). Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures for dry fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 73, 524-528.
- Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 103-111.
- Leurs R, Hough L, Blandina P, Haas HL (2012) Histamine in: *Basic Neurochemistry*, Academic Press. 323-341.
- Leurs, R., Bakker, R. A., Timmerman, H., & De Esch, I. J. (2005). The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 4, 107-120.

- Leurs, R., Traiffort, E., Arrang, J. M., Tardivel-Lacombe, J., Ruat, M., & Schwartz, J. C. (1994). Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways. *Journal of Neurochemistry*, 62, 519-527.
- Llanos, R. M., & Mercer, J. F. (2002). The molecular basis of copper homeostasis copper-related disorders. *DNA and cell biology*, 21, 259-270.
- Lönnerdal, B. (2008). Intestinal regulation of copper homoeostasis: a developmental perspective. *The American journal of clinical nutrition*, 88, 846S-850S.
- Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, 85(5), 1185-1196.
- Maltais, D., Desroches, D., Aouffen, M., Mateescu, M. A., Wang, R., & Paquin, J. (2003). The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization. *Neuroscience*, 121, 73-82.
- Mandal, S., Das, G., & Askari, H. (2014). Experimental and quantum chemical modeling studies of the interactions of L-phenylalanine with divalent transition metal cations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54, 2524-2535.
- Mandal, S., Das, G., & Askari, H. (2015). A combined experimental and quantum mechanical investigation on some selected metal complexes of L-serine with first row transition metal cations. *Journal of Molecular Structure*, 1081, 281-292.
- Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17, 11-24.
- Masini E., Bani D., Marzocca C., Mateescu M. A., Mannaioni P.F., Federico R., Mondovì B. (2007) Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. *The Scientific World Journal* 7, 888-902.
- Mateescu, M. A., Chahine, R., Roger, S., Atanasiu, R., Yamaguchi, N., Lalumiere, G., & Nadeau, R. (1995). Protection of myocardial tissue against deleterious effects of oxygen free radicals by ceruloplasmin. *Arzneimittel-forschung*, 45, 476-480.
- Mateescu, M. A., Koudoufio, M. D., Tchoumi Neree, A., & Mondovì, B. (2017). Plant Histaminase as Bioactive Agent to Lower the Histamine Level: A Mini-Review. *Journal of Gastroenterology Research*, 1, 34-41.
- McBurney, M. (2003). P19 embryonal carcinoma cells. *International Journal of Developmental Biology*, 37, 135-140.

- McBurney, M., Reuhl, K. R., Ally, A. I., Nasipuri, S., Bell, J. C., & Craig, J. (1988). Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *Journal of Neuroscience*, 8(3), 1063-1073.
- McGrath A.P., Hilmer K.M., Collyer C.A., Shepard E.M., Elmore B.O., Brown D.E., Dooley D.M., Guss J.M. (2009). Structure and inhibition of human diamine oxidase. *Biochemistry*. 48, 9810-9822.
- Medda, R., Padiglia, A. et Floris, G. (1995). Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, 39, 1-9
- Medina VA, Massari NA, Cricco GP, Martín GA, Bergoc RM, Rivera ES (2009) Involvement of hydrogen peroxide in histamine-induced modulation of WM35 human malignant melanoma cell proliferation. *Free Radic Biol Med*. 46, 1510-1515.
- Meguro, Y., Kodama, H., Abe, T., Kobayashi, S., Kodama, Y., Nishimura, M. (1991). Changes of copper level and cytochrome c oxidase activity in the macular mouse with age. *Brain and Development*, 13, 184-186.
- Mehta, P., Miszta, P., Rzodkiewicz, P., Michalak, O., Krzeczyński, P., & Filipek, S. (2020). Enigmatic histamine receptor H4 for potential treatment of multiple inflammatory, autoimmune, and related diseases. *Life*, 10, 50
- Miao, L., & Clair, D. K. S. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 344-356.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130, 1036-1043.
- Mittal, R., Debs, L. H., Patel, A. P., Nguyen, D., Patel, K., O'Connor, G., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A. A., Deo, S. K., Daunert, S., Liu, X. Z. (2017). Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut–brain axis. *Journal of cellular physiology*, 232, 2359-2372.
- Molina-Hernandez, A., & Velasco, I. (2008). Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *Journal of neurochemistry*, 106, 706-717.
- Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A., and Santillo, M. (2016). The Cu, Zn Superoxide Dismutase: Not Only a Dismutase Enzyme. *Frontiers in Physiology*, 7, 594.
- Mondovì, B. (1994). Biological role and reactivity of TPQ containing amine oxidases. In *Biochemistry of Vitamin B 6 and PQQ* (pp. 235-240). Birkhäuser Basel.
- Mondovi, B., Befani, O., Gerosa, P., Mateescu, M. A. (1992) Specific temperature dependence of diamine oxidase activity and its thermal stability in the presence of polyvinylalcohol. *Agents and actions*, 37, 220-226.

- Mondovi, B., Fogel, W. A., Federico, R., Calinescu, C., Mateescu, M. A., Rosa, A. C., Masini, E. (2013) Effects of amine oxidases in allergic and histamine mediated conditions. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 7, 20-34.
- Moore, H. E., Garmendia, M. J., & Cooper, W. J. (1984). Kinetics of monochloramine oxidation of N, N-diethyl-p-phenylenediamine. *Environmental science & technology*, 18, 348-353.
- Morgada, M. N., Abriata, L. A., Cefaro, C., Gajda, K., Banci, L., & Vila, A. J. (2015). Loop recognition and copper-mediated disulfide reduction underpin metal site assembly of CuA in human cytochrome oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 11771-11776.
- Naumov, D. Y., Yufit, D. S., Boldyreva, E. V., & Howard, J. A. (2001). A urea complex of copper (II) hypophosphite at 293, 100 and 15 K. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 57, 790-792.
- Neree, A. T., Soret, R., Marcocci, L., Pietrangeli, P., Pilon, N., & Mateescu, M. A. (2020). Vegetal diamine oxidase alleviates histamine-induced contraction of colonic muscles. *Scientific Reports*, 10, 21563.
- Neumann, J., Kirchhefer, U., Dhein, S., Hofmann, B., & Gergs, U. (2021). The roles of cardiovascular H2-histamine receptors under normal and pathophysiological conditions. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 732842.
- Niki, E., & Noguchi, N. (2000). Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method?. *IUBMB life*, 50, 323-329.
- Nocera, S., Marcocci, L., Pietrangeli, P., Mondovì, B. (2003). New perspectives on the role of amine oxidases in physiopathology. *Amino Acids*, 24, 13.
- O'Brien, R.J, Wong, P.C., (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185-204
- O'Dell, B. L. (1976). Biochemistry of copper. *The Medical Clinics of North America*, 60, 687-703.
- O'Sullivan, J., Unzeta, M., Healy, J., O'Sullivan, M. I., Davey, G., & Tipton, K. F. (2004). Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. *Neurotoxicology*, 25, 303-315.
- Obara, I., Telezhkin, V., Alrashdi, I., & Chazot, P. L. (2020). Histamine, histamine receptors, and neuropathic pain relief. *British Journal of Pharmacology*, 177, 580-599.
- Obata, T. (2002) Semicarbazide sensitive amine oxidase (SSAO) in the brain. *Neurochemical Research*. 27, 263-268.

- Otsuka, R., Naganuma, F., Nakamura, T., Miwa, H., Nakayama-Naono, R., Matsuzawa, T., Komatsu, Y., Sato, Y., Takahashi, Y., Tatsuoka-Kitano, H., Yanai, K., Yoshikawa, T. (2022). Contribution of astrocytic histamine N-methyltransferase to histamine clearance and brain function in mice. *Neuropharmacology*, 212, 109065.
- Pacheu-Grau, D., Wasilewski, M., Oeljeklaus, S., Gibhardt, C. S., Aich, A., Chudenkova, M., Dennerlein, S., Deckers, M., Bogeski, I., Warscheid, B., Chacinska, A., Rehling, P. (2020). COA6 Facilitates Cytochrome C Oxidase Biogenesis as Thiol-Reductase for Copper Metallochaperones in Mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 432, 2067-2079.
- Panula, P. (2021). Histamine receptors, agonists, and antagonists in health and disease. *Handbook of clinical neurology*, 180, 377-387.
- Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W. L., Haas, H. L. (2015). International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacological reviews*, 67(3), 601-655.
- Panula, P., Rinne, J., Kuokkanen, K., Eriksson, K. S., Sallmen, T., Kalimo, H., & Relja, M. (1997). Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 82, 993-997
- Paradis, M., Gagné, J., Mateescu, M.-A., Paquin, J. (2010). The effects of nitric oxide-oxidase and putative glutathione-peroxidase activities of ceruloplasmin on the viability of cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 2019-2027.
- Pecul, M. (2006). Theoretical simulation of the ROA spectra of neutral cysteine and serine. *Chemical physics letters*, 427, 166-176.
- Phillips, C. P., & Snow, R. A. (1994). U.S. Patent No. 5, 334-382. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Pietrangeli P, Capuozzo E, Mateescu MA, Marcocci L (2020) Copper-containing amine oxidase purified from *Lathyrus sativus* as a modulator of human neutrophil functions. *International Journal of Molecular Medicine*, 45, 1583-1590.
- Pietrangeli, P., Federico, R., Mondovì, B., & Morpurgo, L. (2007). Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of inorganic biochemistry*, 101, 997-1004.
- Pino-Ángeles, A., Reyes-Palomares, A., Melgarejo, E., & Sánchez-Jiménez, F. (2012). Histamine: an undercover agent in multiple rare diseases?. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16, 1947-1960.

- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891.
- Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, Paquin J, Chitramuthu BP, Baranowski D, Cadieux B, Bennett HP, Seidah NG (2006) Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 98, 838-850.
- Pop, V., Kriza, A., & Ilis, M. (2002). Synthesis and stability studies in physiological-like conditions of two urea complexes of copper (II) and manganese (II). *An. Univ. Bucuresti. Chim*, 2, 63-68.
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25–39.
- Poujois, A., Djebrani-Oussedik, N., Poupon, J., & Woimant, F. (2021). Maladie de Wilson. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2021, 44-54.
- Prenesti, E., & Berto, S. (2002). Interaction of copper (II) with imidazole pyridine nitrogen-containing ligands in aqueous medium: a spectroscopic study. *Journal of inorganic biochemistry*, 88, 37-43.
- Pugin B., Barcik W., Westermann P., Heider A., Wawrzyniak M., Helling, P., Akdis C.A., O'Mahony L. (2017) A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. *Microbial Ecology in Health and Disease* 28, 1353881-1353891.
- Qian, Z. M., Ke, Y. (2001). Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism. *Brain research reviews*, 35, 287-294.
- Raptis, S. G., Anastassopoulou, J., Theophanides, T. (2000). Vibrational and theoretical studies of urea and magnesium-urea complexes. *Theoretical Chemistry Accounts*, 105, 156-164.
- Rocha, S. M., Pires, J., Esteves, M., Graça, B., & Bernardino, L. (2014). Histamine: a new immunomodulatory player in the neuron-glia crosstalk. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 120.
- Rocha, S. M., Saraiva, T., Cristóvão, A. C., Ferreira, R., Santos, T., Esteves, M., Saraiva, ., Je, G., Cortes, L., Valero, J., Alves, G., Klivanov, A., Kim, Y. S., Bernardino, L. (2016). Histamine induces microglia activation and dopaminergic neuronal toxicity via H1 receptor activation. *Journal of neuroinflammation*, 13, 1-16.
- Roesijadi, G. (1996). Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative biochemistry and physiology Part C: Pharmacology, toxicology and endocrinology*, 113, 117-123.
- Ruiz, L. M., Libedinsky, A., Elorza, A. A. (2021). Role of copper on mitochondrial function and metabolism. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 711227

- Sabolić, I., Breljak, D., Škarica, M., Herak-Kramberger, C. M. (2010). Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 23, 897-926
- Sakurai, H., Fukudome, A., Tawa, R., Kito, M., Takeshima, S., Kimura, M., Otaki, N. Nakajima, K., Hagino, T., Kawano, K., Hirai, S., Suzuki, S. (1992). Unusual accumulation of copper related to induction of metallothionein in the liver of LEC rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 184, 1393-1397.
- Salviati, L., Hernandez-Rosa, E., Walker, W. F., Sacconi, S., DiMAURO, S., Schon, E. A., Davidson, M. M. (2002). Copper supplementation restores cytochrome c oxidase activity in cultured cells from patients with SCO2 mutations. *Biochemical Journal*, 363, 321-327.
- Samygina, V. R., Sokolov, A. V., Bourenkov, G., Petoukhov, M. V., Pulina, M. O., Zakharova, E. T., Svergun, D. I. (2013). Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins. *Plos one*, 8, e67145.
- Sander, L. E., Lorentz, A., Sellge, G., Coeffier, M., Neipp, M., Veres, T., Frieling, T., Meier, P. N., Manns, M. P., Bischoff, S. C. (2006). Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut*, 55, 498-504.
- Sarkar, B., & Wigfield, Y. (1967). The Structure of Copper (II)-Histidine Chelate: the question of the involvement of the imidazole group. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 5572-5577.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., & Vécsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the neurological sciences*, 257, 221-239.
- Scheiber, I. F., Mercer, J. F., & Dringen, R. (2014). Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in neurobiology*, 116, 33-57. Agrawal DK (2001) Pharmacology and clinical efficacy of desloratadine as an anti-allergic and anti-inflammatory drug. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 10, 547-560.
- Schwartz, J. C., Arrang, J. M., Garbarg, M., Pollard, H., Ruat, M. (1991) Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiological Reviews*, 71, 1-51.
- Schwelberger, H. G., Ahrens, F., Fogel, W. A., & Sánchez-Jiménez, F. (2013). Histamine metabolism. Histamine H4 receptor: a novel drug target for immunoregulation and inflammation. London: Versita, 63-102.
- Shahid, M., Tripathi, T., Sobia, F., Moin, S., Siddiqui, M., Khan, R. A. (2009). Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an updated systematic review. *The Open Immunology Journal*, 2, 9-41.

- Sheldrick, G. M. (2008). A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 64, 112-122.
- Sheldrick, G. M. (2015). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 71, 3-8.
- Sheng, J., & Xu, Z. (2016). Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48, 399-410.
- Shulpekova, Y. O., Nechaev, V. M., Popova, I. R., Deeva, T. A., Kopylov, A. T., Malsagova, K. A., Kaysheva, A. L., Ivashkin, V. T. (2021). Food intolerance: The role of histamine. *Nutrients*, 13, 3207.
- Sigel, H., & McCormick, D. B. (1971). Structure of the copper (II)-L-histidine 1: 2 complex in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 2041-2044.
- Sorenson, J. R., & Hangarter, W. (1977). Treatment of rheumatoid and degenerative diseases with copper complexes: a review with emphasis on copper-salicylate. *Inflammation*, 2, 217-238.
- Spencer, N. J., & Hu, H. (2020). Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 17, 338-351.
- Srivastava, S., Blower, P. J., Aubdool, A. A., Hider, R. C., Mann, G. E., & Siow, R. C. (2016). Cardioprotective effects of Cu (II) ATSM in human vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes mediated by Nrf2 and DJ-1. *Scientific Reports*, 6, 1-13.
- Staines WA, Morassutti DJ, Reuhl KR, McBurney MW (1994) Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells have varied morphologies and neurotransmitters. *Neuroscience*. 58, 735-75.
- Steffen, K. J., Roerig, J. L., Mitchell, J. E., & Uppala, S. (2006). Emerging drugs for eating disorder treatment. *Expert opinion on emerging drugs*, 11, 315-336.
- Stillhart, C., Vučićević, K., Augustijns, P., Basit, A. W., Batchelor, H., Flanagan, T. R., Gesquiere, I., Greupink, R., Keszthelyi, D., Koskinen, M.,... & Müllertz, A. (2020). Impact of gastrointestinal physiology on drug absorption in special populations—An UNGAP review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 147, 105280.
- Stroud, D. A., Maher, M. J., Lindau, C., Vögtle, F-N., Frazier, A. E., Surgenor, E., Mountford, H., Singh, A. P., Bonas, M., Oeljeklaus, S., Warscheid, B., Meisinger, C., Thorburn, D. R., Ryan, M. T., (2015). COA6 Is a Mitochondrial Complex IV Assembly Factor Critical for Biogenesis of mtDNA-Encoded COX2. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5404-5415.
- Takeshita, K., Sakai, K., Bacon, K. B., & Gantner, F. (2003). Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307, 1072-1078.

- Tapiero, H., Townsend, D. Á., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 57, 386-398.
- Tararina, M. A., & Allen, K. N. (2020). Bioinformatic analysis of the flavin-dependent amine oxidase superfamily: adaptations for substrate specificity and catalytic diversity. *Journal of molecular biology*, 432, 3269-3288.
- Theophanides, T., & Harvey, P. D. (1987). Structural and spectroscopic properties of metal-urea complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 76, 237-264.
- Tiligada, E., Kyriakidis, K., Chazot, P. L., & Passani, M. B. (2011). Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS neuroscience & therapeutics*, 17, 620-628.
- Ulrich, H., Majumder, P. (2006) Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications. *Cell Proliferation*. 39, 281-300.
- Vakal, S., Jalkanen, S., Dahlström, K. M., Salminen, T.A. (2020) Human Copper-Containing Amine Oxidases in Drug Design and Development. *Molecules*;25,1293
- Vasilyev, V. B. (2019). Looking for a partner: ceruloplasmin in protein–protein interactions. *Biometals*, 32, 195-210.
- Venardos, K. M., & Kaye, D. M. (2007). Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Current medicinal chemistry*, 14, 1539-1549.
- Verwilt, P., Sunwoo, K., Kim, J. S. (2015). The role of copper ions in pathophysiology and fluorescent sensors for the detection thereof. *Chemical Communications*, 51, 5556-5571
- Vianello, R., & Mavri, J. (2012). Microsolvation of the histamine monocation in aqueous solution: the effect on structure, hydrogen bonding ability and vibrational spectrum. *New Journal of Chemistry*, 36, 954-962.
- Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S., Gitschier, J. (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper–transporting ATPase. *Nature genetics*, 3, 7.
- Wang, M. L., Zhong, G. Q., & Chen, L. (2016). Synthesis, optical characterization, and thermal decomposition of complexes based on biuret ligand. *International Journal of Optics*, 2016.
- Wang, X., Wu, L., Aouffen, M. H., Mateescu, M. A., Nadeau, R., & Wang, R. (1999). Novel cardiac protective effects of urea: from shark to rat. *British journal of pharmacology*, 128, 1477.
- Wapnir, R. A. (1998). Copper absorption and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 67, 1054S-1060S

- Wazir, S. M., Ghobrial, I. (2017). Copper deficiency, a new triad: anemia, leucopenia, and myeloneuropathy. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 7, 265-268.
- Wilson Jr, E. W., Kasperian, M. H., & Martin, R. B. (1970). Binding of copper (II) to potentially tridentate amino acid ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 92, 5365-5372.
- Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., & Foltyn, V. N. (2008). D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *The FEBS journal*, 275, 3514-3526.
- Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173-1183.
- Wu, F., Yu, J., & Gehring, H. (2008). Inhibitory and structural studies of novel coenzyme-substrate analogs of human histidine decarboxylase. *The FASEB Journal*, 22, 890-897.
- Wu, Z., Fernandez-Lima, F. A., & Russell, D. H. (2010). Amino acid influence on copper binding to peptides: Cysteine versus arginine. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21, 522-533.
- Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R. (2009). Mitochondrial Ubiquitin Ligase MITOL Ubiquitinates Mutant SOD1 and Attenuates Mutant SOD1-Induced Reactive Oxygen Species Generation. *Molecular Biology of the Cell*. 20, 4524-4530.
- Yoshikawa, T., Nakamura, T., Yanai, K. (2019) Histamine N-methyltransferase in the brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 737.
- Yoshizawa, K., Kihara, N., Kamachi, T., & Shiota, Y. (2006). Catalytic mechanism of dopamine β -monooxygenase mediated by Cu (iii)-oxo. *Inorganic chemistry*, 45, 3034-3041.
- Yuan, H., & Silberstein, S. D. (2018). Histamine and migraine. *Headache: The journal of head and face pain*, 58, 184-193.
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34, 279-309.
- Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21, 72.