

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A MONTRÉAL

OXYDATION DE LA MESALAMINE EN PRÉSENCE D'ENZYMES DE TYPES PHÉNOLOXYDASE OU  
PEROXYDASE

MÉMOIRE DE MAITRISE

PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE

MAITRISE EN CHIMIE

PAR

RIMAZ EL ZEIN

Avril 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.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 voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Professeur Mircea Alexandru Mateescu de m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche pour des études supérieures, de m'avoir soutenue, de m'avoir encouragée tout le long de mes études dans le programme de maîtrise en chimie. Je lui transmets toute ma gratitude pour son encadrement pour mon initiation à la recherche, son aide sur le plan professionnel et humain mais également pour sa patience.

Je tiens également à remercier Dre. Pompilia Ispas-Szabo pour sa gentillesse, son soutien et tout le support apporté spécialement dans la direction et la supervision de mes travaux de recherche.

Je remercie également Dr. Cahn Tien Le pour sa gentillesse et ses conseils judicieux.

Un grand Merci à la Dre Armelle Tchoumi Neree, à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal, pour son aide, ses conseils et sa disponibilité à effectuer les analyses pendant sa grossesse et malgré les difficultés du trajet.

Un grand merci également à la Dre Mariela Gomez Perez pour son aide et son soutien permanent.

Merci à tous les membres de l'équipe!

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	viii
RÉSUMÉ.....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	1
1.1 La mésalamine et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .....	1
1.1.1 Généralités sur la mésalamine.....	3
1.1.2 Structure et propriétés physico-chimiques de la mésalamine .....	3
1.1.3 Pharmacocinétique .....	5
1.1.4 Mécanisme d'action de la mésalamine .....	6
1.1.5 Métabolisme de la mésalamine.....	7
1.1.6 Toxicologie de la mésalamine .....	7
1.2 Enzymes de types oxydase avec l'oxygène moléculaire (O <sub>2</sub> ) comme substrat, catalysant divers types d'oxydation .....	8
1.2.1 La Laccase .....	8
1.2.1.1 Généralités sur la laccase.....	8
1.2.1.2 Fonctions des laccases.....	8
1.2.1.3 Propriétés des laccases.....	9
1.2.2.1. Généralités sur la céruloplasmine.....	10
1.2.2.2. Structure et fonctions de la céruloplasmine.....	10
1.2.2.3. Les principales fonctions de la céruloplasmine.....	11
1.2.2.4. Rôle de catalyseur de la céruloplasmine.....	11
1.3 Enzymes de type peroxydase, avec le peroxyde d'hydrogène comme substrat .....	11
1.3.1 La peroxydase .....	11
1.3.1.1 Généralités sur la peroxydase.....	11
1.3.1.2 Structure et fonction des peroxydases.....	12
1.3.1.3 Classification des peroxydases.....	12
1.3.2 L'hémoglobine .....	13
1.3.2.1 Généralités sur l'hémoglobine.....	13
1.3.2.2 Structure et fonction de l'hémoglobine .....	13
1.3.2.3 Fonction peroxydase de l'hémoglobine .....	13

CHAPITRE 2 PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE.....	14
2.1 Problématique.....	15
2.2 Hypothèse de recherche.....	15
2.2.1 Objectif de recherche.....	16
CHAPITRE 3 ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	19
3.1 Résumé.....	21
3.2 Abstract.....	21
3.3 Introduction.....	22
3.4 Results and discussion.....	24
3.4.1 Effect of time in the mesalamine oxidation.....	24
3.4.2 Oxidation of mesalamine using vegetal and animal enzymes.....	25
3.4.2.1 Oxidation of MS with molecular oxygen catalyzed by laccase and by ceruloplasmin.....	26
3.4.2.2 Oxidation of MS with hydrogen peroxide catalyzed by peroxidase and by hemoglobin.....	28
3.4.3 Evaluation of susceptibility to oxidation of mesalamine by cyclic voltametry.....	30
3.4.4 FTIR, <sup>1</sup> H NMR and HRMS of the oxidized mesalamine.....	31
3.5 Materials and Methods.....	36
3.5.1 Materials.....	36
3.5.2 Mesalamine spontaneous oxidation-Spectrophotometric measurements.....	36
3.5.3 Assays of enzyme activities.....	36
3.5.4 Mesalamine oxidation under enzyme catalysis.....	37
3.5.4.1 The oxidation of Ms with O <sub>2</sub> - dependent copper-containing oxidases: laccase and CP.....	37
3.5.4.2 The oxidation of mesalamine with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - dependent peroxidase and peroxidase-like Hb....	37
3.5.5 Electrochemical Measurements.....	37
3.5.6 Fourier-Transform Infrared (FTIR).....	38
3.5.7 H NMR spectroscopy.....	38
3.5.8 Mass spectrometry.....	38
3.6 Conclusions.....	38
3.7 Supplementary data.....	39
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	40
CONCLUSION.....	43
BIBLIOGRAPHIE.....	44

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les deux principales MICI sont la maladie de Crohn (à gauche) et la colite ulcéreuse (à droite). Adapté du site web <a href="https://www.gastro-casa.com/domaines-activite/maladies-inflammatoires-chroniques-de-lintestin/">https://www.gastro-casa.com/domaines-activite/maladies-inflammatoires-chroniques-de-lintestin/</a> Consulté le 04/10/2024.....	1
Figure 1.2 Les facteurs à risques et les symptômes associés aux MICI. Résumé des principaux facteurs à risques (à gauche) et des symptômes (à droite) associés aux MICI. Adapté de (Kumar <i>et al.</i> , 2019) .	2
Figure 1.3 Structure moléculaire de la mésalamine.....	3
Figure 1.4 Représentation du phénomène d'ionisation de la mésalamine mettant en relief les trois formes de la molécule (A) Forme cationique, (B) Forme amphotère, (C) Forme anionique.....	4
Figure 1.5. Variation de la solubilité de la mésalamine à 37°C en fonction du pH de 1 à 6.7 (French <i>et al.</i> , 1995).....	4
Figure 1.6 Libération de la mésalamine dépendamment de la formulation .....	5
Figure 1.7 Structure de la N-acétyl-mésalamine.....	7
Figure 1.8 Structures de composés aminosalicylates. (A) Mésalamine et (B) Sulfasalazine.....	7
Figure 1.9 Fonctions biologiques de la laccase dans différents organismes d'après (Suderman <i>et al.</i> , 2006) .....	9
Figure 1.10 Mécanisme du rôle de catalyseur de la laccase dans la réaction de réduction de l'O <sub>2</sub> avec formation de deux molécules d'eau d'après (Góralczyk-Bińkowska <i>et al.</i> , 2019).....	9
Figure 1.11 Oxydation des substrats de la peroxydase par l'hémoglobine (Hb) et le complexe hémoglobine/haptoglobine (Hb/Hp), en présence du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). L'activité peroxydase de l'Hb complexé ou non avec Hp à des ratio 1-1 et 2-2, a été évaluée à 265 nm (Kapralov <i>et al.</i> , 2009).....	114
Figure 2.1 Présentation schématique des étapes dans l'avancement du projet de maitrise.....	17
Figure 2.2 Présentation graphique des principaux résultats obtenus dans le cadre du projet de maitrise	18
Figure 3.1 UV-Vis (200–600 nm) spectra of MS recorded at various times of (a) MS (0.55 mM) alone at 24 h, 2, and 6 weeks and (b) MS (0.55 mM) in presence of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.05%) up to 24 h in PBS (50 mM). The spectra are representative of at least <i>n</i> = 3 scans for each experimental condition (all run at room temperature) .....	25
Figure 3.2 UV-Vis (200–600 nm) of MS (0.55 mM) and its oxidation product in PBS (50 mM) at room temperature in presence of the (a) Laccase (0.030 U); (b) Ceruloplasmin (0.030 U) prepared such as to present the same number of enzyme units as laccase. Spectra are representative of at least <i>n</i> = 3 scans for each experimental condition. ....	27

Figure 3.3 The UV–Vis spectra (200–600 nm) of MS (0.55 mM in PBS 50 mM) recorded at various times at room temperature with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.05% in the presence of (a) Horseradish peroxidase (1.20 mU), or (b) Hemoglobin (1.20 mU), in 50 mM PBS. Spectra are representative of at least <i>n</i> = 3 scans for each experimental condition. ....	29
Figure 3.4 Anodic cyclic voltammetry scans of hydroquinone: 0.62 V (vs Ag/AgCl) (A) of 4-aminophenol: 0.55 V (vs Ag/AgCl) (B), of mesalamine: 0.58 V (vs Ag/AgCl) (C), of acetaminophen: 0.75 V (vs Ag/AgCl) (D), and of salicylic acid: 1.1 V (vs Ag/AgCl) (E), in aqueous solution. Molecular models schematize the possible oxidation pathways. ....	31
Figure 3.5 Canonical chemical structures and appearance of (a) mesalamine powder before oxidation processing and (b) of lyophilized mesalamine after non catalytical, spontaneous oxidation in aqueous solution for 6 weeks at room temperature. ....	31
Figure 3.6 Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of mesalamine (a) and of oxidized mesalamine (b). ....	32
Figure 3.7 <sup>1</sup> H NMR of the MS (a) and of the oxidized MS form (b), (300 MHz, DMSO), abscissa axis in ppm. ....	33
Figure 3.8 High resolution mass spectrometry (HRMS) corresponding to the oxidized mesalamine. ....	35
Figure 3.9 Suggested oxidation mechanism of MS in the human body. ....	34

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Mesalamine oxidation rates with different oxidative enzymes .....	39
---	----



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

5-ASA	Acide 5 – Aminosalicylique
A	Absorbance
CP	Céruloplasmine
CU	Colite ulcéreuse
HO <sup>-</sup>	Anion Hydroxyle
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Péroxyde d'hydrogène
HQ	Hydroquinone
FTIR	Fourier Transformed InfraRouge
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies inflammatoires de l'intestin
MS	Mésalamine
OCl <sup>-</sup>	Hypochlorite
<i>p</i> -BQ	<i>para</i> -Benzoquinone
RMN	Résonance magnétique nucléaire
UV-Vis	Ultraviolet-Visible

## RÉSUMÉ

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), plus précisément la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn, affectent principalement le tractus gastro-intestinal de manière totale ou partielle. La mésalamine aussi appelée 5-ASA est utilisée depuis des décennies comme traitement de première ligne afin de soulager les symptômes associés aux MICI. Toutefois, les effets secondaires modérés voire graves (péricardite, myocardite, etc.) de la mésalamine seraient associés à sa forme oxydée. La réaction d'oxydation de la mésalamine se déroulerait dans l'organisme en présence d'oxydants, tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produit par les cellules macrophages présentes dans l'intestin inflammé.

L'objectif de ce projet consistait à étudier *in vitro* l'oxydation de la mésalamine par des enzymes de type oxydase (laccase et céruloplasmine) en présence de l'oxygène et peroxydase, en présence du peroxyde d'hydrogène. Le choix s'est porté sur ces deux enzymes parce qu'elles ont de l'affinité pour l'hydroquinone (un *p*-diphénol), qu'elles peuvent oxyder en *p*-benzoquinone. La mésalamine est un *p*-aminophénol, qui présente une similitude structurale avec l'hydroquinone; de ce fait l'hypothèse repose sur le fait que des enzymes de type phenoloxydase et peroxydase catalyseraient l'oxydation de la mésalamine.

Les spectres UV-Vis ont montré que sans enzymes, le processus d'oxydation était très lent (jours et semaines), mais il était nettement accéléré avec les oxydases, en particulier avec la peroxydase. Les spectres FTIR et RMN <sup>1</sup>H ainsi que la spectrométrie de masse a suggéré la quinone-imine comme produit de réaction. La voltamétrie cyclique a soutenu l'hypothèse du processus oxydatif et a permis un classement de la susceptibilité à la mésalamine oxydante par rapport à d'autres molécules médicamenteuses oxydables ayant des structures apparentées. La susceptibilité à l'oxydation était plus élevée pour la mésalamine que pour le Tylenol (acétaminophène) et l'aspirine (acide salicylique).

En conclusion, la mésalamine est un substrat pour des enzymes de type phenoloxydase et peroxydase, avec une activité plus élevée pour la peroxydase et serait un meilleur substrat comparé à l'acétaminophène et à l'acide salicylique.

Mots clés : Céruloplasmine, Laccase, Mésalamine, Peroxydase, Phenoloxydase, Oxydases, FTIR, UV-Vis, RMN.

## ABSTRACT

Inflammatory Chronic inflammatory bowel diseases, as ulcerative colitis and Crohn's disease, affect partially or widely gastrointestinal tract. Administration of drugs based on mesalamine also called 5-ASA have been used as first line therapy against these pathologies. Side effects related to mesalamine based therapy are often due to the oxidized form which can occasioned moderate to critic effects (i.e.: pericarditis, myocarditis, etc.). *In vivo*, the mesalamine oxidation will probably occur in presence of oxidant agents such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), principally released from neutrophils on the inflamed intestine sections.

The enzymes as phenoloxidases and peroxidases were chosen because they may recognize hydroquinone (a *p*-diphenol) as substrate and oxidize it to *p*-benzoquinone and that mesalamine, as a *p*-aminophenol, presents some similarities with hydroquinone. The UV-Vis kinetics, FTIR and  $^1H$  NMR supported the hypothesis of oxidizing mesalamine. Furthermore, mass spectrometry suggested the quinone–imine as reaction product. Without enzymes, the oxidation process was very slow (days and weeks), but it was markedly accelerated with the oxidases, particularly with peroxidase. Cyclic voltammetry supported the hypothesis of the oxidative process and allowed a ranking of susceptibility to oxidizing mesalamine in comparison with other oxidizable drug molecules with related structures. The susceptibility to oxidation was higher for mesalamine, in comparison with Tylenol (acetaminophen) and with aspirin (salicylic acid).

Key words: Ceruloplasmin, Laccase, Mesalamine, Oxidases, Peroxidase, Phenoloxidase, FTIR, UV-Vis, NMR.

# INTRODUCTION

## CHAPITRE 1

### REVUE DE LA LITTÉRATURE

#### 1.1 La mésalamine et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestins (MICI) à l'exemple de la colite ulcéreuse (CU) et de la maladie de Crohn (MC) sont des dysfonctions pathologiques qui affectent partiellement ou entièrement le tractus gastro-intestinal (Figure 1.1).

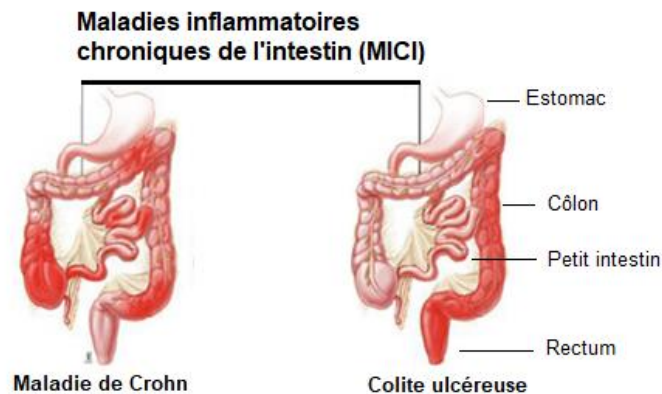


Figure 1-1 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les deux principales MICI sont la maladie de Crohn (à gauche) et la colite ulcéreuse (à droite). Adapté du site web <https://www.gastro-casa.com/domaines-activite/maladies-inflammatoires-chroniques-de-lintestin/> Consulté le 04/10/2024

Le mécanisme d'action de ces différentes maladies n'a pas encore été élucidé, d'où le défi d'établir un diagnostic précis et d'y associer une thérapie efficace. La CU et la MC sont des maladies inflammatoires chroniques récurrentes-récidives, qui affectent à la fois le microbiote intestinal et la muqueuse intestinale avec l'apparition de fistules. Des études antérieures révèlent les principaux symptômes et mets en exergue les facteurs à risque associés aux MICI (Figure 1.2). Ces différents facteurs à risques sont regroupés en quatre groupes : les facteurs environnementaux, la prédisposition génétique, la composition de la flore

microbienne et la réponse immunitaire (Karantanos et Gazouli, 2011). Ces quatre groupes entretiennent ensemble le phénotype de maladie inflammation chronique de l'intestin (MICI) (Schirbel et Fiocchi, 2010).

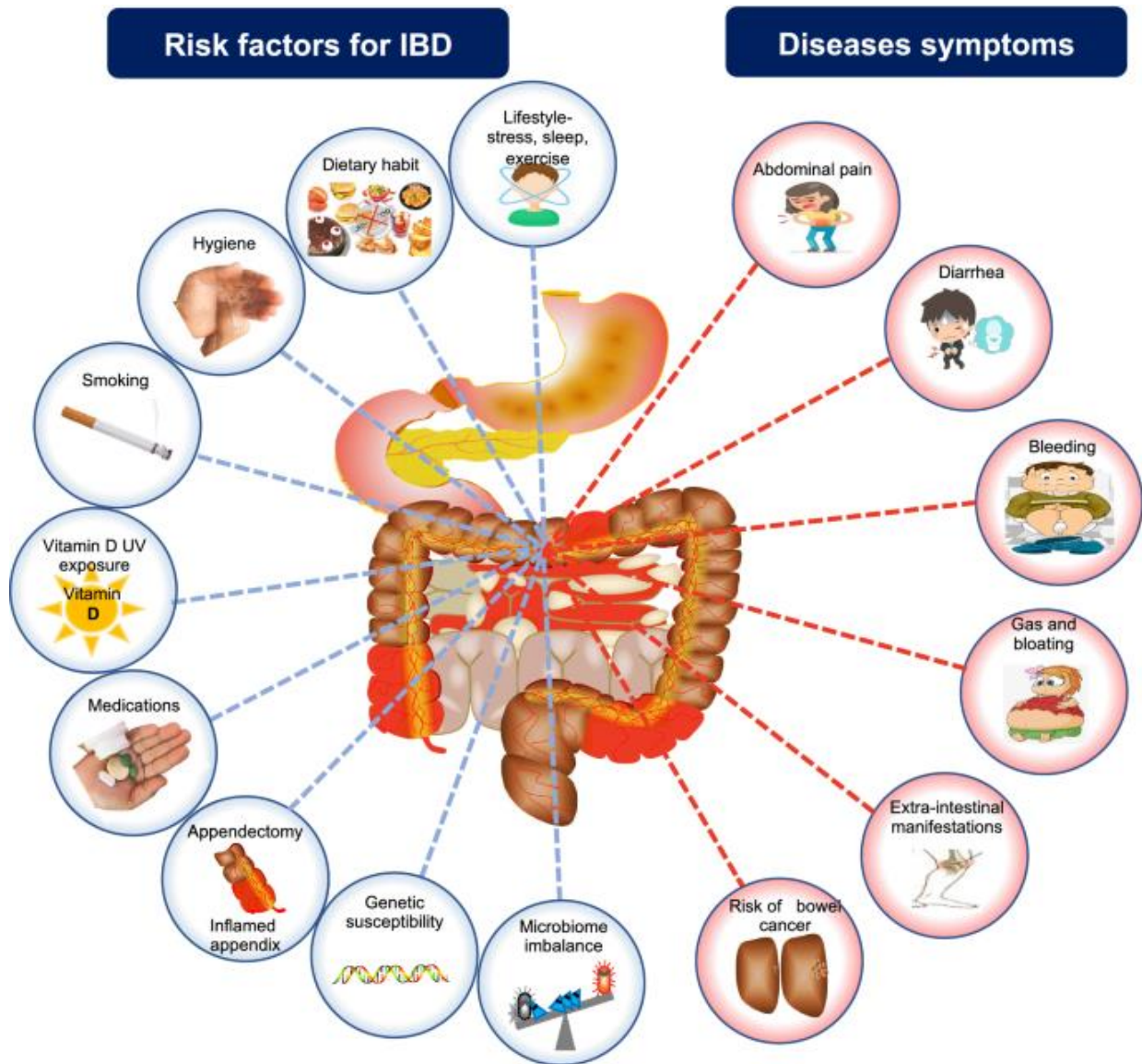


Figure 1-2 Les facteurs à risques et les symptômes associés aux MICI. Résumé des principaux facteurs à risques (à gauche) et des symptômes (à droite) associés aux MICI. Adapté de (Kumar *et al.*, 2019)

Le traitement des MICI est axé principalement sur des thérapies à long terme, nécessitant beaucoup de patience et de résilience ou des chirurgies accompagnées par des retraits de sections de l'intestin. Malgré la mise au point de ces thérapies, les patients ne sont pas à l'abri de récurrences de la maladie et de ce fait ne recouvre presque jamais une guérison complète. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés à une molécule couramment utilisée lors des processus thérapeutiques de première ligne : la

mésalamine, dont son usage seul ou en associations avec d'autres alternatives thérapeutiques ont apporté des résultats adéquats pour des patients atteints par des MICI faibles ou moyennes (Carter *et al.*, 2004).

### 1.1.1 Généralités sur la mésalamine

La mésalamine est utilisée depuis des décennies pour traiter la MC et de la CU (Rousseaux *et al.*, 2005), deux types, les plus courants de MICI. Cependant, l'administration répétitives des doses sur une périodes longues est préconisée afin d'obtenir un résultat positif et optimal chez le patient (Prakash et Markham, 1999a, 1999b). Dans de nombreux pays européens et au Canada, des formulations pour administration orale ou topiques sont commercialisées en pharmacie depuis 1982, tandis qu'aux États Unis ce n'est qu'en 1987 que la *Food and Drug Administration* (FDA) a approuvé une préparation topique de la mésalamine (Abdu-Allah *et al.*, 2016).

### 1.1.2 Structure et propriétés physico-chimiques de la mésalamine

La mésalamine, également connue sous le nom d'acide 5-aminosalicylique (5-ASA), est un dérivé aminé de l'acide salicylique qui a comme formule brute  $C_7H_7NO_3$ . La mésalamine (CAS No: 89-57-6, masse moléculaire de 153.14 Da) est obtenue sous forme de cristaux blancs avec une morphologie sous forme de d'aiguille. En solution, la couleur du produit peut être blanc, brun ou jaune ou encore peut devenir plus sombre, voire rosâtre, lorsqu'elle est exposée à l'air libre (présence d'oxygène). La mésalamine est inodore mais peut présenter dans des cas rares une légère odeur (Dash et Brittain, 1998).

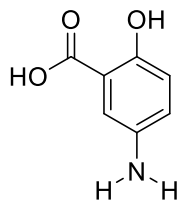


Figure 1-3 Structure moléculaire de la mésalamine

La mésalamine est modérément soluble dans l'eau (Amini *et al.*, 2022) et la solubilité de la mésalamine dans des solvants organiques est peu rapportée (Agha *et al.*, 2020). La mésalamine possède trois groupements fonctionnels à savoir un groupement hydroxyle ayant en position ortho un acide carboxylique et une amine primaire en position para (Figure 1.3). La présence d'un acide carboxylique et d'une base de type amine font de la mésalamine une espèce amphotère encore appelée ampholyte. Une

étude effectuée a montré des valeurs de pKa observées ( $pK_{a1} = 2,30$  et  $pK_{a2} = 5,69$ ), ce qui fait que la molécule a un profil de solubilité dépendant du pH avec une solubilité maximale lorsque le pH est inférieur à 2,0 et supérieur à 5,5 et une solubilité minimale lorsque le pH est compris entre ces deux valeurs (French et Mauger, 1993) (Figure 1.4).

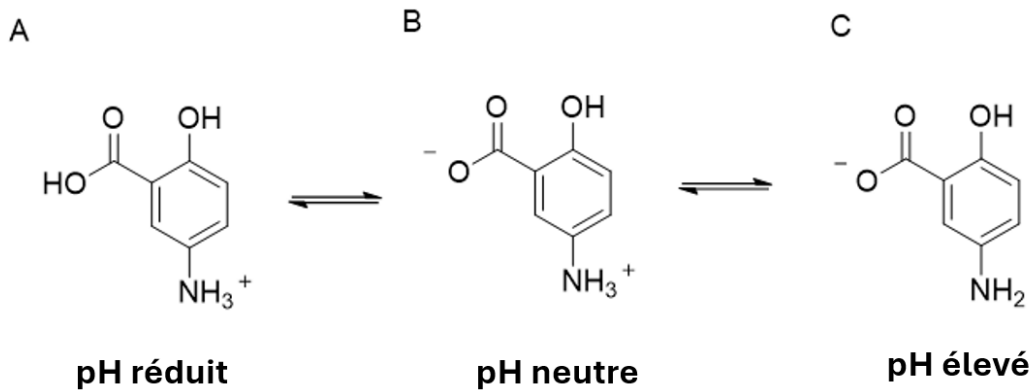


Figure 1-4 Représentation du phénomène d'ionisation de la mésalamine mettant en relief les trois formes de la molécule (A) Forme cationique, (B) Forme amphotère, (C) Forme anionique

La forme cationique est majoritaire à un pH qui est moins élevé que le point isoélectrique ( $pH_i 3,8$ ), la forme amphotère est prédominante au voisinage du point isoélectrique, et la forme anionique est majoritaire à des valeurs de pH plus élevées que point isoélectrique (Ispas-Szabo *et al.*, 2016).

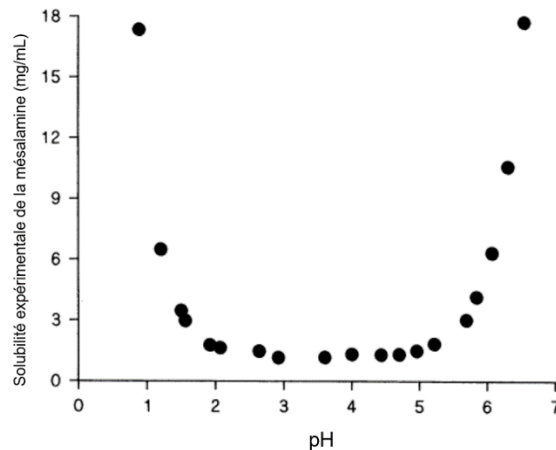


Figure 1-5. Variation de la solubilité de la mésalamine à 37°C en fonction du pH de 1 à 6.7 (French *et al.*, 1995)

En solution, le pourcentage des espèces qui vont être majoritaires va dépendre des valeurs du pKa et du pH. La vitesse de libération de la mésalamine est largement affectée par sa solubilité (Figure 1.5). De ce fait, les propriétés physico-chimiques de la mésalamine sont d'une importance capitale pour l'évaluation de la vitesse de libération contrôlée (French *et al.*, 1995).

### 1.1.3 Pharmacocinétique

Des études antérieures ont rapporté que les concentrations plasmatiques et/ou l'excrétion urinaire de la mésalamine peuvent varier dépendamment de la formule médicamenteuse qui contient le 5-ASA (Aumais *et al.*, 2003). De ce fait, nous pouvons affirmer que la libération de la mésalamine varie aussi dépendamment de la formulation, ce qui va entraîner des répercussions sur la manière dont va être affectée la muqueuse intestinale suite à son trajet dans le tractus gastro-intestinal (Figure 1.6). Cette différence au niveau du profil de libération, affecté par les différentes formules, aura possiblement un impact majeur lors du passage via la muqueuse intestinale ou de manière systémique du fait que la mésalamine est absorbée de manière plus rapide dans l'intestin grêle que dans le côlon (Khan *et al.*, 1977).

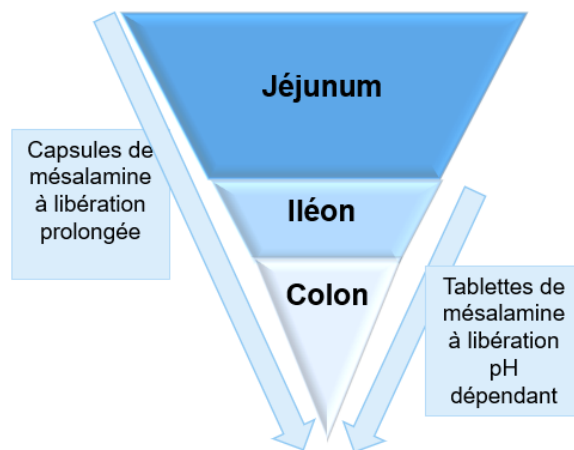


Figure 1-6 Libération de la mésalamine dépendamment de la formulation

La concentration en mésalamine dans la circulation sanguine est affectée par l'état de santé du répondant. En effet, en comparant le niveau sanguin de mésalamine.



e chez des patients souffrants de colite ulcéreuse à celui chez une personne saine, il s'avère que la concentration en mésalamine dans la circulation générale serait supérieure chez les personnes malades. Une explication à ce phénomène serait que le transport de la mésalamine, en direction de la circulation général, est plus facile au niveau de la muqueuse affectée (où le système de transport orchestré et sélectif est absent ou défectueux) comparativement à la muqueuse saine (Aumais *et al.*, 2003).

Pour des formulations de mésalamine administrables par voie orale, on observe généralement un pourcentage d'absorption du médicament compris entre 10 à 20 % et la quantité non absorbée va passer dans le côlon et sera prise en charge par des azoréductases bactériennes (de la flore intestinales) (Peppercorn et Goldman, 1972). La mésalamine dans le côlon est mal absorbée (Das *et al.*, 1973) et de ce fait, agit de manière locale sur la muqueuse colique. La mésalamine absorbée est en bonne partie éliminée de l'organisme par voie urinaire sous une forme inactive, N-acétyl-5-ASA, obtenue suite à l'action de la N-acétyl-transférase-1 (NAT1) (Allgayer *et al.*, 1989).

#### 1.1.4 Mécanisme d'action de la mésalamine

Bien que la mésalamine soit commercialisée depuis déjà quatre décennies, son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé à ce jour. Trois voies sont généralement suggérées pour l'explication du mécanisme d'action de la mésalamine. La voie 1 décrit un effet anti-inflammatoire topique sur les cellules épithéliales du côlon ce qui induit une diminution de l'inflammation par un blocage de la cyclooxygénase et/ou par une inhibition de la production de prostaglandines dans le côlon. La seconde voie montre que les effets pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* permettent une inhibition de la chimiotaxie des leucocytes par une diminution de la production de cytokines et de leucotriènes. La troisième voie consiste un piégeage des radicaux libres.

Certaines hypothèses ont été émises sur le mode d'action de la mésalamine: *i)* la mésalamine inhiberait le métabolisme de l'acide arachidonique dans l'intestin; *ii)* la mésalamine inhiberait l'inflammation des muqueuses médiée par la COX et la lipoxygénase; *iii)* l'absorption systémique serait peu élevée, ce qui laisserait penser que son action serait majoritairement locale (Papich, 2016); *iv)* La mésalamine permettrait également d'inhiber les lésions des cellules épithéliales intestinales et de l'apoptose qui sont induites par le stress oxydatif (Dallegrì *et al.*, 1990). *v)* Aussi, la mésalamine pourrait potentiellement induire une augmentation de la réponse de la protéine de choc thermique des cellules épithéliales intestinales (Burress *et al.*, 1997). La mésalamine permettrait donc une augmentation de l'induction

thermique de l'expression épithéliale intestinale de hsp72 de façon différente de celle des cellules épithéliales non intestinales (Burriss *et al.*, 1997). *vi*) La mésalamine inhiberait également la production de leucotriènes de même que la modulation du métabolisme des prostaglandines (Lauritsen *et al.*, 1986; Ligumsky *et al.*, 1981).

#### 1.1.5 Métabolisme de la mésalamine

La conversion enzymatique de la mésalamine en N-acétyl-mésalamine s'effectue au niveau des cellules épithéliales intestinales et du foie. La forme convertie (N-acétyl-mésalamine) (Figure 1.7) qui en résulte et la forme libre du médicament (non métabolisée) seront excrétées par voie urinaire (Rijk *et al.*, 1988).

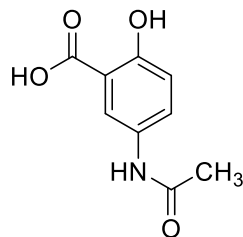
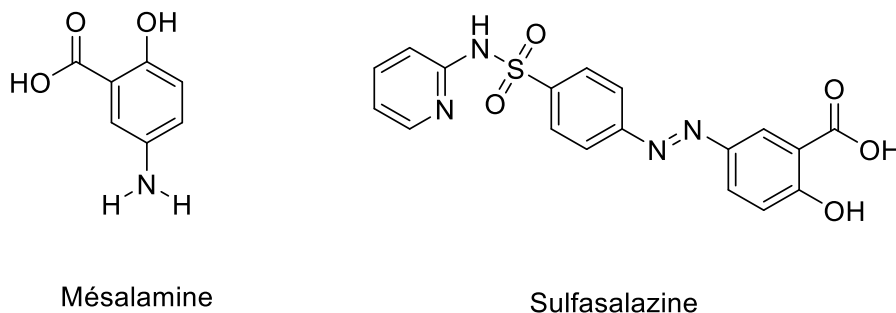


Figure 1-7 Structure de la N-acétyl-mésalamine

#### 1.1.6 Toxicologie de la mésalamine

Des études comparatives ont été effectuées entre la mésalamine et d'autres composés, tels que la sulfasalazine, ayant des similitudes au niveau des groupements fonctionnels.



Mésalamine

Sulfasalazine

Figure 1-8 Structures de composés aminosalicyles. (A) Mésalamine et (B) Sulfasalazine

Dans une étude comparative entre des formulations de mésalamine et de sulfasalazine (Figure 1.8) administrables par voies orale, la mésalamine semblait avoir une toxicité moindre (Riley *et al.*, 1988a, 1988b) comparée à celle de son analogue (Singh Bansi et Louis-Auguste, 2012).

## 1.2 Enzymes de types oxydase avec l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) comme substrat, catalysant divers types d'oxydation

### 1.2.1 La Laccase

#### 1.2.1.1 Généralités sur la laccase

La laccase (EC 1.10.3.2) est une enzyme de type oxydase multicuivre qui est impliquée dans deux réactions : la réduction de l'oxygène moléculaire couplée à l'oxydation d'une variété de substrats organiques (tels que les phénols, les polyphénols et les anilines). La laccase se retrouve majoritairement dans les plantes et les champignon (Messerschmidt et Huber, 1990; Yoshida, 1883). Les laccases ont l'avantage d'avoir une large gamme de substrats spécifiques, un pouvoir catalytique élevé et une capacité à utiliser l'oxygène moléculaire comme substrat (Jaiswal *et al.*, 2014). Les laccases furent étudiées pour la première fois en 1880 lors d'une étude effectuée premièrement par le professeur Yoshida sur la sève de l'arbre à laque japonais *Rhus vernicifera* et ensuite par le professeur Gabriel Bertrand (Lehn *et al.*, 1986)

#### 1.2.1.2 Fonctions des laccases

Les fonctions physiologiques des enzymes appartenant à la famille des laccases sont variées et diffèrent en fonction des sources. Au niveau des plantes, les laccases interviennent directement dans la dégradation de la lignine (Farnet *et al.*, 1999), dans la lignification des tissus qui constituent la plante via la polymérisation oxydative en présence de l'oxygène (Eggert *et al.*, 1998); mais aussi dans la cicatrisation (Janusz *et al.*, 2020). Certaines études ont souligné que la laccase est impliquée de manière significative dans le phénomène de virulence au niveau de diverses maladies causées par les champignons (Mayer et Staples, 2002). Au niveau des insectes, Les laccases sont également dans la sclérotinisation, tandis qu'au niveau des bactéries, elles sont impliquées dans des fonctions diverses telles que la sporulation et le métabolisme du fer (Figure 1.9) (Suderman *et al.*, 2006). Les laccases sont également très impliquées dans le processus de catalyse comme le montre la figure 1.10.

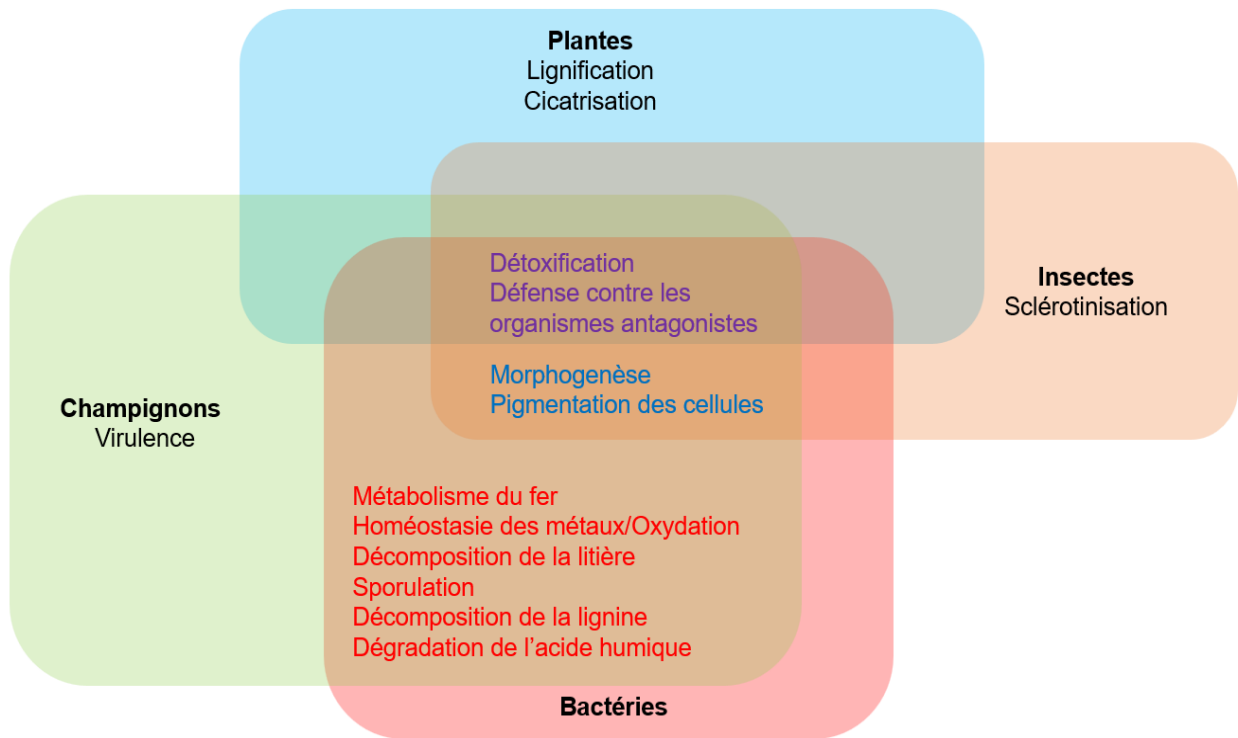


Figure 1-9 Fonctions biologiques de la laccase dans différents organismes d'après (Suderman *et al.*, 2006)

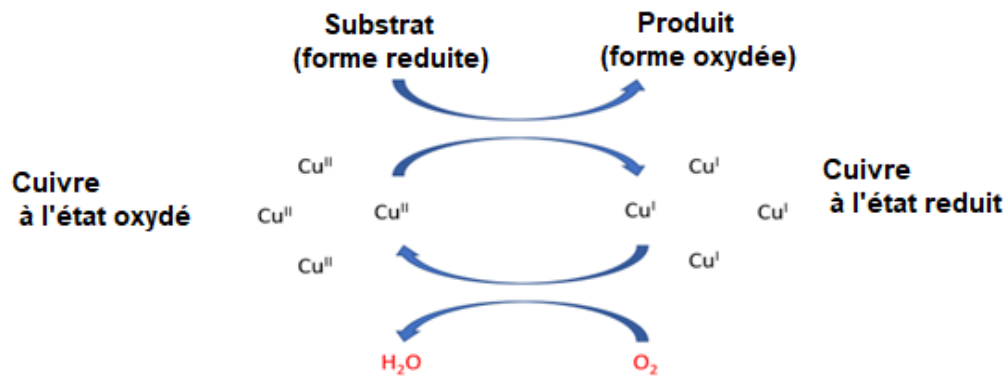


Figure 1-10 Mécanisme du rôle de catalyseur de la laccase dans la réaction de réduction de l'O<sub>2</sub> avec formation de deux molécules d'eau d'après (Góralczyk-Bińkowska *et al.*, 2019)

### 1.2.1.3 Propriétés des laccases

Les laccases sont des enzymes de type phenoloxydases dont le site actif est doté de quatre centres contenant des ions de cuivre et dont les structures sont réparties en type I, type II et type III. La classification des atomes de cuivre repose sur l'environnement de l'ion métallique et sur ses caractéristiques spectroscopiques. Le cuivre de type I n'a pas la possibilité de se lier à l'O<sub>2</sub>, il sert

uniquement de site de transfert d'électrons. Le centre qui comporte le cuivre de type I est constitué de manière générale d'un unique ion de cuivre qui est lié au minimum à deux résidus d'histidine et d'un résidu de cystéine, mais il existe des laccases où le centre de cuivre de type I va être doté d'un ligand méthionine en supplément. Le centre doté de cuivre de type III est constitué de deux ions de cuivre qui possèdent chacun trois ligands histidine et qui sont liés l'un à l'autre via un ligand de pontage. Les laccases catalysent l'oxydation d'une variété de substrats, tels que les phénols et les amines aromatiques via un processus de réduction de l'oxygène moléculaire en eau (Tuomela et Hatakka, 2011). Les laccases sont également d'excellents catalyseurs pour les processus industriels et ils représentent un acteur potentiel dans le traitement de polluants (Tuomela et Hatakka, 2011). Les laccases représentent des biocatalyseurs potentiels pour fonctionnalisation de la fibre de cellulose (Jurado *et al.*, 2011)

## 1.2.2. La Céruloplasmine

### 1.2.2.1. Généralités sur la céruloplasmine

La céruloplasmine est une enzyme sérique détectée en 1944 à partir d'un échantillon de sérum sanguin par le professeur Holmberg de l'Université de Lund en Suède (Scheinberg et Gitlin, 1952). En 1948 ce chercheur et son collègue le professeur Laurell ont réussi à l'isoler à partir du sérum de porc. Cette protéine oxydasique à cuivre est de couleur bleu ciel d'où l'appellation « coeruleplasmin » qui signifie en anglais « sky-blue plasma protein ». Cependant, le nom céruloplasmine ou « ceruloplasmin » employé actuellement, est apparu en 1952 dans une étude effectuée par les professeurs Herb Scheinberg et David Gitlin (Scheinberg et Gitlin, 1952). Vu la panoplie des fonctions qui lui sont attribuées, la céruloplasmine suscite un intérêt grandissant dans la communauté scientifique. La céruloplasmine appartient au groupe des métalloprotéines cuivriques qui se répartissent en protéines à cuivre bleu et celles qui ne présentent pas cette couleur. La céruloplasmine appartient aux métalloprotéines de couleur bleue telles que la laccase, l'azurine et l'ascorbate oxydase.

### 1.2.2.2. Structure et fonctions de la céruloplasmine

La céruloplasmine (CP, EC 1.16.3.1) est une glycoprotéine monomérique dont la masse moléculaire est approximativement de 132 kDa. La céruloplasmine est synthétisée dans le foie et se retrouve dans le plasma à hauteur de 20-50 mg/dL (Qayoom *et al.*, 2015). La céruloplasmine est dotée d'une chaîne polypeptidique de 1046 résidus d'acides aminés dont la teneur en glucides est comprise entre 7% et 8%

(Bento *et al.*, 2007). La céruloplasmine est dotée de six atomes de cuivre présents en permanence qui se retrouvent sous la forme chargée  $\text{Cu}^{2+}$ .

#### 1.2.2.3. Les principales fonctions de la céruloplasmine

La céruloplasmine est dotée de plusieurs fonctions distinctes ce qui en fait une protéine plurifonctionnelle. En effet, la céruloplasmine va permettre la conversion du fer de la forme  $\text{Fe}^{2+}$  à celle de  $\text{Fe}^{3+}$  (action ferroxidase) ce qui va permettre l'inhibition de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Bakhautdin *et al.*, 2013). De plus, La Céruloplasmine est impliquée dans la régulation des amines biogènes, la régulation du métabolisme et le transport du cuivre. La céruloplasmine est la principale protéine sérique qui transporte le cuivre dans le sang, qui a la capacité d'alimenter les tissus en cuivre de tout l'organisme (Waggoner *et al.*, 1999). Des études ont décrit un lien de causalité entre une déficience de la céruloplasmine et la perturbation du métabolisme du cuivre; ce déséquilibre en enzyme pourrait être à l'origine de certaines maladies telles que la maladie de Wilson et la maladie de Menkes (Daniel *et al.*, 2004).

#### 1.2.2.4. Rôle de catalyseur de la céruloplasmine

La céruloplasmine possède une activité catalytique importante de l'oxyde nitrique oxydase, entraînant une réduction de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique dans le plasma (Paradis *et al.*, 2010). La céruloplasmine est également connue pour catalyser l'oxydation une variété de substrats, tels que les amines aromatiques et les catéchols (Ganini *et al.*, 2012).

### 1.3 Enzymes de type peroxydase, avec le peroxyde d'hydrogène comme substrat

#### 1.3.1 La peroxydase

##### 1.3.1.1 Généralités sur la peroxydase

Les peroxydases sont des enzymes de type oxydase qui ont été découvertes au milieu du 19-ème siècle soit par Schönbein (1885) à la suite du traitement du gaïacol avec du peroxyde d'hydrogène et des extraits de plantes (Haard, 1977). Cependant ce n'est qu'à la fin du 19-ème ou le terme peroxydase sera introduit dans la littérature par Linossier (Haard, 1977). La peroxydase (EC 1.11.1.7) purifiée à partir des racines de raifort peut être considérée parmi les premières peroxydases végétales à être étudiées (Theorell, 1942).

#### 1.3.1.2 Structure et fonction des peroxydases

Les peroxydases sont des enzymes décrites comme des hémoglycoprotéines de masse moléculaire qui varie dépendamment de la source. La peroxydase est dotée d'environ 287 résidus de 16 acides aminés et comprend un pourcentage de carbohydrates d'environ 18% à savoir le glucose, le galactose, le mannose, l'arabinose, le xylose et l'hexosamine qui sont présents en tant qu'acides uroniques (Klapper et Hackett, 1965; Theorell et Akeson, 1943). La protéine est dotée d'un hème de type-b qui se retrouve au centre actif et qui se retrouve entre le domaine distal soit l'extrémité N- terminale et le domaine proximal à savoir l'extrémité C-terminale).

L'hème est la partie non protéique de l'enzyme (ou coenzyme) et représente donc le groupement prosthétique de l'enzyme. Il est associée l'apoenzyme soit la partie protéique de l'enzyme dépourvue d'activité enzymatique représentée par la chaîne polypeptidique (Henriksen *et al.*, 1998). Les peroxydases ont des fonctions diverses et interviennent dans une panoplie de processus. Les peroxydases sont des acteurs clés dans le processus de croissance ou encore dans la réduction de malléabilité de la paroi ce qui va mener à sa rigidification de manière irréversible et va ainsi limiter l'expansion cellulaire. Parmi les vraies peroxydases, la cyclooxygénase (COX) se caractérise par une structure multi-domaine et une activité catalytique hautement ciblée dont la fonction est l'oxydation de molécules spécifiques. La COX joue un rôle clé dans le contrôle de la biosynthèse de prostaglandines physiologiquement importantes (Vlasova, 2018).

#### 1.3.1.3 Classification des peroxydases

Les peroxydases sont des enzymes ubiquitaires ayant pour nomenclature EC 1.11.1.X et qui peuvent être présentes dans le règne animal mais aussi chez les plantes, les champignons, les bactéries et les protistes (Colonna *et al.*, 1999). Les peroxydases peuvent être classifiées en fonction de leurs propriétés structurelles et catalytiques. Plusieurs types de peroxydases existent dans le règne animal et végétal. La tyroïde peroxydase est une protéine glycosylée qui se situe dans la membrane apicale du thyrocyte, où elle catalyse l'oxydation de l'iodure et son incorporation ultérieure dans la molécule de thyroglobuline (Benvenga et Vita, 2018). Une des enzymes peroxydase soit le glutathion peroxydase est une enzyme qui se retrouve dans le monde animal mais dont l'activité est également détectable chez les plantes (Churin *et al.*, 1999). La catalase peroxydase qui se retrouve également chez les animaux, les plantes, les bactéries, les champignons et les levures est souvent classifiée avec les enzymes peroxydases mais elle possède à la fois une activité catalase et peroxydase (Trivedi *et al.*, 2012). Les peroxydases ont la capacité d'oxyder

efficacement un nombre élevé de substrats aromatiques et elles ont plusieurs fonctions, telles que la construction de la paroi cellulaire, la synthèse de la lignine, l'hydroxylation des dérivés aromatiques et la défense contre les pathogènes (Hiraga *et al.*, 2001).

### 1.3.2 L'hémoglobine

#### 1.3.2.1 Généralités sur l'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est une métalloprotéine qui se retrouve en majorité au niveau des globules rouges dans le sang chez les vertébrés et dans des tissus chez certains d'invertébrés, sous diverses formes. Les hémoglobines sont des protéines qui vont transporter l'oxygène et qui vont faciliter la réversibilité de liaison de l'oxygène. Les hémoglobines ont été trouvées pour la première fois dans le sang du fait de leur abondance une concentration dans le sang normal de 15 g pour 100 mL (Hardison, 1996).

#### 1.3.2.2 Structure et fonction de l'hémoglobine

La molécule d'hémoglobine présente chez les vertébrés est généralement un tétramère qui se compose de deux sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ) qui se composent chacune de 141 acides aminés et de deux sous-unités  $\beta$  ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ ) qui sont dotés chacune de 146 acides aminés. Les sous-unités ont des tailles approximativement égales et des structures quasi-similaires. Les deux dimères  $\alpha_1\beta_1$  et  $\alpha_2\beta_2$  se retrouvent autour d'un axe de symétrie double qui est présente au centre de la structure T désoxygénée et une cavité plus petite qui est présente au cœur de dans la structure R ou structure oxygénée.

#### 1.3.2.3 Fonction peroxydase de l'hémoglobine

En présence du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'hémoglobine (Hb) a une activité similaire à la peroxydase (Kapralov *et al.*, 2009). Lorsque les paramètres physiologiques sont stables, on retrouve moins de 2% de la met-hémoglobine en circulation générale, parce que le taux de réduction de l'Hb est plus élevé que celle de son oxydation. Tandis qu'en situation d'inflammation sévère, le taux de met-hémoglobine en circulation est plus élevé à cause d'une production de radicaux de superoxyde par les cellules immunitaires; par la suite le superoxyde libéré va être converti en  $H_2O_2$ , qui est un substrat pour l'activité de Hb peroxydase : d'où la relation entre l'inflammation et l'hémolyse. La circulation de l'haptoglobine (Hp) apporte une défense contre les effets toxiques de l'Hb libre. En plus, l'activité biologique de cette protéine sérique consiste à lier à recycler l'hémoglobine via la voie de signalisation médiée par des récepteurs CD163. Les travaux de Cerda et ses collaborateurs (Cerda *et Oh*, 1990) ont montré que l'association de la



protéine Hp à l'Hb aurait une activité antioxydante, diminuerait l'activité peroxydase de l'Hb et inhiberait l'agrégation de l'Hb ou l'hémolyse (Kapralov *et al.*, 2009) (Figure 1.11).

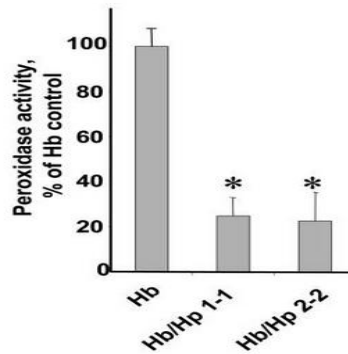


Figure 1-11 Oxydation des substrats de la peroxydase par l'hémoglobine (Hb) et le complexe hémoglobine/haptoglobine (Hb/Hp), en présence du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'activité peroxydase de l'Hb complexé ou non avec Hp à des ratio 1-1 et 2-2, a été évaluée à 265 nm (Kapralov *et al.*, 2009).

## CHAPITRE 2

### PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

Les dysfonctionnements inflammatoires chroniques tels que les maladies inflammatoires de l'intestin (MII), notamment la MC et la colite ulcéreuse CU, peuvent affecter l'ensemble du tractus gastro-intestinal ou spécifiquement le segment colorectal. La mésalamine, également appelée 5-ASA (acide 5-aminosalicylique) est utilisée depuis des décennies comme traitement au long cours de ces pathologies.

## 2.1 Problématique

La mésalamine est un agent anti-inflammatoire majeur reconnu comme traitement de première ligne de la CU, et également comme alternative prophylactique pour un traitement à long terme de la maladie, visant à prévenir la récurrence des symptômes qui y sont associés. Cependant, il existe un besoin de doses répétitives du médicament pour des résultats optimaux.

## 2.2 Hypothèse de recherche

La mésalamine présente de nombreux effets secondaires. Ces effets secondaires ne sont probablement pas dus à la mésalamine elle-même mais à sa forme oxydée. L'hypothèse du projet est que les groupes fonctionnels p-aminophénol présents dans cet agent anti-inflammatoire, sont facilement oxydés en présence d'enzymes comme la céruloplasmine (CP) et d'autres agents oxydants dans l'organisme.

L'acétaminophène (paracétamol, Tylenol), un analgésique et antipyrétique très courant, et la mésalamine, un anti-inflammatoire de la classe des aminosalicylates, sont tous deux des médicaments appartenant à la famille des aminophénols. Le surdosage de Tylenol, facilement oxydé, peut provoquer des effets indésirables majeurs courants tels qu'une hépatotoxicité sévère. Il est bien documenté que l'oxydation de l'acétaminophène par les enzymes Cytochrome c oxydase produit un métabolite réactif NAPQI (N-acétyl-p-benzoquinone imine), qui est principalement responsable de l'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène. Ce rôle de l'acétaminophène et ses points communs structurels avec la mésalamine et l'acétaminophène nous ont motivés à effectuer cette étude.

Dans cette perspective, il était intéressant d'étudier l'oxydation de la mésalamine par l'oxygène dissous ou par le peroxyde d'hydrogène en présence d'oxydases. Ces processus oxydatifs pourraient permettre de mieux comprendre l'action de la mésalamine et certains effets secondaires qui y sont associés. Les processus d'oxydation catalytiques ou non catalytiques peuvent générer des formes oxydées de mésalamine. L'étude a d'abord été menée avec des enzymes végétales comme la laccase et la peroxydase, connues pour leur capacité à oxyder les para-diphénols ou para-aminophénols, imitant l'activité de

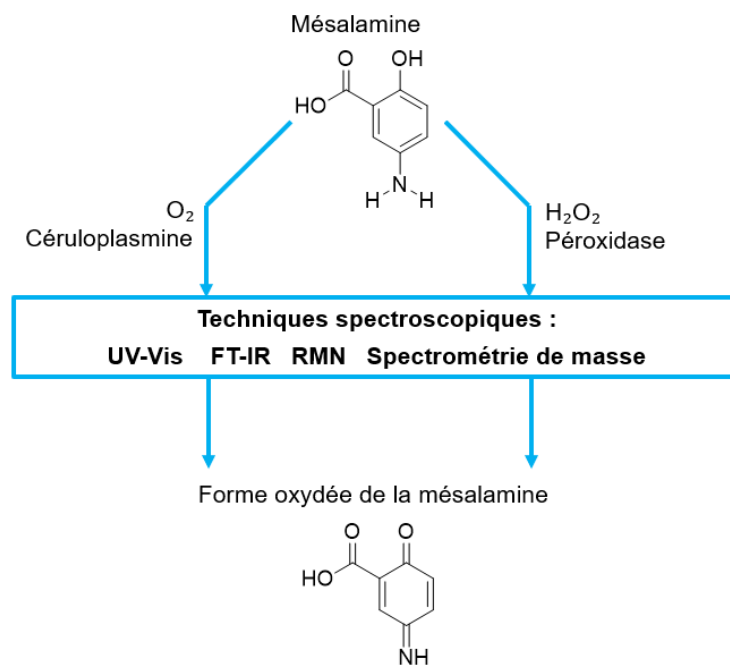
diverses enzymes animales. Ensuite, l'étude a été poursuivie avec l'enzyme animale comme la céruloplasmine (présentant une spécificité d'action similaire à celle de la laccase) et avec l'hémoglobine (exerçant une activité enzymatique comme celle de la peroxydase).

La justification du choix de ces enzymes était qu'elles seraient toutes impliquées dans l'oxydation de substrats de type hydroquinone (HQ), qui est un *p*-diphénol, et que la mésalamine, en tant que *p*-aminophénol, présente certaines similitudes avec la HQ.

Compte tenu de la similitude de la mésalamine avec les *p*-diphénols (HQ) agissant comme substrats des *p*-diphénoloxydases (c'est-à-dire la laccase) et de la céruloplasmine et avec les amines biogènes aromatiques comme substrats de la céruloplasmine, l'hypothèse d'une implication de ces deux enzymes dans l'oxydation de la mésalamine a été émise.

#### 2.2.1 Objectifs de recherche

L'objectif de recherche consistait à investiguer *in vitro* l'oxydation de la mésalamine par des enzymes de type phenoloxydases ou peroxydase. La figure 2.1 résume les principales techniques spectroscopiques utilisées lors de ce projet. Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail sont présentés dans la figure 2.2.



Voltamétrie cyclique

Hydroquinone > 4-Aminophenol > **Mésalamine** > Acétaminophène > Acide salicylique

Susceptibilité à l'oxydation de la mésalamine par rapport aux autres agents bioactifs avec des structures proches

Figure 2-1 Présentation schématique des étapes dans l'avancement du projet de maitrise

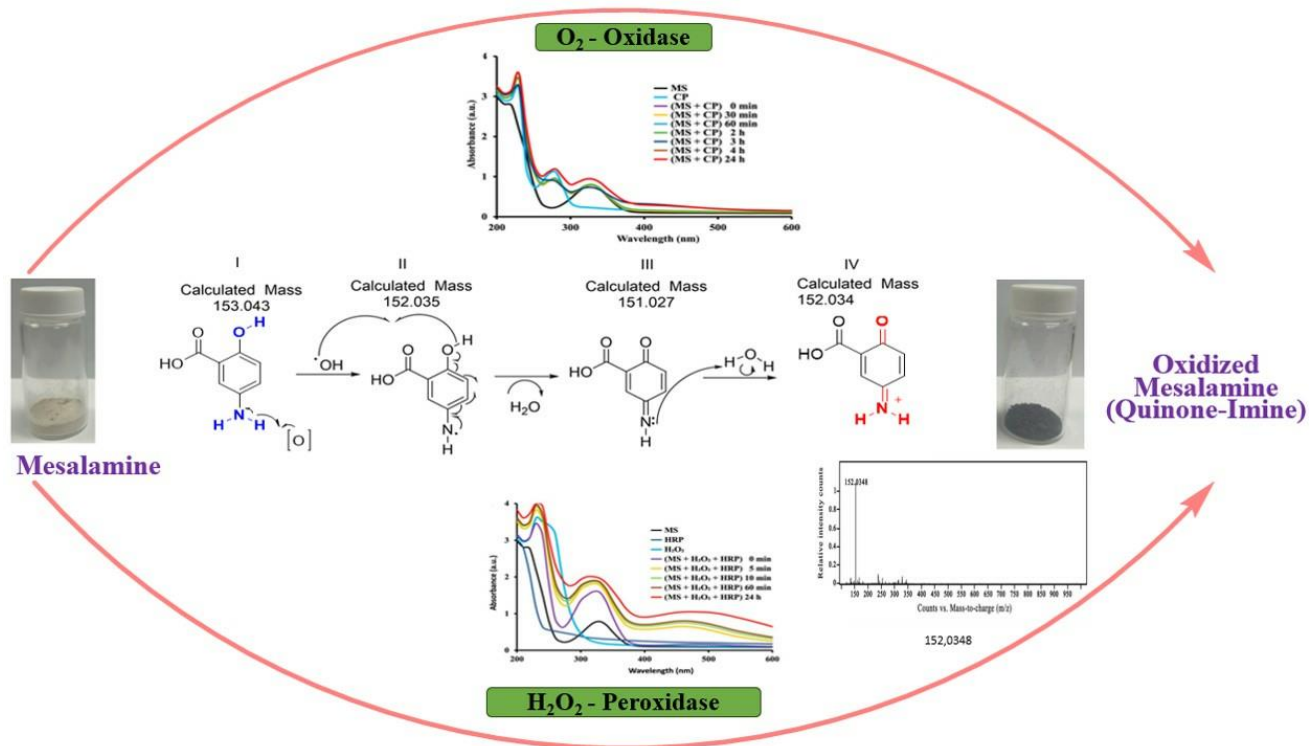


Figure 2-2 Présentation graphique des principaux résultats obtenus dans le cadre du projet de maîtrise

**CHAPITRE 3**  
**ARTICLE SCIENTIFIQUE**

**Oxidation of Mesalamine under Phenoloxidase- or Peroxidase-like Enzyme Catalysis**

Rimaz El Zein, Pompilia Ispas-Szabo, Maziar Jafari, Mohamed Sij and Mircea Alexandru Mateescu<sup>1\*</sup>

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

Cet article a été publié dans le journal : **Molecules**, 2023, 28(24), 8105.

<https://doi.org/10.3390/molecules28248105>

This article belongs to the Section: **Medicinal Chemistry**.

Special Issue: **Synthesis, Characterization and Biological Activity of Pharmaceutically Important Drug Molecules**

-----

\* Correspondence : [mateescu.m-alexandru@uqam.ca](mailto:mateescu.m-alexandru@uqam.ca)

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

Rimaz El Zein a participé dans l'élaboration du concept, elle était responsable de la rédaction du corps du manuscrit et des parties expérimentales et méthodologiques. Elle a participé dans la préparation des protocoles, dans le traitement des résultats. Elle a effectué la recherche bibliographique. Elle a également effectué toute la partie expérimentale (UV-VIS, FTIR, RMN)

Pompilia Ispas-Szabo a participé à l'organisation du manuscrit et la révision de l'article

Maziar Jafari a effectué la partie expérimentale sur la Voltamétrie cyclique, la rédaction et le dessin de la figure et a aidé à la révision de l'article

Mohamed Siaj a participé aux réponses aux évaluateurs, particulièrement aux aspects FTIR et RMN et à la révision de l'article

Mircea Alexandru Mateescu qui est l'initiateur et le directeur du projet, a supervisé toutes les activités scientifiques et a fourni les instructions requises concernant les parties expérimentales du projet et les interprétations des résultats obtenus.

## Oxidation of Mesalamine under Phenoloxidase- or Peroxidase-like Enzyme Catalysis

### 3.1 Résumé

La mésalamine, également appelée 5-ASA (acide 5-aminosalicylique), est un agent anti-inflammatoire largement utilisé et constitue un choix principal pour traiter la colite ulcéreuse. Ce rapport vise à étudier les processus enzymatiques impliqués dans l'oxydation de la mésalamine afin de mieux comprendre certains de ses effets secondaires. L'oxydation avec l'oxygène (catalysée par la céruloplasmine) ou avec le peroxyde d'hydrogène (catalysée par la peroxydase ou l'hémoglobine) a montré que ces oxydases, malgré leurs différents mécanismes d'oxydation, pouvaient reconnaître la mésalamine comme substrat et déclencher son oxydation en une quinone-imine correspondante. La raison du choix de ces enzymes était qu'elles pouvaient reconnaître l'hydroquinone (un *p*-diphénol) comme substrat et l'oxyder en *p*-benzoquinone et que la mésalamine, en tant que *p*-aminophénol, présentait certaines similitudes avec l'hydroquinone. La cinétique UV-Vis, FTIR et RMN <sup>1</sup>H ont soutenu l'hypothèse d'une oxydation de la mésalamine. De plus, la spectrométrie de masse a suggéré la quinone-imine comme produit de réaction. Sans enzymes, le processus d'oxydation était très lent (jours et semaines) mais il était nettement accéléré avec les oxydases, notamment avec la peroxydase. La voltamétrie cyclique a soutenu l'hypothèse d'un processus oxydatif et a permis un classement de la susceptibilité à l'oxydation de la mésalamine par rapport à d'autres molécules médicamenteuses oxydables ayant des structures apparentées. La sensibilité à l'oxydation était plus élevée pour la mésalamine que pour le Tylenol (acétaminophène) et l'aspirine (acide salicylique).

### 3.2 Abstract

Mesalamine, also called 5-ASA (5-aminosalicylic acid) is a largely used anti-inflammatory agent and is a main choice to treat Ulcerative Colitis. This report is aimed to investigate enzymatic processes involved in the oxidation of mesalamine to better understand some of its side-effects. Oxidation with oxygen (catalyzed by ceruloplasmin) or with hydrogen peroxide (catalyzed by peroxidase or hemoglobin) showed that these oxidases, despite their different mechanisms of oxidation, could recognize mesalamine as substrate and trigger its oxidation to a corresponding quinone-imine. The rationale of the choice of these enzymes was that they may recognize hydroquinone (a *p*-diphenol) as substrate and oxidize it to *p*-benzoquinone and that mesalamine, as a *p*-aminophenol, presents some similarities with hydroquinone. The UV-Vis kinetics, FTIR and <sup>1</sup>H NMR supported the hypothesis of oxidation of mesalamine. Furthermore, mass spectrometry suggested the quinone-imine as reaction product. Without enzymes, the oxidation



process was very slow (days and weeks) but it was markedly accelerated with the oxidases, particularly with peroxidase. Cyclic voltammetry supported the hypothesis of oxidative process and allowed a ranking of susceptibility to oxidation of mesalamine in comparison with other oxidizable drug molecules with related structures. The susceptibility to oxidation was higher for mesalamine, in comparison with Tylenol (acetaminophen) and with aspirin (salicylic acid).

Keywords: 5-ASA (5-aminosalicylic acid); Acetaminophen; Ceruloplasmin; Hemoglobin; Hydrogen peroxide; Hydroquinone; Inflammatory bowel diseases; Laccase; Mesalamine; Peroxidase

### 3.3 Introduction

A variety of chronic inflammatory dysfunctions such as inflammatory bowel diseases (**IBD**) including Crohn's disease (**CD**) and ulcerative colitis (**UC**) may affect the whole gastrointestinal tract or specifically the colorectal segment (Nikias *et al.*, 1995). Mesalamine (Abdu-Allah *et al.*, 2016), also called **5-ASA** (5-aminosalicylic acid) has been used for decades as a long-term treatment for these pathologies (Nikias *et al.*, 1995). The biochemical mechanisms of these diseases are not completely elucidated, triggering certain difficulties in designing the optimal formulation and treatment to be prescribed (Bharadwaj *et al.*, 2015; Frolkis *et al.*, 2013; Oostlander *et al.*, 2012). Mesalamine is a major anti-inflammatory agent which is recognized as the first line of treatment for mild-to-moderate active UC, and also as a maintenance drug for a long-term treatment to prevent symptoms from recurring (Actis *et al.*, 2008). However, there is a need of repetitive doses of the drug for optimal results (Thomsen *et al.*, 1998). In fact, there are some areas of uncertainty regarding the use of 5-ASA related to optimal dose for adequate response, to product formulation, to preservation of patient adherence and, more recently, to the role of mesalamine in cancer chemoprophylaxis (Meczker *et al.*, 2018).

Mesalamine is generally much better tolerated than its congeners; however various cases of fever and rashes have been reported as a post-treatment side effect in addition to serious cases such as pancreatitis. These side effects are probably not due to mesalamine itself but to its oxidized form, especially since the *p*-aminophenol functional groups present in this anti-inflammatory agent, are easily oxidized in the presence of enzymes such as ceruloplasmin (**CP**) and other oxidative agents in the organism (Oliveira *et al.*, 2011).

It was also hypothesized that certain beneficial effects of mesalamine may be related to its oxidized form. When oxidized by HOCl (a strong oxidant generated in gut inflammation) 5-ASA can activate nuclear factor erythroid 2—related factor 2 (Nrf2) while native 5-ASA is not effective (He *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2017).

The Nrf2 is a transcription factor involved in regulation of the cellular defense against oxidative and toxic injuries. Its role is to render cells resistant to inflammation and chemical carcinogens (He *et al.*, 2020). Activation of Nrf2 by oxidized form of 5-ASA can lead to induction of hemoxygenase (HO), an anti-inflammatory enzyme (EC 1.14.99.3) as a pathway involved in the anti-inflammatory effect of 5-ASA (Kang *et al.*, 2017). Acetaminophen (paracetamol, Tylenol), a very common analgesic and antipyretic, and mesalamine, an anti-inflammatory from the aminosalicylates class, are both drugs belonging to the aminophenol family. The overdose of Tylenol, easily oxidized, can cause common major adverse effects such as severe hepatotoxicity (Murakami et Yoshino, 2022). It is well documented that the oxidation of acetaminophen by CYP enzymes yields a reactive metabolite NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine) which is primarily responsible for acetaminophen-induced hepatotoxicity (Mazaleuskaya *et al.*, 2015). This fate of acetaminophen and the limited structural commonality between mesalamine and acetaminophen motivated us to initiate this investigation.

From these perspectives, it was interesting to investigate the oxidation of mesalamine by dissolved oxygen or by hydrogen peroxide in the presence of oxidases. These oxidative processes may generate a better understanding of mesalamine action and of some related beneficial or harmful side effects. The catalytical or none catalytical oxidative processes may generate oxidized forms of mesalamine. The investigation was first conducted with vegetal enzymes as laccase and peroxidase known for their capacity to oxidize *para*-diphenols or *para*-aminophenols, mimicking the activity of various animal enzymes. Then, the study was continued with the animal enzyme as ceruloplasmin (presenting an action specificity similar to that of laccase) and with hemoglobin (exerting an enzyme activity like that of the peroxidase).

Laccase (*p*-diphenoloxidase), is a multi-copper oxidoreductase-an enzyme involved in the catalytic oxidation of polyphenolic compounds (Ba *et al.*, 2013; Janusz *et al.*, 2020), forming phenoxy radicals (Sun *et al.*, 2013) with final generation of quinones that may induce color changes with modification of the UV-Vis spectra (Rich et Horsfall, 1954). Laccase and ceruloplasmin are both oxidoreductases acting on molecular oxygen (O<sub>2</sub>) as acceptor of electrons and on diphenols (*p*-quinols), on aminophenols and on phenylenediamine related substances, as donors. In addition to its action on aminophenols, Ceruloplasmin, as animal enzyme (Henry *et al.*, 1960), oxidizes aromatic biogenic amines and Fe(II) to Fe(III), being also known as ferroxidase.

Among the reactions catalyzed by oxidases acting on oxygen as acceptor of electrons, the oxidation of hydroquinone (HQ) to *p*-benzoquinone (*p*-BQ) with CP was investigated by Peisach & Levine (Peisach et Levine, 1965) and with laccase by Mateescu *et al.* (Mateescu *et al.*, 1979).

Peroxidases are enzymes that can catalyze the oxidation of a substrate by hydrogen peroxide (Everse, 2004). The majority of peroxidases are ferric heme proteins, and they are present in virtually all living species (Biggs, 1987).

Hemoglobin (**Hb**) is a hemoprotein mainly acting as oxygen carrier. It is also known to act in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as a peroxidase (Saleh Ahammad, 2013). In red blood cells, this Hb activity is controlled by the reducing environment. Extracellular, free Hb has a high potential to become a peroxidase. This potential is further increased by inflammatory cells generating superoxide, easily converted into  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a substrate of the Hb peroxidase activity, possibly acting on mesalamine (Widmer *et al.*, 2010).

The rationale of the choice of these enzymes was that all of them are supposedly involved in the oxidation of substrates of hydroquinone type, which is a *p*-diphenol, and that mesalamine, as a *p*-aminophenol, presents some similarities with HQ.

Taking into consideration the similarity of mesalamine with *p*-diphenols (HQ) acting as substrates for *p*-diphenoloxidases (*i.e.*, laccase) and for ceruloplasmin and with aromatic biogenic amines as substrates for ceruloplasmin, an involvement of these two enzymes in mesalamine oxidation was hypothesized. Furthermore, considering the release of hydrogen peroxide in various physiological and pathological conditions (*e.g.*, activation of macrophage and of neutrophil cells), an oxidation of MS with  $\text{H}_2\text{O}_2$  under the catalytic action of peroxidase and of hemoglobin was also hypothesized.

This research was focused on the enzymatic oxidation processes of mesalamine with enzymes that possibly can oxidize it *in vivo*.

### 3.4 Results and discussion

The spectrum of native MS presents a major band, abruptly decreasing over the range 200 nm–260 nm and another band with a maximum at 330 nm.

#### 3.4.1 Effect of time in the mesalamine oxidation

In the absence of oxidative enzymes, mesalamine, did not show any change in the first 24 h indicating no oxidation with dissolved oxygen only (Figure 3.1a). However, such spontaneous oxidation process occurs at longer exposure times (2 to 6 weeks) showing a slight modification in the UV-Vis spectrum of MS (Figure 3.1a) with a new band at about 230 nm and an increase of the band at 330 nm. With the time, these bands were slowly, but continuously increased, for the 6 weeks (Figure 3.1a) suggesting a low process of oxidation in enzyme-free solutions at room temperature.

Similarly, no oxidation of MS was observed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 1h, 2h and even at 24h (Figure 3.1b) in the absence of peroxidases, with superposed spectra suggesting a certain stability of mesalamine for at least 24 h in the absence of oxidative enzymes.

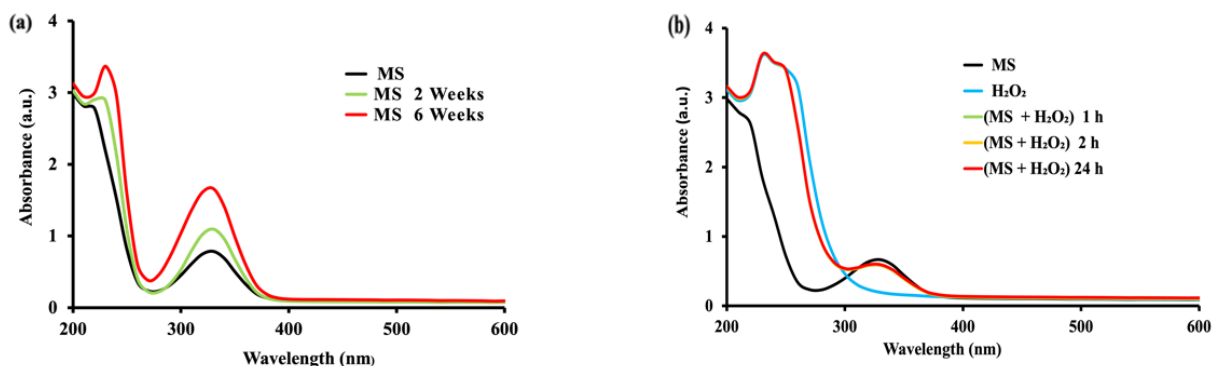


Figure 3-1 UV-Vis (200–600 nm) spectra of MS recorded at various times of (a) MS (0.55 mM) alone at 24 h, 2, and 6 weeks and (b) MS (0.55 mM) in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05%) up to 24 h in PBS (50 mM). The spectra are representative of at least  $n = 3$  scans for each experimental condition (all run at room temperature)

A slightly lower absorbency for MS in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 1h - 24h than for MS alone may be explained by a partial decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that can occur above pH 5 and considering that the measurements (Fig3.2b) have been carried-out at pH 7.0 (in PBS) and this can explain the partial decomposition of hydrogen peroxide generating the decrease of absorbency.

Since the oxidation changes found for MS in the absence of oxidases were negligible for times of hours or days (with only some effects observed after 2 and 6 weeks), it was of interest to investigate MS oxidation in the presence of some oxidases potentially involved in the oxidation of *p*-diphenols and of *p*-aminophenols.

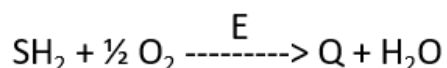
### 3.4.2 Oxidation of mesalamine using vegetal and animal enzymes

Two types of oxidases have been investigated as catalysts for the oxidation of mesalamine: i) laccase and CP (both acting with the molecular O<sub>2</sub>) and ii) peroxidase and Hb (both acting with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 3.4.2.1 Oxidation of MS with molecular oxygen catalyzed by laccase and by ceruloplasmin.

To have an answer to the question whether the phenoloxidases can accelerate the oxidation of mesalamine, we have first investigated the laccase as a copper-oxidase with catalytic properties similar, but not identical, to those of ceruloplasmin.

Both laccase and CP are enzymes able to oxidize *p*-diphenols or related aromatic phenolic substrates (SH<sub>2</sub>, e.g., HQ) to corresponding quinones (Q) e.g., *para*-benzoquinone (*p*-BQ) with the dissolved oxygen, as shown on the scheme:



Where:

E = Enzyme as laccase or as ceruloplasmin.

SH<sub>2</sub> = Substrate such as HQ or as MS.

Q = Oxidized substrate such as *p*-BQ or supposedly oxidized quinone-imine of MS.

The UV-Vis spectra showed that laccase (vegetal *p*-diphenol oxidase) strongly increased the oxidation rate of MS (Figure 3.2a) with increasing bands in UV (with a new maximal absorbency at 230 nm over the region of 230 nm–280 nm) and with slightly increasing in intensity broader flat bands in visible region (380 nm–600 nm). These preliminary results clearly showed that an oxidation of MS occurs and that the process is accelerated by the laccase copper-oxidase.

This aspect is of interest, showing that MS is susceptible to oxidation by phenoloxidases and related enzymes. Laccases, as blue-copper oxidase-type enzymes, are endowed with 4 copper atoms/molecule. They are able to catalyze the oxidation of phenolic compounds with molecular oxygen as acceptor (Jeon *et al.*, 2012). This suggests that mesalamine—molecule with *p*-amino phenolic groups—could also be easily oxidized by other multi-copper enzymes such the blood circulatory ceruloplasmin.

The CP is a blue-copper enzyme with 6 copper atoms/molecule. It is an ubiquitous mammalian circulatory enzyme present at regular levels in physiological conditions and at high values in inflammatory conditions. It was of interest to investigate the effect of CP on MS, particularly considering that amounts of MS orally administered and, in part, even from enema products (Cortot *et al.*, 2008), would be adsorbed (Qureshi *et al.*, 2005). Thus, the probability of contact between MS and circulatory CP is high. Furthermore, the MS as anti-inflammatory agent is given in inflammatory conditions (when the CP level is high). Therefore,

it appeared worth to investigate this double risk of interactions CP:MS (higher dosage of MS and increased level of CP). Indeed, our investigation found that CP was able to catalyze the oxidation of MS (Figure 3.2b) in a similar way to that catalyzed by the laccase. In both cases, the mesalamine oxidation with the mentioned oxidases was much faster than the oxidation of mesalamine alone (in enzyme-free conditions). As in case of laccase, the increase of band intensity at 330 nm for MS in presence of CP was higher ( $A_{\max} = 0.9381$ ) in 24 h (Figure 3.2b) compared with the increase of band intensity ( $A_{\max} = 0.7864$ ) for MS alone (Figure 3.1a).

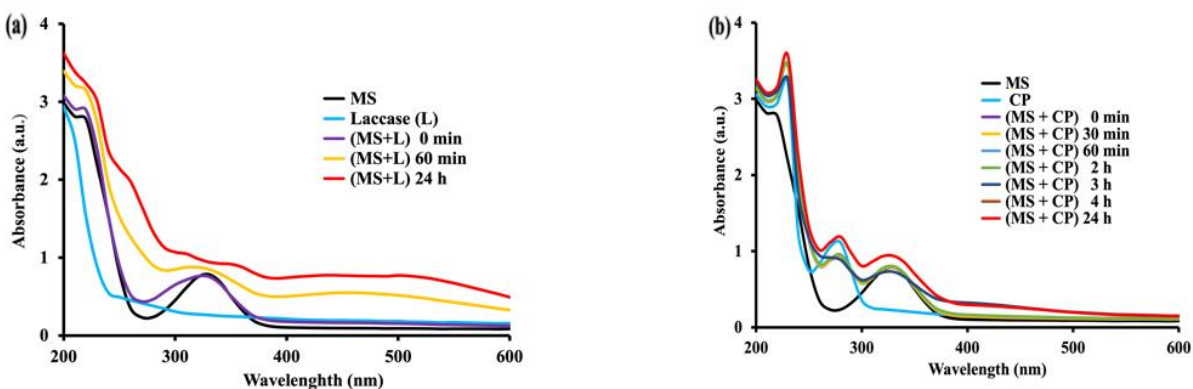


Figure 3-2 UV-Vis (200–600 nm) of MS (0.55 mM) and its oxidation product in PBS (50 mM) at room temperature in presence of the (a) Laccase (0.030 U); (b) Ceruloplasmin (0.030 U) prepared such as to present the same number of enzyme units as laccase. Spectra are representative of at least  $n = 3$  scans for each experimental condition.

In order to evaluate the potential impact of the various enzymes on the MS oxidation in function of their specificities of action, the oxidation kinetics have been conducted with the same MS substrate concentration (0.55 mM) for the whole investigation. The two oxidases: laccase and ceruloplasmin acting with molecular ( $O_2$ ) dissolved oxygen as acceptor, have been prepared such as to present the same enzyme activity in terms of Enzyme Units (U) with HQ as substrate where one U was the amounts of enzyme needed for the oxidation of one  $\mu$ mole of substrate/min. The choice of HQ was because it is a common substrate for all four enzymes used and because its structure (*para*-diphenol) has some similarities with that of the MS (*para*-aminophenol compound). Therefore, HQ was a good model substrate to evaluate the relative activities of all the investigated oxidases.

Practically, the oxidation studies with both laccase and CP oxidases have been conducted with the same number of units: 0.030 U for each of the two enzymes. The relative susceptibility to oxidation of MS under the catalysis with the two enzymes was expressed as the rate of absorbency increase (DA/time, measured

at wavelengths where there are maximal variations of spectral pattern) under catalysis of the same number of enzyme units.

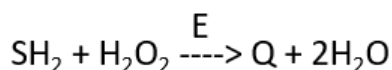
The results indicated an oxidation of MS under the laccase (0.030 U) catalysis with the rates:  $\Delta A_{230\text{nm}}/\text{min} = 0.00380\text{AU}/\text{min}$  and  $\Delta A_{330\text{nm}}/\text{min} = 0.00291\text{AU}/\text{min}$ .

These results suggest a slightly faster oxidation of MS catalyzed by laccase than that catalyzed by CP and this can be explained by differences in terms of specificity for substrate of the two enzymes.

#### 3.4.2.2 Oxidation of MS with hydrogen peroxide catalyzed by peroxidase and by hemoglobin

Since MS is administered to treat inflammatory dysfunctions and considering that in these conditions there is an enhanced production of hydrogen peroxide (particularly by activated macrophage and neutrophil cells), it was of interest to evaluate the effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on MS in the absence (Fig 3.1b) and in the presence of peroxidase or of related peroxidase-like enzymes (such as hemoglobin) that could oxidize MS in circulation or in tissues (intracellularly, in peroxisomes).

Peroxidases are enzymes able to oxidize various substrates, including *p*-diphenols or related aromatic phenolic substrates ( $\text{SH}_2$  / e.g., HQ) to corresponding quinones (Q / e.g., *p*-BQ) with the hydrogen peroxide, following the scheme:



where E = Enzyme as Peroxidase or peroxidase-like proteins, such as Hb,

$\text{SH}_2$  = Substrate such as HQ, MS

Q = Oxidized substrate such as *p*-BQ or supposedly oxidized quinone-imine of MS

As model peroxidases, we have retained the horseradish peroxidase (HRP) and hemoglobin (Hb)—a hemic protein able to exert a peroxidase-like enzyme activity, particularly after erythrocyte lysis. Both horseradish peroxidase and peroxidase-like Hb are hereto called “peroxidases”. As for laccase and CP, the amounts of HRP and of Hb have been chosen such as to exert equal enzyme activities in terms of enzyme units, allowing thus a comparison between the capacities of the two investigated enzymes to induce the MS oxidation. Since the oxidative conditions under the peroxidase or Hb catalysis occurred in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (but by different mechanisms), the oxidation processes have been conducted with much lower volumes /amounts of peroxidases (corresponding to catalytic amounts of 1.20 mU) for both HRP and Hb.

To better understand the role of specificities of action of peroxidases in the differences in terms of the MS oxidation rates, the oxidation studies with horseradish peroxidase (HRP) and with Hb were conducted in similar conditions, in terms of concentrations of MS (0.55 mM in PBS 50 mM) as for laccase and CP, but in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05%) and data were recorded at various times at room temperature. Again, to compare the effects of the used HRP and Hb, their activities have been determined with the hydroquinone common substrate (Peisach et Levine, 1965) and they have been prepared such as to present the same number of enzyme units (1.20 mU) for both peroxidase and Hb.

Figure 3.3 shows that peroxidase (HRP) and Hb exerted a marked oxidative effect on MS. It was first found that peroxidase can trigger a rapid oxidation of MS with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 3.3a), faster than that induced by Hb (Figure 3.3b). The action of peroxidase (Figure 3.3a) consisted in time-dependent major increases of bands at 230–280 nm and at 330 nm and also in new broad bands of moderate intensity in the large region 400–600 nm. This effect of HRP was much faster (5–60 min) than for any other tested enzyme-catalyzed systems (with effect in tens of minutes). As far as Hb is concerned, the oxidation of MS was fast enough (even in the absence of Haptoglobin as enhancer of peroxidase-like activity of Hb) but slower than that generated by HRP.

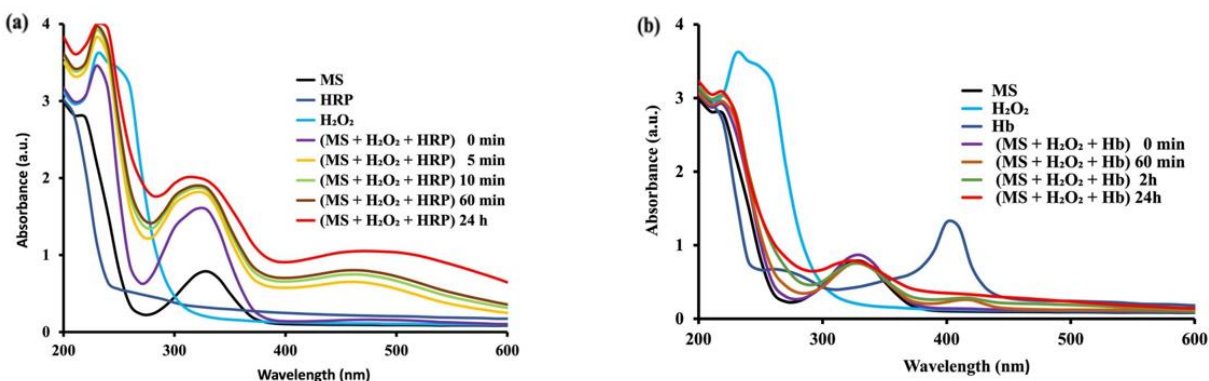


Figure 3-3 The UV–Vis spectra (200–600 nm) of MS (0.55 mM in PBS 50 mM) recorded at various times at room temperature with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05% in the presence of (a) Horseradish peroxidase (1.20 mU), or (b) Hemoglobin (1.20 mU), in 50 mM PBS. Spectra are representative of at least  $n = 3$  scans for each experimental condition.

The MS oxidation rates have been expressed, as for laccase and for CP, in terms of absorbance units, as  $\Delta A/\text{min}$  at characteristic wavelengths with maximal absorbency of the MS oxidation products (230 nm, 330 nm and 460 nm). The results indicated for peroxidase (1.20 mU) the most rapid oxidation of MS, as follows:  $\Delta A_{230\text{nm}}/\text{min} = 0.0476\text{Au}/\text{min}$ ,  $\Delta A_{330\text{nm}}/\text{min} = 0.0466\text{Au}/\text{min}$  and  $\Delta A_{460\text{nm}}/\text{min} = 0.0994\text{Au}/\text{min}$ . The MS was also oxidized with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under the catalysis of Hb (peroxidase-like activity) but the oxidation speed was definitely lower:  $\Delta A_{230\text{nm}}/\text{min} = 0.0170\text{Au}/\text{min}$ ,  $\Delta A_{330\text{nm}}/\text{min} = 0.0031\text{Au}/\text{min}$  and  $\Delta A_{460\text{nm}}/\text{min} =$



0.00064Au/min (Table 3.1, supplementary data) than that found for peroxidase. In fact, the fastest oxidation of MS was found with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalyzed by peroxidase.

It is worth to note that the oxidation patterns, as reflected by the UV-Vis spectra, differed (Fig 3.2 and Fig 3.3) when the process was catalyzed by different types of oxidases. For instance, for MS oxidation with molecular O<sub>2</sub>, the spectra obtained under CP catalysis (Fig 3.2b) are more complex (particularly in the range 250–280 nm) than those obtained with laccase (Fig 3.2a). Furthermore, the MS oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under peroxidase catalysis is associated with a marked increase of absorbency in the range 400–600 nm (Fig 3.3a). This broad absorption is clearly less pronounced under Hb catalysis and almost absent in case of laccase or of CP. It is of interest the observation of a minor, but well-defined band with maximal absorption at 414 nm (Soret band) (Ross *et al.*, 1978), ascribed to heminic group of peroxidase (Figure 3.3a), and a stronger one from Hb (Figure 3.3b). However, the broad bands found for peroxidase-catalyzed MS oxidation, covering the range 400–600 nm, are not related to this Soret band (which is sharp). These different patterns may suggest more than one oxidation product of MS, but with a major one with a structure of quinone imine (Fig 3.9).

The conclusion of this section of the investigation was that, although a spontaneous oxidation (Fig 3.1) is very slow (days and weeks) showing a certain stability of MS, when an oxidase is present, the oxidation process can be fast (minutes) and leading to different products. In order to have more info on MS oxidation, an electrochemical study was conducted by cyclic voltammetry. This investigation was also aimed to evaluate the susceptibility of oxidation of MS, in comparison with similar drugs (*i.e.*, Tylenol, known for its possible oxidation in several hours or a few days after administration).

#### 3.4.3 Evaluation of susceptibility to oxidation of mesalamine by cyclic voltammetry

Both acetaminophen and MS belong the aminophenol and consequently it was interesting to evaluate the susceptibility to oxidation of MS compared to that of structurally-related current pharmaceuticals such as acetaminophen and salicylic acid. Their susceptibilities to oxidation have been compared to those of simpler compounds as hydroquinone and *p*-aminophenols by cyclic voltammetry and ranked in terms of proneness to oxidation. All compounds showed a strong oxidation peak in the presence of an oxidative current, when compared to the control solution (Figure 3.4). The oxidation peaks of mesalamine, of acetaminophen and of salicylic acid were herein found to be 0.58, 0.75 and 1.1 V (vs Ag/AgCl), respectively (Figure 3.4) and in good agreement with previous reports (Chandrashekar *et al.*, 2011; Dou *et al.*, 2019; Madhu *et al.*, 2014; Mai *et al.*, 2021; Supalkova *et al.*, 2006; Umesh *et al.*, 2021; Vinoth Kumar *et al.*, 2019).

The oxidation potentials enabled ordering the compounds based on their ease of oxidation: mesalamine (most prone to oxidation) > acetaminophen > salicylic acid (least prone to oxidation). Moreover, the anodic voltametric curves of mesalamine (Figure 3.4) were close to those of hydroquinone and of 4-aminophenol, and this is explained by the similarity in their structures and in their oxidation mechanisms (Chandrashekar *et al.*, 2011; Dou *et al.*, 2019; Madhu *et al.*, 2014).

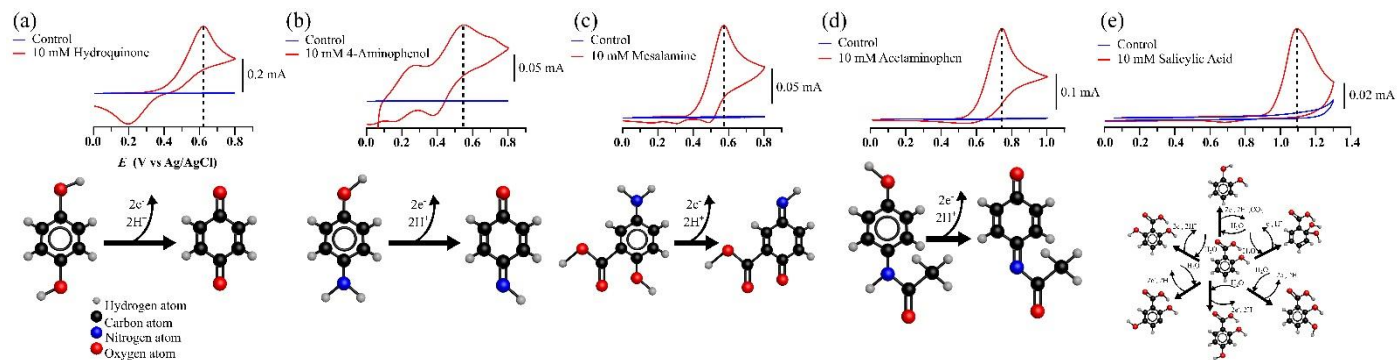


Figure 3-4 Anodic cyclic voltammograms of hydroquinone: 0.62 V (vs Ag/AgCl) (A) of 4-aminophenol: 0.55 V (vs Ag/AgCl) (B), of mesalamine: 0.58 V (vs Ag/AgCl) (C), of acetaminophen: 0.75 V (vs Ag/AgCl) (D), and of salicylic acid: 1.1 V (vs Ag/AgCl) (E), in aqueous solution. Molecular models schematize the possible oxidation pathways.

### 3.4.4 FTIR, $^1\text{H}$ NMR and HRMS of the oxidized mesalamine

The slow oxidation of mesalamine without catalysis was found after 2 and 6 weeks (Figure 3.1a), with a final color change from white (Figure 3.5a) to black (Figure 3.5b), similarly with the slow oxidation of acetaminophen.

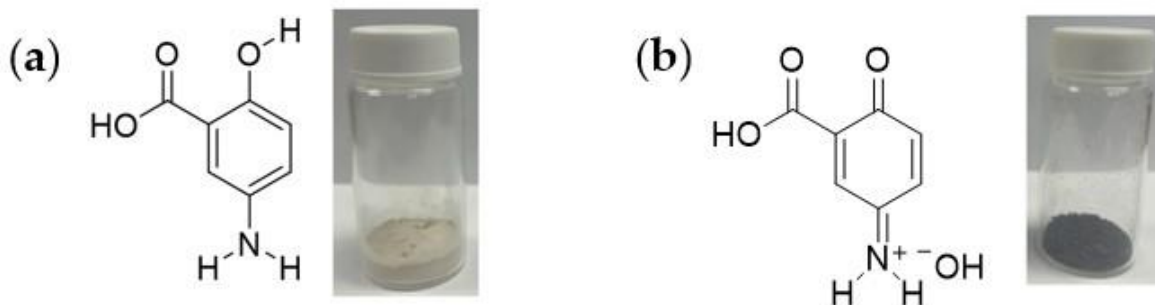


Figure 3-5 Canonical chemical structures and appearance of (a) mesalamine powder before oxidation processing and (b) of lyophilized mesalamine after non catalytical, spontaneous oxidation in aqueous solution for 6 weeks at room temperature.

The color change of mesalamine after 6 weeks (Figure 3.5) was considered as a modification of its structure, related with the spontaneous oxidation process. This was supported by Fourier-transform infrared (FTIR) spectra (Figure 3.6) showing the disappearance of the large band around  $3200\text{ cm}^{-1}$  ascribed to hydroxyl phenolic groups (Amiraslanova *et al.*, 2019) and the appearance of a new band at around  $1700\text{ cm}^{-1}$ , characteristic of the novel ketone group of the supposed quinone-imine structure (Mecke et Noack, 1958). Also, the strong band  $1342\text{--}1266$  ascribed to -C-N stretching aromatic amine is no more present in the oxidized MS. For the mesalamine molecule, the O-H stretch from the carboxylic acid group overlapped with the N-H stretching vibrations of the amine group in the region of  $2500\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ . The -NH<sub>2</sub> group vibration changed from few broad peaks to one broad peak near  $2500\text{ cm}^{-1}$  in the oxidation product. The N-H vibrations are influenced by hydrogen bonding, which cause the N-H stretching frequency to shift to lower wavenumbers (red shift) and broaden the absorption peak.

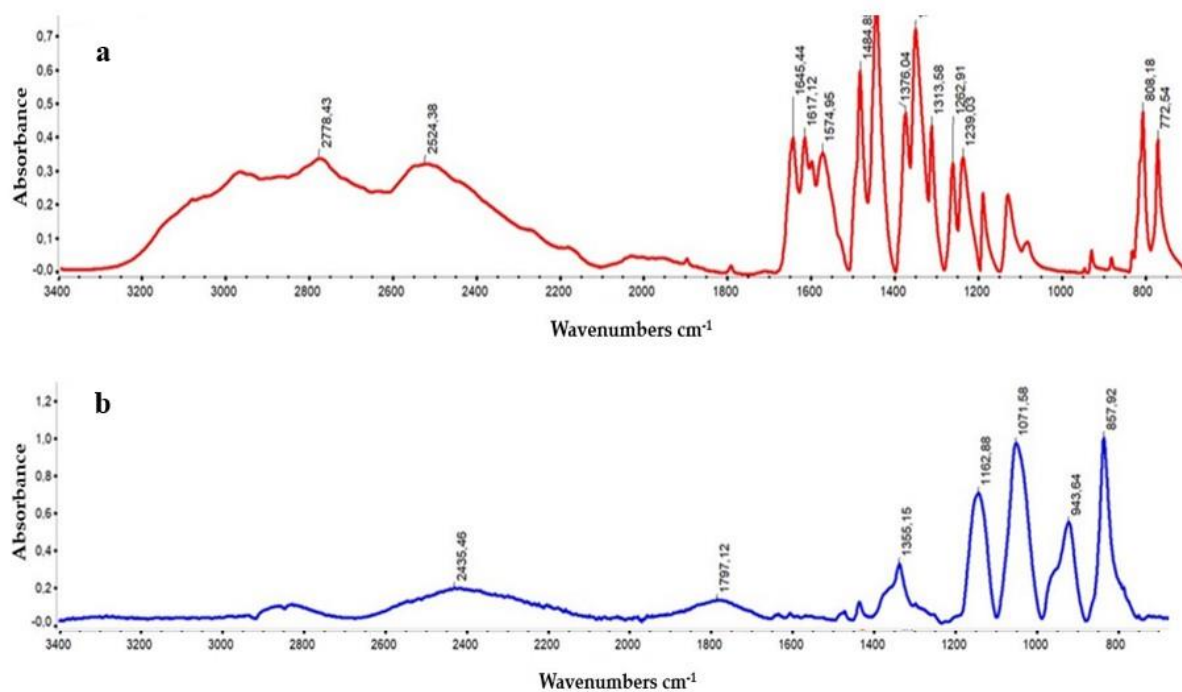


Figure 3-6 Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of mesalamine (a) and of oxidized mesalamine (b).

The oxidation of mesalamine was also supported by  $^1\text{H}$  NMR spectrometry (Figure 3.7) showing the 3 peaks of the aromatic protons shifted upfield in the oxidized form. This can be explained by the loss of aromaticity for the oxidized (quinone) form of mesalamine. The integrating peak for nonaromatic 4 protons of MS (at 10 ppm) is markedly shifted at 4.5 ppm and integrates the 3 protons of the oxidized mesalamine (also related to a shielding effect). The loss of the phenolic proton is compatible with the new quinone-imine

oxidation product of mesalamine (Figure 3.8). The OH and NH<sub>2</sub> peaks appeared at higher chemical shifts (downfield) in the NMR spectrum due to intramolecular hydrogen bonding of MS between the NH<sub>2</sub> group and the carboxylic OH group. This interaction caused significant deshielding of these protons, resulting in a downfield shift. Moreover, intermolecular hydrogen bonding with solvent molecules and other mesalamine molecules further deshielded the protons and shifted the peaks more downfield. The aromatic ring, to which both the OH and NH<sub>2</sub> groups are attached, have an electron-withdrawing effect, especially since the ring is substituted with an electron-withdrawing carboxylic group. This additionally contributes to the deshielding of the protons and causes a downfield shift. The lone pair of electrons on the nitrogen of the NH<sub>2</sub> group participates in resonance with the aromatic system. The same occurs with the lone pairs of the oxygen in the OH group. These electron delocalization effects lead to an even greater deshielding of the hydrogen atoms. These combined effects result in the affected protons to appear at a higher ppm value than simulated by prediction algorithms.

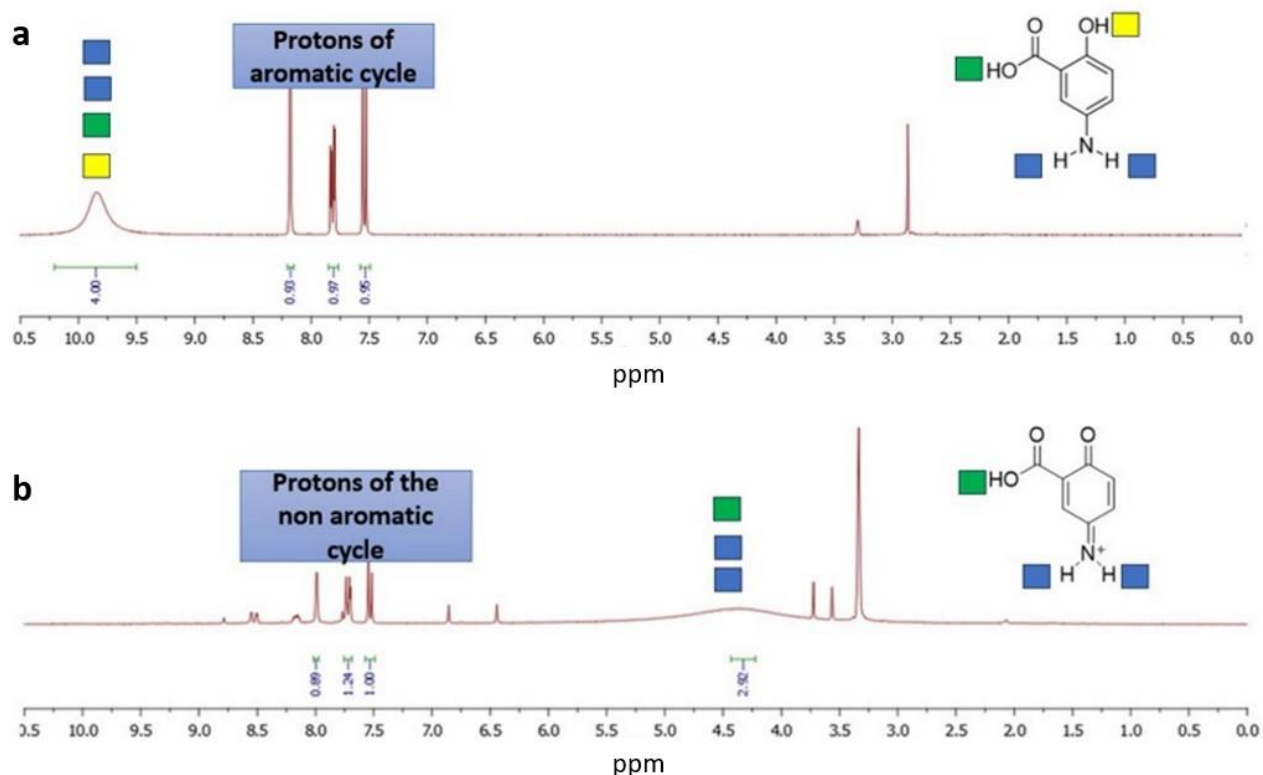


Figure 3-7 <sup>1</sup>H NMR of the MS (a) and of the oxidized MS form (b), (300 MHz, DMSO), abscissa axis in ppm.

Furthermore, High Resolution Mass spectrometry analysis (Figure 3.8) suggested that the oxidation reaction progressed up to the form with structure IV (Figure 3.9) that corresponds to a mesalamine

quinone-imine product having the same measured mass (152.034 g/mol) as the theoretical (calculated) molecular mass.

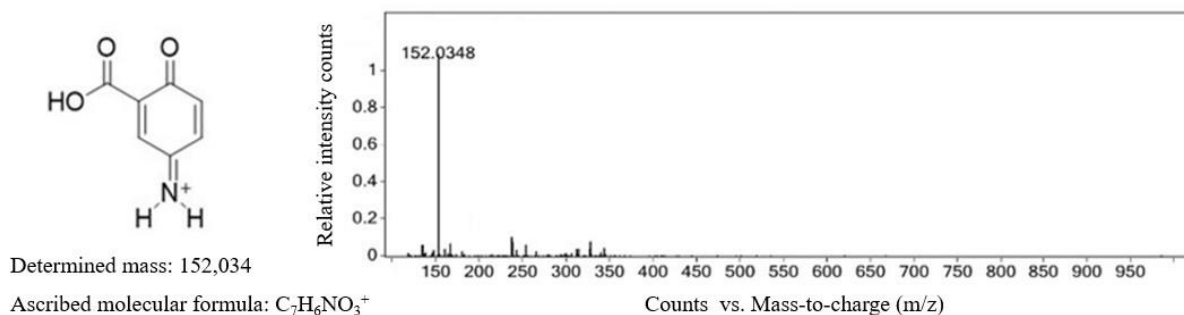


Figure 3-8 High resolution mass spectrometry (HRMS) corresponding to the oxidized mesalamine.

This supports the putative oxidative process of mesalamine in the studied system that may occur in a similar manner as in human body.

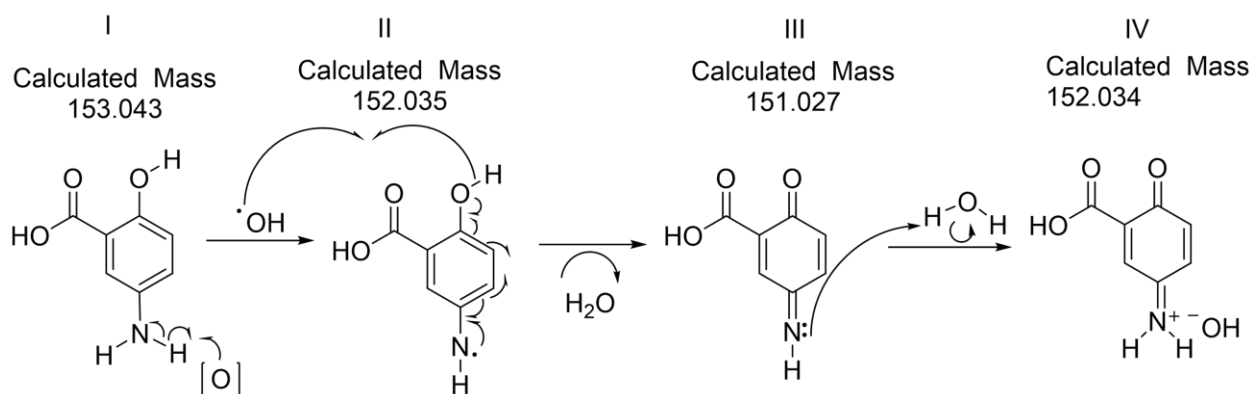


Figure 3-9 Suggested oxidation mechanism of MS in the human body.

Indeed, the oxidized form of MS as supported by UV-Vis, FTIR, <sup>1</sup>H NMR, cyclic voltammetry and finally by HRMS can be hypothetically associated with the following mechanism of the reaction (Figure 3.9) and with (Oostlander *et al.*, 2012) structures.

It is worth to mention that a similar benzoquinone imine (NAPQI) was the oxidation product found at metabolism of acetaminophen by the Cytochrome P450 system (Mazaleuskaya *et al.*, 2015). Considering a certain similarity between mesalamine and acetaminophen (both as aminophenol class) is

not excluded that the same microsomal CYP enzyme system peroxidase included (Peisach et Levine, 1965) would be involved in mesalamine oxidation in various tissues and organs, including kidney and explaining the marked side effects of mesalamine at the level of this organ (Abdu-Allah *et al.*, 2016; Meczker *et al.*, 2018; Oostlander *et al.*, 2012). This aspect is important for clinicians, particularly in relation with the recommended doses of mesalamine.

It was also supposed that 5-ASA (MS) may exert its anti-inflammatory effect in the gut through a proton-coupled electron transfer based superoxide radical anions ( $O_2^{\bullet-}$ ) elimination (Nakayama et Honda, 2021). At the same time, it was found that MS may increase the  $H_2O_2$  production (MacFie *et al.*, 2014). The hydrogen peroxide is a prooxidant factor and it also mediates pro-inflammatory cell-to-cell signaling: Could this be a new therapeutic target for inflammation? Maybe, the MS involvement in oxidative processes would necessitate for treatment of intestinal inflammatory diseases, and the association of catalase would enable to degrade the excess of  $H_2O_2$  (Allothman *et al.*, 2021).

### 3.5 Materials and Methods

#### 3.5.1 Materials

Mesalamine (pharmaceutical grade) was a product of PharmaZell (Raubling, Germany). The laccase, horseradish peroxidase (HRP) and bovine Hb were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). The CP was purified from bovine plasma by chromatography on AE-Agarose as described by Wang et al. (Wang *et al.*, 1994). The Bradford reagent was purchased from BioShop (Burlington, ON, Canada). All other chemicals were reagent-grade and have been used without further purification.

#### 3.5.2 Mesalamine spontaneous oxidation-Spectrophotometric measurements

An aqueous solution of mesalamine (0.55 mM) was stored for up to 6 weeks in order to evaluate spontaneous, catalyst-free oxidation of mesalamine with UV-Vis (200–600 nm) measurements at 1h, 2h, 24h, 2 weeks and 6 weeks. At the end of the interval, infrared (FTIR), <sup>1</sup>H NMR spectrometry and mass spectrometry were used to confirm mesalamine oxidation. The MS oxidation in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was also investigated at room temperature by taking UV-Vis spectra at 1h, 2h and 24h.

#### 3.5.3 Assays of enzyme activities

Laccase (EC 1.10.3.2), ceruloplasmin (EC 1.16.3.1), peroxidase (EC 1.11.1.7) are enzymes that belong to class of oxidoreductases and hemoglobin may act as a peroxidase-like protein. The EC (Enzyme Commission) numbers implemented by the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) allow characterization of each enzyme in function of the catalyzed reaction and substrates used. These mentioned enzymes able to recognize hydroquinone (HQ) as a common substrate and to catalyze its oxidation to *para*-benzoquinone (*p*-BQ) in the presence of oxygen (the oxidases: laccase and ceruloplasmin) or of hydrogen peroxide (peroxidases: peroxidase and hemoglobin). For this investigation, the two types of enzymes: the oxidases (laccase, CP) and peroxidases (peroxidase and Hb) have been each prepared such as to present a similar enzyme activity expressed in enzyme units (U) as the amount of enzyme to transform one μmole HQ/min.

The activities of each of the four enzymes have been determined following the method previously described<sup>108</sup>. The rate of increase in absorbance due to enzymatic oxidation of HQ to *p*-benzoquinone (*p*-BQ) was recorded at the fixed wavelength of λ= 250 nm. Briefly, for laccase and CP, the assay medium consisted in 1 mL HQ (0.36 mg/mL) and 1 mL vehicle (50 mM PBS pH 7 or deionized water). Volumes of 0.1 mL laccase or CP enzyme (or vehicle, as control), were added, and the ΔA/min were measured for 5 min.

For HRP and for Hb the same method was used in similar conditions, with the volume of the assay consisting in 1 mL of HQ (0.36 mg/mL), 1 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.0163 M) and 0.1 mL HRP or of Hb (or control vehicle: 50 mM PBS pH 7 or deionized water).

The Enzyme Activities have been calculated using the formula:

$$\text{Enzymatic assay} = \frac{\Delta A * 2.1}{18.18 * 0.1}$$

Where:

2.1 = The total volume the cuvette (in mL)

18.18 = Extinction coefficient of *p*-BQ

0.1 = Sample volume (in mL) used in the assay

Enzyme activity: result expressed in Enzyme Units (U) as  $\mu$ moles HQ oxidized /min.

#### 3.5.4 Mesalamine oxidation under enzyme catalysis

Various oxidation conditions have been investigated using solutions of mesalamine (MS) 0.55 mM in 50 mM phosphate buffered saline (PBS) pH 7.

The UV-Vis scans were taken at different time intervals.

##### 3.5.4.1 The oxidation of Ms with O<sub>2</sub>- dependent copper-containing oxidases: laccase and CP

The MS spectra (200–600 nm) were scanned in 3 mL quartz cuvettes in the absence or in the presence of 0.030 UE of laccase or of CP in 50 mM PBS pH 7. The total volume of assay was 2.5 mL: 1mL MS + 1 mL PBS + 0.5 mL Enzyme (at a ratio 2:2:1 for MS: PBS: Laccase or CP) or control/PBS only).

##### 3.5.4.2 The oxidation of mesalamine with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- dependent peroxidase and peroxidase-like Hb

The UV-Vis spectra were also scanned in 3 mL quartz cuvettes from 200–600 nm for MS in the presence of hydrogen peroxide, with and without HRP or Hb. Briefly, the samples contained: 1 mL of MS 0.55 mM, 1.45 mL PBS 50 mM (pH 7), 25  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05%) and 25  $\mu$ L of HRP (1.20 mU) or of Hb (1.20mU) or PBS vehicle (control).

#### 3.5.5 Electrochemical Measurements

Mesalamine, acetaminophen, salicylic acid, hydroquinone, and 4-aminophenol were dissolved (10 mM) in 15 mL of a previously de-aerated aqueous electrolyte solution (0.1 M KCl in deionized water). Dissolution



was assisted by several minutes of sonication at room temperature. The electrochemical cell was a three-electrode setup: 3 mm diameter standard glassy carbon working electrode (BASi), a standard graphite counter electrode and an Ag/AgCl reference electrode. With an SP-200 potentiostat (Bio-Logic, Seyssinet-Pariset, France), anodic cyclic voltammetry scan windows were optimized to include the oxidation peak of each compound (0 to 0.8 V (vs Ag/AgCl) for mesalamine, hydroquinone and 4-aminophenol, 0 to 1.0 V (vs Ag/AgCl) for acetaminophen and 0 to 1.3 V (vs Ag/AgCl) for salicylic acid. Scan rates were at 100 mV/s. The solutions were tested before and after the addition of the chemicals and each measurement was repeated in duplicate. All measurements were done in ambient conditions.

### 3.5.6 Fourier-Transform Infrared (FTIR)

FTIR spectra of the MS and the lyophilized oxidized MS were recorded by a Thermo Scientific Nicolet 6700/Smart iTR (Madison, WI, USA) using a diamond crystal, with 64 scans/min at 4 cm<sup>-1</sup> resolution in the spectral region of 4000–500 cm<sup>-1</sup>.

### 3.5.7 <sup>1</sup>H NMR spectroscopy

<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer (300 MHz) (Milton, ON, Canada). All NMR spectra were measured at 25 °C in deuterated solvents. Proton chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm. Residual protic solvent DMSO (<sup>1</sup>H, 3.33 ppm).

### 3.5.8 Mass spectrometry

High-resolution mass spectra (HRMS) were measured by direct injection of the samples in the Mass Spectrometry Time of Flight (Agilent Technologies) in electrospray mode by using the analytical platform of the CERMO-FC Center at the University of Quebec at Montreal (UQAM).

## 3.6 Conclusions

This present study showed that mesalamine, an anti-inflammatory drug of the aminophenol class, undergoes a slow oxidation process that may be accelerated by oxidases with oxygen as substrate such as ceruloplasmin, or with hydrogen peroxide as substrate such as peroxidases and hemoglobin. The UV-Vis kinetics, FTIR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy supported the hypothesis of oxidation of mesalamine. Moreover, in the conditions of the present study, an oxidation pathway of mesalamine was suggested as occurring *in vivo* and the HRMS analysis indicated a quinone-imine as reaction product of mesalamine. The cyclic voltammetry measurements supported the hypothesis of an oxidative process and allowed a ranking of susceptibility to oxidation of mesalamine in comparison with other molecules with related structures

showing a higher susceptibility to oxidation of mesalamine, in comparison with Tylenol (acetaminophen) and with Aspirin (salicylic acid).

In conditions of a continuously growing interest in mesalamine as an anti-inflammatory agent, this study contributes to a better knowledge of adverse or even of associate effects of 5-ASA as drug for treatment of IBD and other inflammatory dysfunctions.

### 3.7 Supplementary data

Tableau 3.1 Mesalamine oxidation rates with different oxidative enzymes

Enzymes type	Enzymes units (U) for the oxidation process	Oxidation rates of MS		
		$\Delta A_{230nm}/min$	$\Delta A_{330nm}/min$	$\Delta A_{460nm}/min$
<b>Oxidase (with O<sub>2</sub>)</b>				
Laccase	0.030 U	0.00380	0.00291	NA*
CP	0.030 U	0.00353	0.00244	NA*
<b>Peroxidase (with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>				
Peroxidase	1.20 mU	0.04760	0.0466	0.09940
Hb	1.20 mU	0.01700	0.0031	0.00064

\* NA : Not applicable

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) dont les formes les plus connues sont la MC et la CU se caractérisent par troubles intestinaux chroniques. Ces maladies, dont les causes demeurent jusqu'à ce jour peu connues, peuvent avoir des effets néfastes, même graves, pouvant aller jusqu'à l'ablation complète du côlon si elles ne sont pas traitées à temps. La mésalamine est un médicament antiinflammatoire parmi les plus utilisés pour traiter ces dysfonctions. Ce médicament est largement prescrit surtout aux États Unis où le nombre de prescriptions a dépassé la barre des 2 millions en 2020. L'administration de la mésalamine se fait par voie orale ou rectale dépendamment des formes de la maladie et son efficacité a été prouvée dans les deux cas. Les comprimés par voie orale sont souvent prescrits lorsque les symptômes sont légers ou modérés et le traitement par voie rectale est utilisé lorsque les symptômes sont graves. Les effets secondaires associés à la prise de ce médicament sont le plus souvent modérés mais certains troubles graves tels que la péricardite et la myocardite ont été rapportés.

La CP est une enzyme circulatoire ubiquitaire (Musci *et al.*, 2014) présente à des niveaux réguliers dans des conditions physiologiques et à des valeurs élevées dans des conditions inflammatoires (Liu *et al.*, 2022). Une étude de l'effet de la céruloplasmine sur la mésalamine a de ce fait toute son importance compte tenu notamment des quantités de MS administrées. Ainsi, la probabilité de contact entre la mésalamine et la CP en circulation est élevée. De plus, la mésalamine est administrée dans des conditions inflammatoires (lorsque le niveau de CP est élevé). Par conséquent, il a semblé utile d'étudier ce double risque d'interactions CP:MS (dose plus élevée de MS et niveau accru de CP) en conditions inflammatoires. La recherche effectuée a permis de révéler que la CP était capable de catalyser l'oxydation de la mésalamine. Il était ressorti de cette étude que l'oxydation de la mésalamine en présence d'oxydases est beaucoup plus rapide que l'oxydation de la mésalamine seule soit en l'absence d'enzymes catalytiques. Afin d'évaluer l'impact potentiel des différentes enzymes sur l'oxydation de la MS en fonction de leurs spécificités d'action, l'étude de la cinétique d'oxydation était de ce fait primordiale. Les deux oxydases, laccase et ceruloplasmine agissant avec l'oxygène dissout moléculaire ( $O_2$ ) comme accepteur, ont été préparées de manière à présenter la même activité enzymatique en termes d'unités enzymatiques (U) avec HQ comme substrat. Le choix du HQ est dû au fait qu'il s'agit d'un substrat commun aux quatre enzymes utilisées et que sa structure (para-diphénol) présente certaines similitudes avec celle du MS

(composé para-aminophénol). Par conséquent, HQ est un bon substrat modèle pour évaluer les activités relatives des oxydases étudiées. Les résultats obtenus au cours de cette présente étude suggèrent une oxydation légèrement plus rapide de la MS catalysée par laccase que celle catalysée par CP et ceci peut s'expliquer par des différences en termes de spécificité pour le substrat des deux enzymes.

Puisque la MS est administrée pour traiter les dysfonctions inflammatoires et considérant que dans ces conditions il y a une production accrue de peroxyde d'hydrogène (en particulier par les macrophages activés et les cellules neutrophiles), il était intéressant d'évaluer l'effet de  $H_2O_2$  sur la MS en l'absence et en présence de peroxydase ou d'enzymes apparentées à la peroxydase qui pourraient oxyder la MS dans la circulation ou dans les tissus (de manière intracellulaire, dans les peroxysomes).

En tant que peroxydases modèles, la peroxydase de raifort (HRP) et l'hémoglobine (Hb), une protéine héminique capable d'exercer une activité enzymatique de type peroxydase, en particulier après la lyse des érythrocytes étaient appelées « peroxydases ». Afin d'accroître la connaissance des rôles des spécificités d'action des peroxydases dans les différences de taux d'oxydation MS, il était intéressant d'effectuer des études d'oxydation avec la peroxydase de raifort (HRP) et avec Hb dans des conditions similaires à la laccase et CP, mais en présence de  $H_2O_2$ .

Une conclusion à ce volet est que l'oxydation de mésalamine peut s'effectuer au cours du temps de manière spontanée soit en l'absence d'enzymes (réaction lente et nécessitant des jours voire des semaines). Cependant, en présence d'enzymes qui catalysent la réaction telles que les oxydases, le processus d'oxydation augmente de manière importante, ne nécessitant que des heures voire des minutes afin que la réaction se déroule. Pour asseoir les résultats obtenus avec la spectrométrie UV-VIS, une étude électrochimique était nécessaire afin de se doter d'une meilleure compréhension du processus d'oxydation de la MS et la voltamétrie cyclique répondait aux critères demandait aux fins de cette étude. Il a été important d'étudier la susceptibilité à l'oxydation de la MS, en comparaison avec des médicaments similaires tels que Tylenol qui est connu pour sa possible oxydation en quelques heures ou quelques jours après l'administration. En effet, l'acétaminophène et le MS appartiennent tous deux à la famille des aminophénols et, par conséquent, il est intéressant d'évaluer la sensibilité à l'oxydation du MS par rapport à celle des produits pharmaceutiques avec des structures semblables tels que l'acétaminophène et l'acide salicylique et de comparer leur susceptibilité à l'oxydation comparée à celles de composés plus simples comme l'hydroquinone. Par voltampérométrie cyclique ces agents ont été mammaire classées en fonction de leur

propension à l'oxydation. Les résultats de cette étude ont pu permettre de classer les produits étudiés selon leurs potentiels d'oxydation et leur facilité d'oxydation. Il ressort de cette étude que la mésalamine est plus sujette à l'oxydation comparativement à l'acétaminophène, et à l'acide salicylique (la moins sujette à l'oxydation). Les courbes voltamétriques anodiques de la mésalamine ont montré une similitude avec l'hydroquinone et le 4-aminophénol, ce qui s'explique par la similitude de leurs structures et de leurs mécanismes d'oxydation. Les résultats de cette étude ont été également appuyés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), par la RMN du proton mais également par l'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution ce qui a permis de vérifier que le produit oxydé correspond à un produit de quinone-imine mésalamine. Ceci soutient le processus oxydatif putatif de mésalamine dans le système étudié qui peut se produire d'une manière semblable comme dans le corps humain.

Il convient de mentionner qu'une benzoquinone imine similaire (NAPQI) était le produit d'oxydation trouvé lors de la métabolisation de l'acétaminophène par le système Cytochrome P450. Compte tenu d'une certaine similitude entre la mésalamine et l'acétaminophène (tous deux dans la classe des aminophénols), il n'est pas exclu que le même système enzymatique microsomal du CYP puisse être impliqué dans l'oxydation de la mésalamine dans divers tissus et organes, y compris les reins en expliquant les effets secondaires marqués de la mésalamine au niveau de cet organe (Abdu-Allah *et al.*, 2016; Meczker *et al.*, 2018; Oostlander *et al.*, 2012). Cet aspect est important pour les cliniciens, en particulier sur la relation avec les doses recommandées de mésalamine. Il est également possible que le 5-ASA (MS) puisse exercer son effet anti-inflammatoire dans l'intestin par un transfert d'électrons couplé au proton basé sur des anions radicaux ( $O_2^{\bullet-}$ ) superoxyde. Dans le même temps, il a été constaté que la MS peut augmenter la production de  $H_2O_2$  (MacFie *et al.*, 2014). Le peroxyde d'hydrogène est un facteur pro-oxydant et il intervient également dans la signalisation pro-inflammatoire des cellules ce qui pourrait laisser croire que c'est une nouvelle cible thérapeutique pour l'inflammation. De plus, l'implication de la MS dans les processus oxydatifs nécessiterait pour le traitement des maladies inflammatoires intestinales, l'association de la catalase capable de dégrader l'excès du peroxyde d'hydrogène.

## CONCLUSION

En conclusion, cette présente étude a montré que la mésalamine, un médicament anti-inflammatoire de la classe des aminophénols, subit un processus d'oxydation lent qui peut être accéléré par des oxydases avec de l'oxygène comme substrat telles que la céruloplasmine, ou avec du peroxyde d'hydrogène comme substrat telles que des peroxydases et de l'hémoglobine. La cinétique UV-Vis, la spectroscopie FTIR et RMN  $^1\text{H}$  ont conforté l'hypothèse d'une oxydation de la mésalamine. De plus, dans les conditions de la présente étude, il a été suggéré qu'une voie d'oxydation de la mésalamine se produisait *in vivo* et l'analyse HRMS a indiqué une quinone-imine comme produit de réaction de la mésalamine. Les mesures de voltamétrie cyclique ont soutenu l'hypothèse d'un processus oxydatif et ont permis un classement de la susceptibilité à l'oxydation de la mésalamine par rapport à d'autres molécules de structures apparentées, montrant une susceptibilité plus élevée à l'oxydation de la mésalamine, par rapport aux molécules d'acétaminophène et d'acide salicylique.

Dans un contexte d'intérêt toujours croissant pour la mésalamine en tant qu'agent anti-inflammatoire, cette étude contribue à une meilleure connaissance des effets indésirables, voire associés, du 5-ASA en tant que médicament pour le traitement des MII et d'autres dysfonctions inflammatoires.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abdu-Allah, H. H., El-Shorbaji, A., Abdel-Moty, S. G., El-Awady, R. et Abdel-Alim, A. (2016). 5-Aminosalicylic acid (5-ASA): a unique anti-inflammatory salicylate. *Med Chem (Los Angeles)*, 6, 306-315.
- Actis, G. C., Pазienza, P. et Rosina, F. (2008). Mesalamine for inflammatory bowel disease: recent reappraisals. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 7(1), 1-5.
- Agha, E. M. H., Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Hemmati, S., Martinez, F. et Jouyban, A. (2020). Solubility and thermodynamic properties of mesalazine in {2-propanol+ water} mixtures at various temperatures. *Journal of Molecular Liquids*, 301, 112474.
- Allgayer, H., Ahnfelt, N. O., Kruis, W., Klotz, U., Frank-Holmberg, K., Söderberg, H. N. et Paumgartner, G. (1989). Colonic N-acetylation of 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 97(1), 38-41.
- Allothman, M., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M. A. (2021). Design of catalase monolithic tablets for intestinal targeted delivery. *Pharmaceutics*, 13(1), 69.
- Amini, T., Haghtalab, A. et Seyf, J. Y. (2022). Experimental study and thermodynamic modeling of mesalamine and azathioprine solubility in some choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 67(10), 3252-3267.
- Amiraslanova, M., Alieva, A., Akhmedbekova, S., Ibragimova, M. D., Mamedzade, F., Rustamov, R., Alieva, S. R., Dadasheva, N. et Isaeva, P. (2019). Using IR Spectroscopy to Study Structures of Benzylamine Phenol-Formaldehyde Oligomers. *Journal of Structural Chemistry*, 60, 1037-1042.
- Aumais, G., Lefebvre, M., Tremblay, C., Bitton, A., Martin, F., Giard, A., Madi, M. et Spénard, J. (2003). Rectal tissue, plasma and urine concentrations of mesalazine after single and multiple administrations of 500 mg suppositories to healthy volunteers and ulcerative proctitis patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 17(1), 93-97.
- Ba, S., Arsenault, A., Hassani, T., Jones, J. P. et Cabana, H. (2013). Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical reviews in biotechnology*, 33(4), 404-418.
- Bakhautdin, B., Febbraio, M., Goksoy, E., de la Motte, C. A., Gulen, M. F., Childers, E. P., Hazen, S. L., Li, X. et Fox, P. L. (2013). Protective role of macrophage-derived ceruloplasmin in inflammatory bowel disease. *Gut*, 62(2), 209-219.
- Bento, I., Peixoto, C., Zaitsev, V. N. et Lindley, P. F. (2007). Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63(2), 240-248.
- Benvenega, S. et Vita, R. (2018). Thyroid Peroxidase☆. Dans I. Huhtaniemi et L. Martini (Ed), *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)* (p. 433-438). Academic Press.
- Bharadwaj, S., Kulkarni, G. et Shen, B. (2015). Menstrual cycle, sex hormones in female inflammatory bowel disease patients with and without surgery. *Journal of digestive diseases*, 16(5), 245-255.
- Biggs, K. (1987). Phenolic cross-linking in the plant cell wall. *Physiology of cell expansion during plant growth*, 46-57.
- Burress, G. C., Musch, M. W., Jurivich, D. A., Welk, J. et Chang, E. B. (1997). Effects of mesalamine on the hsp72 stress response in rat IEC-18 intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 113(5), 1474-1479.
- Carter, M. J., Lobo, A. J. et Travis, S. P. (2004). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 53(suppl 5), v1-v16.
- Cerda, S. et Oh, S. (1990). Methods to quantitate human haptoglobin by complexation with hemoglobin. *Journal of immunological methods*, 134(1), 51-59.

- Chandrashekar, B. N., Swamy, B. E. K., Pandurangachar, M., Sathisha, T. V. et Sherigara, B. S. (2011). Electrochemical Investigation of 4-Aminophenol at CTAB Modified Carbon Paste Electrode: A Cyclic Voltammetric. *Anal. Bioanal. Electrochem.*, 3, 227-232.
- Churin, Y., Schilling, S. et Börner, T. (1999). A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS letters*, 459(1), 33-38.
- Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C. et Pasta, P. (1999). Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends in Biotechnology*, 17(4), 163-168.
- Cortot, A., Maetz, D., Degoutte, E., Delette, O., Meunier, P., Tan, G., Cazals, J.-B., Dewit, O., Hebuterne, X. et Beorchia, S. (2008). Mesalamine foam enema versus mesalamine liquid enema in active left-sided ulcerative colitis. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 103(12), 3106-3114.
- Dallegri, F., Ottonello, L., Ballestrero, A., Bogliolo, F., Ferrando, F. et Patrone, F. (1990). Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis. *Gut*, 31(2), 184-186.
- Daniel, K. G., Harbach, R. H., Guida, W. C. et Dou, Q. P. (2004). Copper storage diseases: Menkes, Wilson's, and cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 9(4), 2652-2662.
- Das, K., Eastwood, M., McManus, J. et Sircus, W. (1973). The metabolism of salicylazosulphapyridine in ulcerative colitis: I The relationship between metabolites and the response to treatment in inpatients. *Gut*, 14(8), 631-636.
- Dash, A. K. et Brittain, H. G. (1998). Mesalamine. Dans H. G. Brittain (Ed), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* (vol. 25, p. 209-242). Academic Press.
- Dou, N., Zhang, S. et Qu, J. (2019). Simultaneous detection of acetaminophen and 4-aminophenol with an electrochemical sensor based on silver-palladium bimetal nanoparticles and reduced graphene oxide. *RSC advances*, 9(54), 31440-31446.
- Eggert, C., LaFayette, P. R., Temp, U., Eriksson, K.-E. L. et Dean, J. F. (1998). Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1766-1772.
- Everse, J. (2004). Heme Proteins. Dans W. J. Lennarz et M. D. Lane (Ed), *Encyclopedia of Biological Chemistry* (p. 354-361). Elsevier.
- Farnet, A.-M., Tagger, S. et Le Petit, J. (1999). Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 322(6), 499-503.
- French, D. L., Himmelstein, K. J. et Mauger, J. W. (1995). Physicochemical aspects of controlled release of substituted benzoic and naphthoic acids from Carbopol® gels. *Journal of controlled release*, 37(3), 281-289.
- French, D. L. et Mauger, J. W. (1993). Evaluation of the physicochemical properties and dissolution characteristics of mesalamine: relevance to controlled intestinal drug delivery. *Pharmaceutical research*, 10, 1285-1290.
- Frolkis, A., Dieleman, L. A., Barkema, H. W., Panaccione, R., Ghosh, S., Fedorak, R. N., Madsen, K., Kaplan, G. G. et Consortium, A. I. (2013). Environment and the inflammatory bowel diseases. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 27(3), e18-e24.
- Ganini, D., Canistro, D., Jang, J., Stadler, K., Mason, R. P. et Kadiiska, M. B. (2012). Ceruloplasmin (ferroxidase) oxidizes hydroxylamine probes: deceptive implications for free radical detection. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(7), 1514-1521.
- Góralczyk-Bińkowska, A., Jasińska, A. et Długoński, J. (2019). Characteristics and use of multicopper oxidases enzymes. *Postępy Mikrobiologii-Advancements of Microbiology*, 58(1), 7-18.
- Haard, N. F. (1977). Physiological roles of peroxidase in postharvest fruits and vegetables. Dans *Enzymes in Food and Beverage Processing* (p. 143-171). ACS Publications.



- Hardison, R. C. (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), 5675-5679.
- He, F., Ru, X. et Wen, T. (2020). NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4777.
- Henriksen, A., Schuller, D. J., Meno, K., Welinder, K. G., Smith, A. T. et Gajhede, M. (1998). Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry*, 37(22), 8054-8060.
- Henry, R. J., Chiamori, N., Jacobs, S. et Segalove, M. (1960). Determination of ceruloplasmin oxidase in serum. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 104(4), 620-624.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. et Matsui, H. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468.
- Ispas-Szabo, P., Friciu, M. M., Nguyen, P., Dumoulin, Y. et Mateescu, M. A. (2016, 2016/07/02). Novel self-assembled mesalamine–sucralfate complexes: preparation, characterization, and formulation aspects. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(7), 1183-1193.
- Jaiswal, N., Pandey, V. P. et Dwivedi, U. N. (2014). Purification of a thermostable laccase from *Leucaena leucocephala* using a copper alginate entrapment approach and the application of the laccase in dye decolorization. *Process Biochemistry*, 49(7), 1196-1204.
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkotazka, A. et Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 966.
- Jeon, J. R., Baldrian, P., Murugesan, K. et Chang, Y. S. (2012). Laccase - catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microbial biotechnology*, 5(3), 318-332.
- Jurado, M., Martínèz, À., Martínez, M. et Saparrat, M. (2011). 6.45 Application of white-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes: role of laccase in the processes. *Comprehensive Biotechnology*, 6, 595-603.
- Kang, S., Kim, W., Jeong, S., Lee, Y., Nam, J., Lee, S. et Jung, Y. (2017, Jul). Oxidized 5-aminosalicylic acid activates Nrf2-HO-1 pathway by covalently binding to Keap1: Implication in anti-inflammatory actions of 5-aminosalicylic acid. *Free Radic Biol Med*, 108, 715-724.
- Kapralov, A., Vlasova, I. I., Feng, W., Maeda, A., Walson, K., Tyurin, V. A., Huang, Z., Aneja, R. K., Carcillo, J. et Bayır, H. (2009). Peroxidase Activity of Hemoglobin· Haptoglobin Complexes: covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30395-30407.
- Karantanos, T. et Gazouli, M. (2011, 03/03). Inflammatory bowel disease:Recent advances on genetics and innate immunity. *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 24, 164-172.
- Khan, A. A., Piris, J. et Truelove, S. (1977). An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *The Lancet*, 310(8044), 892-895.
- Klapper, M. H. et Hackett, D. P. (1965). Investigations on the multiple components of commercial horseradish peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 96(2), 272-282.
- Kumar, M., Garand, M. et Al Khodor, S. (2019). Integrating omics for a better understanding of Inflammatory Bowel Disease: a step towards personalized medicine. *Journal of translational medicine*, 17, 1-13.
- Lauritsen, K., Laursen, L. S., Bukhave, K. et Rask-Madsen, J. (1986). Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E2 and leukotriene B4 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 91(4), 837-844.

- Lehn, J.-M., Malmström, B. G., Selin, E. et Öblad, M. (1986). Metal analysis of the laccase of Gabriel Bertrand (1897). *Trends in Biochemical Sciences*, 11(5), 228-230.
- Ligumsky, M., Karmeli, F., Sharon, P., Zor, U., Cohen, F. et Rachmilewitz, D. (1981). Enhanced thromboxane A2 and prostacyclin production by cultured rectal mucosa in ulcerative colitis and its inhibition by steroids and sulfasalazine. *Gastroenterology*, 81(3), 444-449.
- Liu, Z., Wang, M., Zhang, C., Zhou, S. et Ji, G. (2022). Molecular functions of ceruloplasmin in metabolic disease pathology. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 695-711.
- MacFie, T. S., Poulson, R., Parker, A., Warnes, G., Boitsova, T., Nijhuis, A., Suraweera, N., Poehlmann, A., Szary, J. et Feakins, R. (2014). DUOX2 and DUOX2 form the predominant enzyme system capable of producing the reactive oxygen species H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in active ulcerative colitis and are modulated by 5-aminosalicylic acid. *Inflammatory bowel diseases*, 20(3), 514-524.
- Madhu, R., Palanisamy, S., Chen, S.-M. et Piraman, S. (2014). A low temperature synthesis of activated carbon from the bio waste for simultaneous electrochemical determination of hydroquinone and catechol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 727, 84-90.
- Mai, N. L., Ambauen, N., Halle, C., Meyn, T. et Trinh, T. T. (2021). Initial degradation mechanism of salicylic acid via electrochemical process. *Chemical Physics*, 543, 111071.
- Mateescu, M., Schell, H. D. ; Budu, C.E. Spectrophotometric method for rapid determination of peroxidase activity: Possibilities of simultaneous determination of p-diphenoloxidase (laccase). *Rev. Roum. Biochim.* 1979, 16, 115–120.
- Mayer, A. M. et Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6), 551-565.
- Mazaleuskaya, L. L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., FitzGerald, G. A., Altman, R. B. et Klein, T. E. (2015). PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenetics and genomics*, 25(8), 416.
- Mecke, B. et Noack, K. (1958). Untersuchungen über die Beeinflussung der Frequenz und Intensität der  $\nu$  CO- und  $\nu$  CC-Banden im IR-Spektrum ungesättigter Ketone durch Konjugation und sterische Hinderung. *Spectrochimica Acta*, 12(4), 391-393.
- Meczker, Á., Mikó, A. et Hegyi, P. (2018). 5-ASA induces mild acute pancreatitis. Case report and review of the literature. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 27(2), 189-194.
- Messerschmidt, A. et Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin Modelling and structural relationships. *European journal of biochemistry*, 187(2), 341-352.
- Murakami, K. et Yoshino, M. (2022). Prooxidant activity of aminophenol compounds: copper-dependent generation of reactive oxygen species. *BioMetals*, 35(2), 329-334.
- Musci, G., Polticelli, F. et di Patti, M. C. B. (2014). Ceruloplasmin-ferroportin system of iron traffic in vertebrates. *World journal of biological chemistry*, 5(2), 204.
- Nakayama, T. et Honda, R. (2021). Electrochemical and mechanistic study of superoxide elimination by mesalazine through proton-coupled electron transfer. *Pharmaceuticals*, 14(2), 120.
- Nikias, G., Eisner, T., Katz, S., Levin, L., Eskries, D., Urmacher, C. et McKinley, M. (1995). Crohn's disease and colorectal carcinoma: rectal cancer complicating longstanding active perianal disease. *American Journal of Gastroenterology* 90(2), 216-219.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V. et Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115-1126.
- Oostlander, A. E., Everts, V., Schoenmaker, T., Bravenboer, N., van Vliet, S. J., van Bodegraven, A. A., Lips, P. et de Vries, T. J. (2012). T cell - mediated increased osteoclast formation from peripheral blood as a mechanism for crohn's disease - associated bone loss. *Journal of cellular biochemistry*, 113(1), 260-268.
- Papich, M. G. (2016). Saunders handbook of veterinary drugs. Dans. Am Vet Med Assoc.

- Paradis, M., Gagné, J., Mateescu, M.-A. et 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(12), 2019-2027.
- Peisach, J. et Levine, W. G. (1965). A comparison of the enzymic activities of pig ceruloplasmin and *Rhus vernicifera* laccase. *Journal of Biological Chemistry*, 240(6), 2284-2289.
- Peppercorn, M. A. et Goldman, P. (1972). The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulphapyridine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 181(3), 555-562.
- Prakash, A. et Markham, A. (1999a). Long-acting isosorbide mononitrate. *Drugs*, 57(1), 93-99.
- Prakash, A. et Markham, A. (1999b). Oral delayed-release mesalazine: a review of its use in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Drugs*, 57(3), 383-408.
- Qayoom, S., Sultan, J., Khan, A., Manzoor, S. et Khan, K. (2015). Serum copper and ceruloplasmin levels in systemic sclerosis and various types of morphea in the Kashmir Valley. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, 25(1), 9-11.
- Qureshi, A. I. et Cohen, R. D. (2005). Mesalamine delivery systems: do they really make much difference? *Advanced drug delivery reviews*, 57(2), 281-302.
- Rich, S. et Horsfall, J. G. (1954). Relation of polyphenol oxidases to fungitoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40(3), 139-145.
- Rijk, M., Schaik, A. V. et Tongeren, J. V. (1988). Disposition of 5-aminosalicylic acid by 5-aminosalicylic acid-delivering compounds. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 23(1), 107-112.
- Riley, S., Mani, V., Goodman, M., Herd, M., Dutt, S. et Turnberg, L. (1988a). Comparison of delayed-release 5-aminosalicylic acid (mesalazine) and sulfasalazine as maintenance treatment for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 94(6), 1383-1389.
- Riley, S., Mani, V., Goodman, M., Herd, M., Dutt, S. et Turnberg, L. (1988b). Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut*, 29(5), 669-674.
- Ross, D., Prenant, M. et Bessis, M. (1978). On the proper use of the Soret band for hemoglobin detection in erythrocytic cells. *Blood Cells*, 4(1-2), 361-367.
- Rousseaux, C., Lefebvre, B., Dubuquoy, L., Lefebvre, P., Romano, O., Auwerx, J., Metzger, D., Wahli, W., Desvergne, B. et Naccari, G. C. (2005). Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *The Journal of experimental medicine*, 201(8), 1205-1215.
- Saleh Ahammad, A. (2013). Hydrogen peroxide biosensors based on horseradish peroxidase and hemoglobin. *Biosensors & Bioelectronics*, 5(2), 9.
- Scheinberg, I. H. et Gitlin, D. (1952). Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science*, 116(3018), 484-485.
- Schirbel, A. et Fiocchi, C. (2010). Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *Journal of digestive diseases*, 11(5), 266-276.
- Singh Bansi, D. et Louis-Auguste, J. (2012). Chapter 33 - Intestines. Dans P. N. Bennett, M. J. Brown et P. Sharma (Ed), *Clinical Pharmacology (Eleventh Edition)* (p. 536-545). Churchill Livingstone.
- Suderman, R. J., Dittmer, N. T., Kanost, M. R. et Kramer, K. J. (2006). Model reactions for insect cuticle sclerotization: cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(4), 353-365.
- Sun, X., Bai, R., Zhang, Y., Wang, Q., Fan, X., Yuan, J., Cui, L. et Wang, P. (2013). Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 1673-1680.
- Supalkova, V., Petrek, J., Havel, L., Krizkova, S., Petrlova, J., Adam, V., Potesil, D., Babula, P., Beklova, M. et Horna, A. (2006). Electrochemical sensors for detection of acetylsalicylic acid. *Sensors*, 6(11), 1483-1497.
- Theorell, H. (1942). Crystalline peroxidase. *Enzymologia*, 10, 250-252.

- Theorell, H. et Akeson, A. (1943). *Ark. Kemi Min. Geol. A*, 16.
- Thomsen, O. Ø., Cortot, A., Jewell, D., Wright, J. P., Winter, T., Veloso, F. T., Vatn, M., Persson, T. et Pettersson, E. (1998). A comparison of budesonide and mesalamine for active Crohn's disease. *New England Journal of Medicine*, 339(6), 370-374.
- Trivedi, A., Singh, N., Bhat, S. A., Gupta, P. et Kumar, A. (2012). Chapter 4 - Redox Biology of Tuberculosis Pathogenesis. Dans R. K. Poole (Ed), *Advances in Microbial Physiology* (vol. 60, p. 263-324). Academic Press.
- Tuomela, M. et Hatakka, A. (2011). Oxidative fungal enzymes for bioremediation. Dans *Comprehensive biotechnology: environmental biotechnology and safety* (p. 183-196). Elsevier Scientific Publ. Co.
- Umesh, N. M., Amalraj, A. J. J. et Wang, S.-F. (2021). Trace level electrochemical detection of mesalazine in human urine sample using poly (N-Vinyl)-2-Pyrrolidone capped Bi-EDTA complex sheets incorporated with ultrasonically exfoliated graphene oxide. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 122, 67-77.
- Vinoth Kumar, J., Kokulnathan, T., Chen, S.-M., Chen, T.-W., Elgorban, A. M., Elshikh, M. S., Marraiki, N. et Nagarajan, E. R. (2019, 2019/11/18). Two-Dimensional Copper Tungstate Nanosheets: Application toward the Electrochemical Detection of Mesalazine. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(22), 18279-18287.
- Vlasova, I. I. (2018). Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control. *Molecules*, 23(10), 2561.
- Waggoner, D. J., Bartnikas, T. B. et Gitlin, J. D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiology of disease*, 6(4), 221-230.
- Wang, X., Dumoulin, M., Befani, O., Mondovi, B. et Mateescu, M. (1994). Joint chromatographic purification of bovine serum ceruloplasmin and amineoxidase. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 24(3-4), 237-250.
- Widmer, C. C., Pereira, C. P., Gehrig, P., Vallelian, F., Schoedon, G., Buehler, P. W. et Schaer, D. J. (2010). Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxidants & redox signaling*, 12(2), 185-198.
- Yoshida, H. (1883). LXIII.—chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 43, 472-486.