

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

STABILISATION DES ACTIVITÉS CATALYTIQUES DES  
OXYDASES ÉVALUÉES PAR ZYMOGRAPHIE : LE CAS DE LA DIAMINE  
OXYDASE

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR  
DJATOUGBÉVI MIREILLE KOUDOUFIO

MARS 2019

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.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Ce mémoire est la finalité d'une maîtrise qui fut une expérience rendue formidable par mon directeur, mon superviseurs, tous mes collègues, mes amis et ma famille que je tiens à remercier.

En tout premier lieu, je souhaite remercier mon directeur de recherche, Professeur Mircea Alexandru Mateescu de m'avoir acceptée dans son laboratoire de recherche. Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans son soutien scientifique et la confiance sans faille qu'il a eu en moi durant toute ma période d'étudiante-rechercheure en maîtrise. Ce fut un grand honneur pour moi d'avoir fait ma maîtrise sous sa direction.

Je suis également reconnaissante envers Dr. Tien Canh Le, mon superviseur à qui je souhaite exprimer ma sincère gratitude pour son professionnalisme, sa gentillesse, son soutien, ses conseils et encouragements qui m'ont permis d'avancer à grands pas dans mon travail durant la maîtrise. Ce fut un très grand plaisir pour moi de travailler avec lui.

J'en profite pour remercier Dr. Pompilia Ispas-Szabo pour ses conseils et sa gentillesse.

Je souhaite remercier aussi le groupe du professeur Lucia Marcocci de l'Université de Rome pour la préparation de l'enzyme et les conseils avisés.

Un chaleureux remerciement à la Fondation Courtois pour l'appui financier au projet « Histaminase » qui a permis l'octroi de bourses durant ma scolarité.

Mes remerciements vont également au personnel administratif (Sonia, Pascale) et soutien technique du département de Chimie.

Enfin je voudrais remercier mes collègues Victorien et Armelle avec qui j'ai passé pratiquement toute ma première session de maîtrise. Ils m'ont permis de m'intégrer facilement à mon arrivée au laboratoire et m'ont beaucoup aidée et motivée avec leurs conseils. Un gros merci également à Khalil, Mariela, Ladan, Marc-André, Maziar, Elena. Je ne peux oublier Nassim et Mirna, mes collègues de bureau, je vous remercie pour nos blagues qui ont occasionnés plusieurs fois de fous rires et franches rigolades au bureau.

Mes derniers remerciements et non des moindres vont aux personnes les plus chères à mon cœur : ma famille ici à Montréal et à Lomé, mes parents. Je leur suis extrêmement reconnaissante pour leurs soutiens indéfectibles, conseils, encouragements et tout ce qu'ils m'apportent pour mon bien-être dans la vie de tous les jours. Rien de tout cela n'aurait été possible sans leur aide et bénédictions.

## DÉDICACE

À mes grand-parents, Mina et Elisabeth,  
Pour elles, sans elles...

## TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xiii
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES ENZYMES DE TYPE OXYDASE.....	1
1.1    Classification des oxydases .....	3
1.2    Les rôles et les domaines d'applications des oxydases .....	4
1.3    Oxydases à FAD et leurs rôles .....	5
1.4    Oxydases à cuivre et leurs rôles métaboliques.....	7
1.5    Quelques oxydases avec des applications biomédicales et analytiques.....	10
1.5.1 Diamine oxydase, enzyme avec des propriétés biomédicales et analytiques.....	10
1.5.2 Applications analytiques de la glucose oxydase.....	18
CHAPITRE II : LES SURFACTANTS COMME MODULATEURS ENZYMATIQUES.....	22
2.1    Généralités sur les surfactants .....	22
2.2    Interaction protéines-surfactants.....	28
CHAPITRE III : LES VITAMINES ET LEURS RÔLES BIOPROTECTEURS .....	30
3.1    Fonction des vitamines .....	31
3.1.1    Vitamines comme effecteurs enzymatiques.....	32
3.1.2    Vitamines comme antioxydants.....	32
CHAPITRE IV : PRÉSENTATION DU PROJET .....	36

CHAPITRE V: STABILISATION DES ACTIVITÉS CATALYTIQUES DES OXYDASES EVALUÉES PAR LA ZYMOGRAPHIE. LE CAS DE LA DIAMINE OXYDASE.....	43
CHAPITRE VI: DISCUSSION ET CONCLUSION.....	74
ANNEXE A CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE : MINI REVIEW.....	80
ANNEXE B CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE : POSTER N°65 .....	88
ANNEXE C CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE : POSTER N°85 .....	90
BIBLIOGRAPHIE .....	92

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Schéma général représentant le processus d'isolement et de purification d'une enzyme.....	2
1.2 Réactions d'oxydation catalysées par les oxydases.....	3
1.3 Quelques techniques de stabilisation des enzymes.....	5
1.4 Représentation schématique du métabolisme de l'histamine.....	12
1.5 Représentation schématique des origines de l'histamine avec son potentiel implication dans des réactions pseudo allergiques.....	14
1.6 Schéma représentatif de la bio-élimination par désamination oxydative de l'histamine par la formulation bi-enzymatique composée de diamine oxydase et catalase.....	15
1.7 Stabilité des formulations d'enzymes dans les tablettes monolithiques de Carboxyméthyl amidon:chitosane en fonction du pH.....	16
1.8 Réaction d'oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase.....	19
1.9 Première génération de biosenseurs enzymatiques pour le glucose.....	20
1.10 Deuxième génération de biosenseurs enzymatiques pour le glucose.....	21
1.11 Troisième génération de biosenseurs enzymatiques pour le glucose.....	21
2.1 Différents types de structures pouvant être formées par différents surfactants.....	22
2.2 Structure du SDS.....	23
2.3 Structure du Tween 80.....	24
2.4 Structure de la Lécithine.....	25
4.1 Modification du microenvironnement, isolement et stabilisation de la structure tridimensionnelle d'une enzyme par les surfactants.....	38
4.2 Principe de la zymographie modifiée.....	40
4.3 Procédure de zymographie adaptée de Ahmadifar <i>et al.</i> .....	41
4.4 Présentation schématique des différents volets du projet de Maîtrise.....	42

5.1 Effects of surfactants on diamine oxidase activity evidenced by zymography.....	57
5.2 Effect of bile salts on diamine oxidase activity evidenced by zymography.....	59
5.3 Protective effect of surfactants on diamine oxidase activity against hydrogen peroxide.....	61
5.4 Effects of surfactants on glucose oxidase activity evidenced by zymography.....	62
5.5 Protective effect of surfactants on DAO in SIF with pancreatin.....	64
5.6 The effect of PLP antioxidant on DAO activity.....	65
5.7 The effect of Trolox antioxidant on DAO activity.....	66
5.8 Effect of sodium ascorbate on DAO activity.....	67
5.9 Effect of various agents with antioxidant properties at their optimal concentration on DAO activity.....	68
S.5.1 Protective effect of surfactants on DAO in SGF with pepsin.....	71
S.5.2 Effect of various antioxidant at their optimal concentration on glucose oxidase activity.....	71
S.5.3. Effect of antioxidants at their optimal concentrations combined with surfactants on DAO activity.....	72

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 Vitamines et leurs formes actives.....	33
5.1 Composition and characteristics of buffers (mM) used in this study.....	50
5.2 Intrinsic Specific activity of DAO untreated or treated with surfactants.....	58
S.5.1 Antioxidant capacity of each antioxidant evaluated by TEAC assay.....	73

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ISA	Activité Spécifique Intrinsèque ( <i>Intrinsic Specific Activity</i> )
ATP	Adénosine Triphosphate
AO	Amine Oxydase
Asc	Ascorbate de Sodium
BS	Sels biliaires
CMA	Carboxyméthyl amidon
CMC	Concentration micellaire Critique
CP	Céroloplasmine
CuAO	Amine oxydase à cuivre
DAO	Diamine oxydase
EC	Commission des enzymes
ECAO	Amine oxydase provenant d' <i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAD – AO	Amine Oxydase à Flavine Adénine Dinucléotide
GABA	Acide Gamma-aminobutyrique
GDH	L-glutamate déshydrogénase

HDC	Histidine Décarboxylase
HC	Hémocyanine
HLB	Balance Hydrophile-Lipophile
HNMT	Histamine N-méthyltransférase
HO·	Radical hydroxyle
HPAO	Amine oxydase d' <i>Hansenula polymorpha</i>
HRP	Horseradish peroxidase
SGF	Fluide Gastrique Simulé
SIF	Fluide Intestinal Simulé
GOx	Glucose oxydase
KGA	Acide -céto glutarique
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
Lec	Lécithine
MAO	Monoamine oxydase
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NEAs	Antioxydants Non Enzymatiques
<i>o</i> -PDA	Ortho-phénylénediamine
PAA	Polyacrylamide

PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PO	Phénoloxydase
PSAO	Amine oxydase à cuivre provenant du <i>Pisum sativum</i>
SSAO	Amine oxydase sensible à la sémi-carbazide
TPQ	Topaquinone
PLP	Pyridoxal phosphate
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Tro	Trolox
Tw	Tween 80 (Polysorbate 80)

## RÉSUMÉ

Les oxydases, catalysant les réactions d'oxydo-réduction utilisent l'oxygène comme accepteur d'hydrogène et d'électrons. Elles sont impliquées dans divers processus métaboliques et biologiques tels que la respiration cellulaire, la lutte anti-infectieuse. Ces enzymes sont également utilisées pour diverses applications notamment dans les domaines agro-alimentaire, analytique, pharmaceutique et biomédical. L'une des principales limites à l'utilisation des enzymes est leur manque de stabilité et perte d'activité durant les processus de purification et/ou de stockage. La diamine oxydase (DAO) est une oxydase à cuivre catalysant la désamination des amines biogènes comme la putrescine, la cadavérine et autres. Elle catalyse aussi la désamination oxydative de l'histamine en imidazole acétaldéhyde et peroxyde d'hydrogène. Elle fut récemment proposée comme agent thérapeutique visant à traiter les histaminoses alimentaires et dysfonctions entériques liées à l'histamine ou à améliorer les traitements existants. Des formes pharmaceutiques adéquates avec des excipients ont été formulées visant une délivrance intestinale de l'enzyme thérapeutique. Le peroxyde d'hydrogène généré comme produit secondaire de la désamination de l'histamine pourrait endommager les cellules ou tissus et aussi réduire l'activité de l'enzyme. D'où la nécessité d'élaborer des systèmes pouvant protéger l'enzyme et l'organisme et si possible appliquer les mêmes systèmes sur la glucose oxydase en vue d'une éventuelle stabilisation. La glucose oxydase est une enzyme à FAD qui catalyse l'oxydation du glucose en gluconolactone et peroxyde d'hydrogène. C'est une enzyme largement utilisée dans le domaine industriel, notamment dans le développement de biosenseurs et glycomètres nécessitant des préparations enzymatiques très actives et hautement stables. Dans ce projet de maîtrise, la stabilisation et la modulation des activités catalytiques de deux enzymes (diamine oxydase, glucose oxydase) ont été investiguées en utilisant comme stratégies i) la protection physique des enzymes en présence d'agents émulsifiants : anionique (Sodium Dodecyl Sulfate), ampholytique (Lécithine), neutre (Tween 80) et des sels biliaires pouvant interagir avec les enzymes, stabiliser leur structure tridimensionnelle et les protéger contre le peroxyde d'hydrogène et ii) élimination directe du peroxyde d'hydrogène ou autres espèces pro-oxydantes, protégeant ainsi les enzymes contre l'oxydation ou l'agrégation, en utilisant des antioxydants non-enzymatiques tels que le pyridoxal phosphate (vit. B6), le Trolox, l'ascorbate de sodium. Les activités des enzymes ont été principalement évaluées par l'approche zymographique. Les résultats ont montré que les enzymes sont plus stables en présence des différents agents émulsifiants et antioxydants utilisés et que leur activité catalytique est augmentée.

Mots clés : *Diamine oxydase, glucose oxydase, polyacrylamide, pyridoxal phosphate, sels biliaires, stabilisation des enzymes, surfactants, Trolox, vitamines aux propriétés antioxydantes, vitamine C, zymographie.*

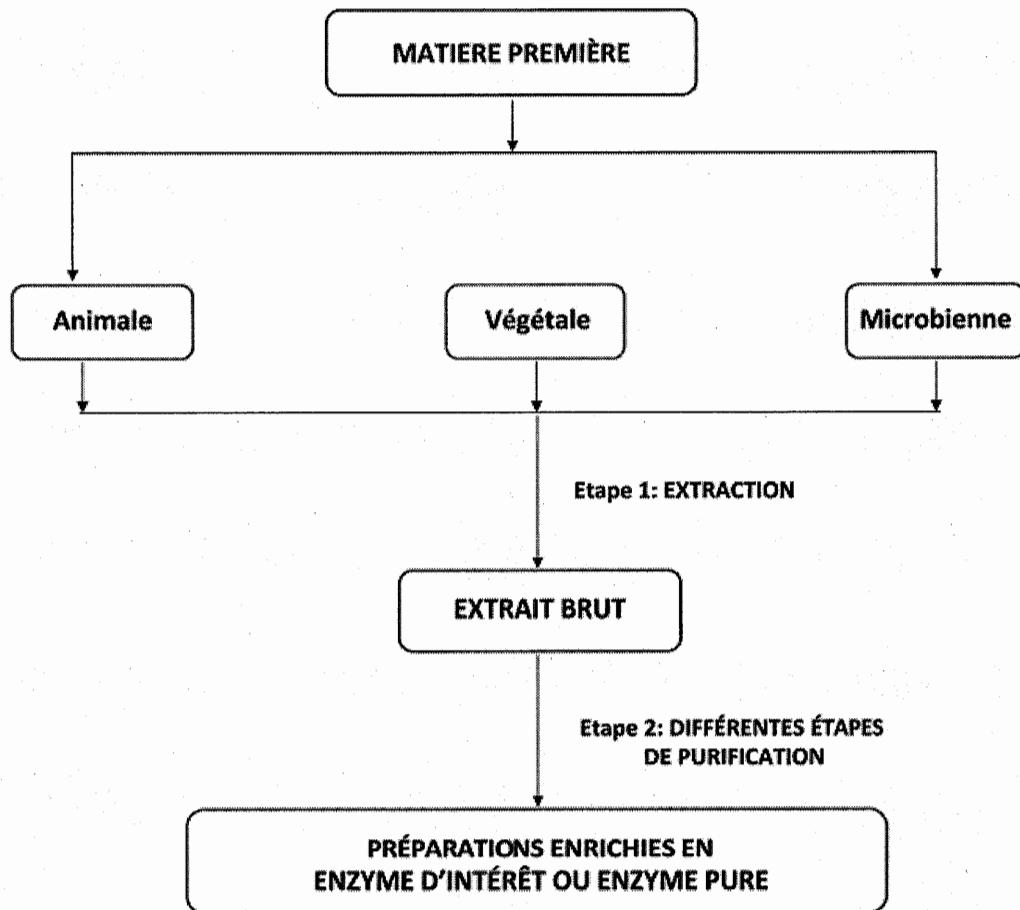
## CHAPITRE I

### GÉNÉRALITÉS SUR LES ENZYMES DE TYPE OXYDASE

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de réactions. Elles interviennent dans la régulation de divers processus biologiques et réactions métabolique telles que la digestion, la respiration, la différenciation cellulaire, etc. En général, elles sont thermolabiles, agissent à de faibles concentrations et sont regénérées à la fin des réactions devenant disponibles pour d'autres réactions de même type (Voet et Voet, 2004; Voet et Voet, 2011). Les enzymes possèdent une poche particulière constituant un site pouvant fixer le substrat et un site catalytique actif de l'enzyme. Les vitesses des réactions se mesurent par la quantité de substrat disparaissant en fonction du temps ou la quantité de produit formé en fonction du temps. Plusieurs facteurs de l'environnement tels que le pH ou la température peuvent affecter l'activité des enzymes. Les enzymes ont également une certaine spécificité et affinité pour leurs substrats. Ainsi, la spécificité peut être absolue (un seul substrat transformé), haute (un nombre réduit de substrats convertis) ou relative (un groupe de substrats modifiés).

Les sources les plus importantes des enzymes sont des tissus végétaux, organes animaux ou des microorganismes. Pour des applications thérapeutique, les enzymes d'origine animale ne sont plus utilisées de nos jours à cause des limitations d'ordre réglementaires. Des enzymes d'origine végétale et animale disponibles sur le marché sont majoritairement des protéases et sont d'importance commerciale pour différente applications. Les enzymes de source microbienne sont les plus disponibles et sont plus utilisées par rapport à celles d'autres origines (Illanes, 2008). Les enzymes sont

obtenues à partir d'une source d'intérêt par le processus d'extraction et purification (Fig 1.1; Laurent, 1982).



**Figure 1.1:** Schéma général représentant le processus de séparation et de purification d'une enzyme (adaptée d'après Laurent, 1982).

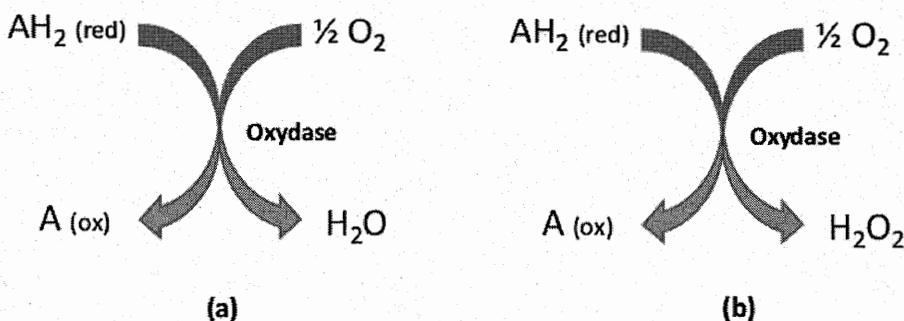
La nomenclature et la classification des enzymes selon l'Union Internationale de Biochimie (1961) gérées par la commission des enzymes (Webb et Edwin, 1992; Berg *et al.*, 2007) représentent un processus dynamique pouvant, avec le temps, subir des modifications selon les avancées dans le domaine de l'enzymologie.

Le premier nombre indique le type de réaction catalysée par l'enzyme et peut varier de 1 à 6 (EC 1.\_.\_.\_ - EC 6.\_.\_.\_). EC 1 correspond à la classe des oxydoréductases qui catalysent les réactions d'oxydo-réduction soit de transfert d'électrons, d'atomes d'hydrogène ou fixation d'oxygène.)

Le second nombre (exemple : EC 1.\_.\_.\_) indique la sous-classe de l'enzyme définie au travers de son mécanisme d'action. Dans le cas des oxydoréductases, on a par exemple les oxydases, les réductases, les peroxydases, les dioxygénases, les déshydrogénases, monooxygénases, hydrogénases.

### 1.1 Classification des oxydases

Les oxydases sont des enzymes qui catalysent les réactions d'oxydation (fixation de l'oxygène sur certaines substances organiques). Elles sont impliquées dans diverses réactions biologiques et physiologiques et sont également utilisées dans le domaine industriel. L'oxygène joue le rôle d'accepteur d'hydrogène (provenant du substrat), permettant la formation du produit oxydé et de l'eau (Fig. 1.2; exemple: céroloplasmine, EC1.16.3.1; l'ascorbate oxydase, EC 1.10.3.3) ou du peroxyde d'hydrogène (Fig. 1.2; exemple: le glucose oxydase, EC 1.1.3.4) selon la nature de la réaction.

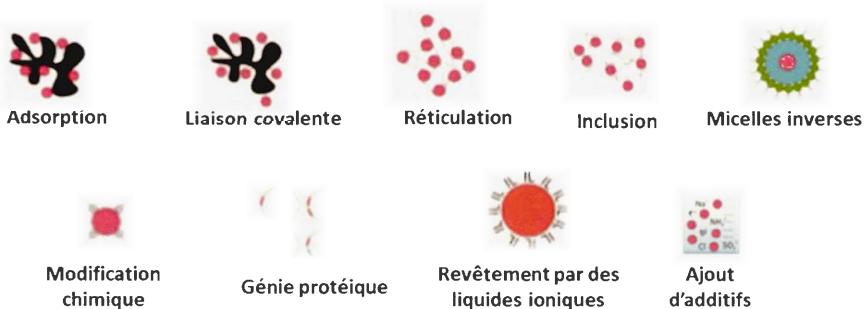


**Figure 1.2:** Réactions d'oxydation catalysées par les oxydases sans (a) ou avec (b) libération du peroxyde d'hydrogène.

## 1.2 Les rôles et les domaines d'application des oxydases

Les oxydases interviennent dans des fonctions métaboliques importantes dans toutes les cellules vivantes telles que la respiration (mécanismes permettant les échanges de l'oxygène et du dioxyde de carbone entre les organismes vivants et leurs milieux de vie), la différenciation cellulaire, la signalisation cellulaire, la lutte anti-infectieuse. Des oxydases sont également utilisées pour diverses applications dans les domaines industriel, analytique, pharmaceutique, médical (Mano, 2012, Dijkman *et al.*, 2013). Des oxydases sont utilisées pour des applications industrielles notamment dans l'industrie agro-alimentaire pour la conservation, la synthèse de métabolites et de produits. Ces enzymes sont utilisées pour des applications médicales, pharmaceutiques et analytiques, notamment le développement de biosenseurs (Cash et Clarck, 2010; Dijkman *et al.*, 2013), la synthèse de précurseurs pharmaceutiques, d'antibiotiques et de monoamine oxydase par des amino-acide oxydases (Pollegioni *et al.*, 2008). Elles sont aussi utilisées dans la chimie fine (Turner, 2001).

Comme pour la plupart des enzymes, l'utilisation des oxydases pour diverses applications est généralement limitée par leur instabilité et la perte de leur activité durant les processus d'extraction, de purification, de lyophilisation ou de stockage (Randolph et Jones, 2002). Les enzymes peuvent être facilement dénaturées par des variations de paramètres tels que la température, le pH, l'humidité, ou encore par des contaminations microbiennes durant le stockage. À cet effet, plusieurs techniques sont utilisées afin de stabiliser les enzymes, d'améliorer et de conserver leur activité sur une plus longue période d'utilisation (Stepankova *et al.*, 2013). Les procédures de stabilisation impliquent des modifications chimiques (complexation avec des polymères), techniques d'immobilisation et cristallisation, ajout d'additifs de stabilisation (addition des sels, polyols, osmolytes organiques, polyelectrolytes, etc.) et les techniques de micro encapsulation dans des micelles ou des micelles inverses formées par des surfactants (Fig.1.3).



**Figure 1.3 :** Quelques techniques de stabilisation des enzymes (d'après Stepankova *et al.*, 2013)

### 1.3 Oxydases à FAD et leurs rôles

Les oxydases à FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) appartiennent à la famille des flavoprotéines avec le FAD comme cofacteur lié de façon covalente. Le FAD est un cofacteur redox (groupement prosthétique) impliqué dans diverses réactions. Dans les systèmes biologiques, le FAD agit comme accepteur de  $H^+$  dans sa forme oxydée mais sous forme réduite, le (FADH<sub>2</sub>) sert de donneur d'électrons. Les oxydases à FAD ont un fort pouvoir redox et interviennent dans diverses réactions dont l'oxydation des aldéhydes par l'aldéhyde oxydase et les amino acide oxydases.

Les monoamines oxydases à FAD (EC 1.4.3.4) (MAOs) sont une famille d'enzymes catalysant la désamination oxydative des monoamines. Elles sont présentes au niveau sub-cellulaire, sur la membrane mitochondriale externe. Selon les spécificités de substrat, il existe deux isoenzymes de MAO-FAD : la MAO-A ayant une préférence pour la sérotonine et la MAO-B qui métabolise la  $\beta$ -phényléthylamine. Les deux types d'enzymes métabolisent l'adrénaline, la noradrénaline et la tyramine (Glover *et al.*, 1977).

Chez l'humain, les deux isoenzymes de la MAO sont localisées dans le système nerveux central, le foie, les poumons, le tractus gastro-intestinal, les plaquettes sanguines, le placenta (Billett, 2004).

Les monoamines oxydases à FAD sont constituées de deux sous unités liées par un pont disulfure, contenant chacune un groupement FAD lié de façon covalente, de type groupement prosthétique (De Colibus, 2005). La désamination de monoamines catalysée par les MAOs à FAD inclue aussi la dopamine, la sérotonine, la tryptamine. Elles jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des monoamines et des catécholamines en régulant leur concentration, surtout au niveau des vésicules synaptiques (système nerveux). Elles sont également impliquées dans la détoxification, notamment par le métabolisme des monoamines alimentaires comme la dopamine (fèves, légumineuses), la sérotonine (fruits, légumes), la tyramine (fromages, vins, sauce soja) (Ilett *et al.*, 1980). Au niveau du système nerveux central, les MAOs à FAD participent à la détoxification de certains xénobiotiques et aussi au turnover (inactivation) des catécholamines et de la sérotonine. Ainsi, la MAO-B métabolise le 1-méthyl-4phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine ou MPTP, un puissant neurotoxique provenant de molécules thérapeutiques synthétiques (mépéridine) en MPP<sup>+</sup> (1-Methyl-4-phenylpyridinium), un métabolite capté spécifiquement par les neurones dopaminergiques, provoquant des symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson (Berry *et al.*, 1994). Certaines maladies dues à la dégénérescence progressive des cellules nerveuses provoquant une déficience dans la synthèse de monoamines (maladie de Parkinson et d'Alzheimer) sont soignées par des inhibiteurs de monoamines oxydases (IMAOs). La maladie d'Alzheimer pourrait être associée à une augmentation de l'activité MAO-B (Saura *et al.*, 1994). Ces enzymes sont impliquées dans le développement et la maturation de certaines zones du cerveau (Nicotra *et al.*, 2004) et également dans les processus de vieillissement cérébral (Benedetti et Dostert 1989; Cadena et Davies 2000). Plusieurs études ont montré une

augmentation de leur expression dans certaines régions du cerveau avec l'âge (Fowler *et al.*, 1997; Mahy *et al.*, 2000; Nicotra *et al.*, 2004).

La glucose oxydase est également une oxydase à FAD catalysant l'oxydation du glucose avec production du peroxyde d'hydrogène. Elle joue des rôles très importants dans l'organisme et est aussi utilisée dans le domaine de la biotechnologie (biosenseurs pour déterminer le taux de glucose dans des échantillons biologiques).

#### 1.4 Oxydases à cuivre et leurs rôles métaboliques

Environ un tiers des enzymes sont des métalloenzymes; elles possèdent un ou plusieurs ions métalliques au sein de leur structure. Ceci est nécessaire pour leur activité catalytique mais aussi pour le maintien de leur structure tridimensionnelle. Les oxydases contenant le cuivre catalysent plusieurs réactions d'oxydation utilisant diverses molécules comme substrats (allant de petites molécules aux macromolécules telles que les peptides). Certaines oxydases contiennent des sites mononucléaires de cuivre (type 2) et d'autres ont des sites dinucléaires de cuivre (type 3). Il y'a également des oxydases à cuivre trinucléaires considérées comme hybrides des oxydases à cuivre de type 2 et 3. Les ions de cuivre (II) sont en effet importants pour le bon fonctionnement de certaines enzymes ayant un rôle dans la protection contre diverses substances toxiques appelées radicaux libres. Ils entrent aussi dans la composition de plusieurs enzymes et sont nécessaires pour l'utilisation normale du fer (Roeser *et al.*, 1970). Une déficience en cuivre (moins de 2 mg/jour) réduit la capacité des réticulocytes à obtenir le fer de la transferrine et à synthétiser l'hème à partir du fer (III) (Williams *et al.*, 1976), ce qui provoque une anémie.

Comme exemples d'oxydases à cuivre dans le règne animal: la dopamine  $\beta$ -hydroxylase catalysant la production de catécholamine dans le cerveau, la lysyl oxydase nécessaire à l'entretien du tissu conjonctif dans les poumons, les os et de

l'élastine de l'appareil cardiovasculaire, la cytochrome c oxydase qui intervient dans le métabolisme oxydatif, la respiration cellulaire, le fonctionnement du cerveau et dans la synthèse de l'hème et des phospholipides.

#### Autres systèmes enzymatiques contenant du cuivre:

La ceruloplasmine (CP, EC 1.16.3.1) - une oxydase à cuivre, est une glycoprotéine du groupe de  $\alpha$ -2 globulines avec une masse moléculaire d'environ 132 kDa (Qian et Ke, 2001). La CP constitue également un marqueur moléculaire important de divers types de tumeurs (Senra Varela *et al.*, 1997) et un biomarqueur de crise cardiaque.

L'hémocyanine (HC) est une protéine appartenant à la famille des métalloprotéines à cuivre (Makino, 1985), impliquée dans le transport de l'oxygène dans les tissus de certains invertébrés incluant les mollusques et les arthropodes (Van Holde et Miller, 1995). L'HC est la principale protéine retrouvée dans l'hémolymphe (Markl, 1986 ; Sanchez *et al.*, 1998). Elle peut atteindre jusqu'à 90% de la teneur en protéines totales (Salvato et Beltramini, 1990). L'HC se distingue des autres métalloprotéines connues par la présence de 2 atomes de cuivre liés par coordination à une chaîne polypeptidique (Beltramini *et al.*, 2005). La couleur bleue de l'hémocyanine est due aux atomes de cuivre liés aux résidus histidine et qui sont responsables de la liaison réversible et le transport de l'oxygène moléculaire.

Dans le règne végétal, la laccase utilise l'oxygène pour oxyder de nombreux composés phénoliques par le biais d'un mécanisme radicalaire; l'ascorbate oxydase catalyse l'oxydation du L-ascorbat en déshydroascorbat.

On peut aussi citer en exemple l'azurine qui est un transporteur d'électrons du complexe cytochrome b vers les cytochromes oxydases ou réductases terminales; la superoxyde-dismutase, catalysant la réduction des radicaux superoxydes (Davis *et al.*, 1987).

Les amine oxydases à cuivre (CuAO, EC 1.4.3.6) sont des oxydoréductases constituées de deux sous-unités identiques (dimères) avec une masse moléculaire de 70-95 kDa par sous-unité (Cogoni *et al.*, 1990; Vianello *et al.*, 1993; McGuirl *et al.*, 1994; Kivirand et Rinken, 2007). Chaque sous-unité contient un cofacteur, le 2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (TPQ) provenant de la modification d'un résidu de tyrosine endogène (Klinman et Mu, 1994) lié par une liaison covalente. Trois types d'amine oxydase ont été classifiées comme EC 1.4.3.21 (Buffoni, 2009) chez les mammifères :

- i) Les monoamine oxydases : oxydent préférentiellement les monoamines primaires et n'ont pas d'activité pour les diamines. Elles possèdent un segment transmembranaire et sont sensibles à l'inhibition des groupes carbonyles par des réactifs spécifiques incluant le semicarbazide (Yu *et al.*, 2003).
- ii) Le deuxième type est représenté par la CuAO soluble, présente dans le plasma sanguin (Morris *et al.*, 1997). Cette amine oxydase sérique (EC 1.4.3.21) ou SAO ou encore la benzylamine oxydase, catalyse l'oxydation de diverses monoamines et est probablement synthétisée dans le foie (Mu *et al.*, 1994).
- iii) La diamine oxydase (DAO) est une CuAO, elle se retrouve au niveau de la muqueuse intestinale, des reins et du placenta (Argento-Cerù et Autuori, 1985). La DAO intestinale se retrouve plus précisément au niveau des villosités, ce qui suggère que l'activité de l'enzyme peut servir d'indicateur de l'intégrité de la muqueuse de l'intestin (Fogel *et al.*, 2009; Honzawa *et al.*, 2011). En effet, chez les humains, l'activité de la DAO sérique augmente durant la grossesse ou en conditions pathologiques comme dans le cas de différents types de cancer (Agostinelli *et al.*, 2009) ou de maladies inflammatoires de l'intestin (Fogel et Lewinski, 2006).

Des CuAOs ont été identifiées dans diverses sources microbiennes, animales ou végétales telles que: *Escherichia coli*, *Arthrobacter globiformis*, *Aspergillus nidulans* et *Pisum sativum* (Parsons *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2002; McGrath *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 1996). La diamine oxydase d'origine humaine a été aussi produite à l'aide des ADN recombinants dans les cellules S2 de drosophile (McGrath *et al.*, 2010).

## 1.5 Quelques oxydases aux applications biomédicales et analytiques

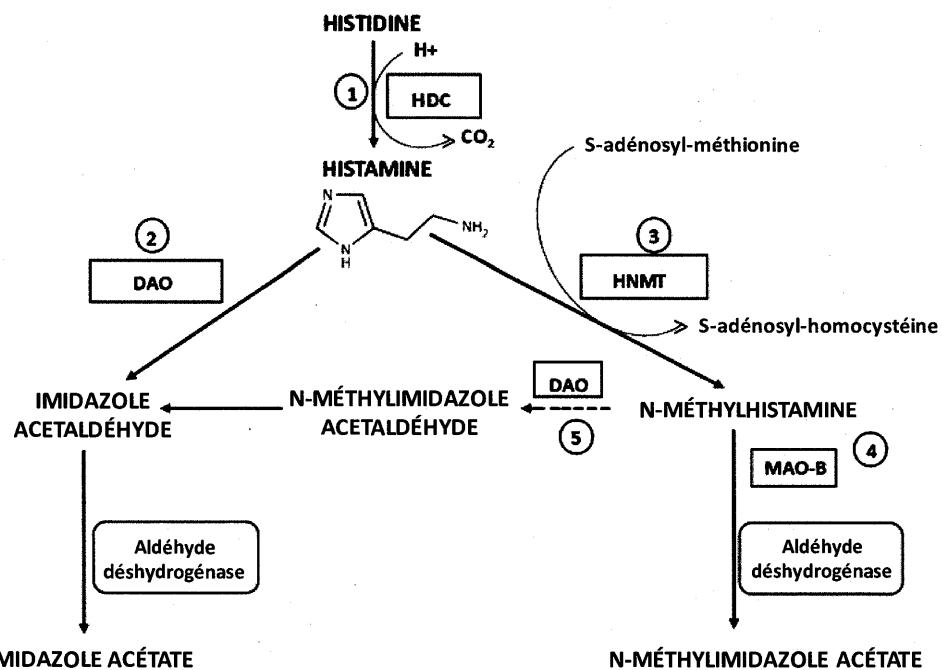
Des protéines à cuivre comme la ceruloplasmine et l'amine oxydase présentent des propriétés antioxydante et aussi cardio-protectrice en condition de réperfusion post-ischémique (Atanasiu *et al.*, 1995; Mateescu *et al.*, 1995). À la réperfusion, l'oxygène peut induire la formation d'agents pro-oxydants et des radicaux libres. Les phénomènes ischémiques au niveau intestinal peuvent avoir également des répercussions majeures, nécessitant des interventions médicamenteuses et même chirurgicales. Les maladies inflammatoires du colon, dont la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse, nécessitent des thérapies anti-inflammatoires intensives, des immunothérapies majeures et, dans certains cas de MC, des interventions chirurgicales avec ablation des segments d'intestin. Dans ce contexte, l'histamine, comme agent pro-inflammatoire, peut avoir un effet délétère.

### 1.5.1 Diamine oxydase, enzyme avec des propriétés biomédicales et analytiques

#### 1.5.1.1 DAO comme alternative thérapeutique pour les dysfonctions liées à l'histamine

L'histamine (2-[4-imidazolyl] éthylamine) est une amine biogène naturellement produite par différents organismes. Chez l'humain, elle est issue de la décarboxylation de l'histidine par l'histidine décarboxylase et est stockée dans des vésicules de mastocytes, basophiles et granulocytes (origine endogène) (Fig. 1.5, Maintz et Novak, 2007). L'histamine est présente dans tous les tissus chez les mammifères avec de plus

grandes concentrations retrouvées dans le foie, les poumons, la paroi de l'estomac, la peau. Elle peut également être apportée par l'alimentation (origine exogène) (Fig. 1.5, Maintz et Novak, 2007; Kovacova-Hanuscova, 2015). L'histamine est libérée par une dégranulation des mastocytes en réponse à divers stimuli immunologiques et non-immunologiques (activation de récepteurs Fc $\epsilon$ RI par des allergènes spécifiques, les neuropeptides, cytokines, lipoprotéines, l'hyperosmolarité, l'hypoxie, les facteurs physiques et chimiques, certains aliments et médicaments) (Casale *et al.*, 1984; Genovese *et al.*, 1996; Blunk *et al.*, 2004; Maintz et Novak, 2007). Une fois libérée, l'histamine est impliquée dans diverses réactions biologiques via l'activation de ses récepteurs spécifiques (H1R, H2R, H3R, H4R) sur des cellules cibles. Selon le récepteur activé, l'histamine est impliquée dans la contraction de fibres lisses, notamment digestives et bronchiques (bronchoconstriction, péristaltisme, perméabilité vasculaire, tachycardie, arythmie), dans la vasodilatation capillaire par libération du monoxyde d'azote et dans la régulation de l'acidité gastrique (stimulation de la sécrétion de l'acide chlorhydrique gastrique) (Fig. 1.5, Maintz et Novak, 2007). L'histamine est également impliquée dans la réponse inflammatoire, les réactions immunitaires, la neurotransmission, la régulation du rythme du sommeil, la croissance cellulaire et l'angiogenèse dans des modèles tumoraux induites (Maintz et Novak, 2007; Kovacova-Hanuscova, 2015). Dépendamment de sa localisation, l'histamine est inactivée par des modifications chimiques (Fig. 1.4), soit par une désamination oxydative catalysée par la diamine oxydase (DAO) ou la monoamine oxydase (MAO), soit par la N-méthylation via l'histamine N-méthyl transférase (HNMT). Par la désamination oxydative, l'histamine est convertie en imidazole-4-acétaldéhyde qui sera également convertie en imidazole acétate (ImAA) (Gildon *et al.*, 1961). L'imidazole acetate produit est ensuite conjugué avec un ribose puis le composé est éliminé par l'urine. La N-méthylation de l'histamine produit la 1,4 methyl-histamine suivie d'une oxydation.



**Figure 1.4 :** Représentation schématique du métabolisme de l'histamine. HDC : Histidine décarboxylase ; DAO : Diamine oxydase ; MAO-B : monoamine oxydase B ; HNMT : Histamine N-méthyltransférase (adaptée d'après Maintz & Novak, 2007).

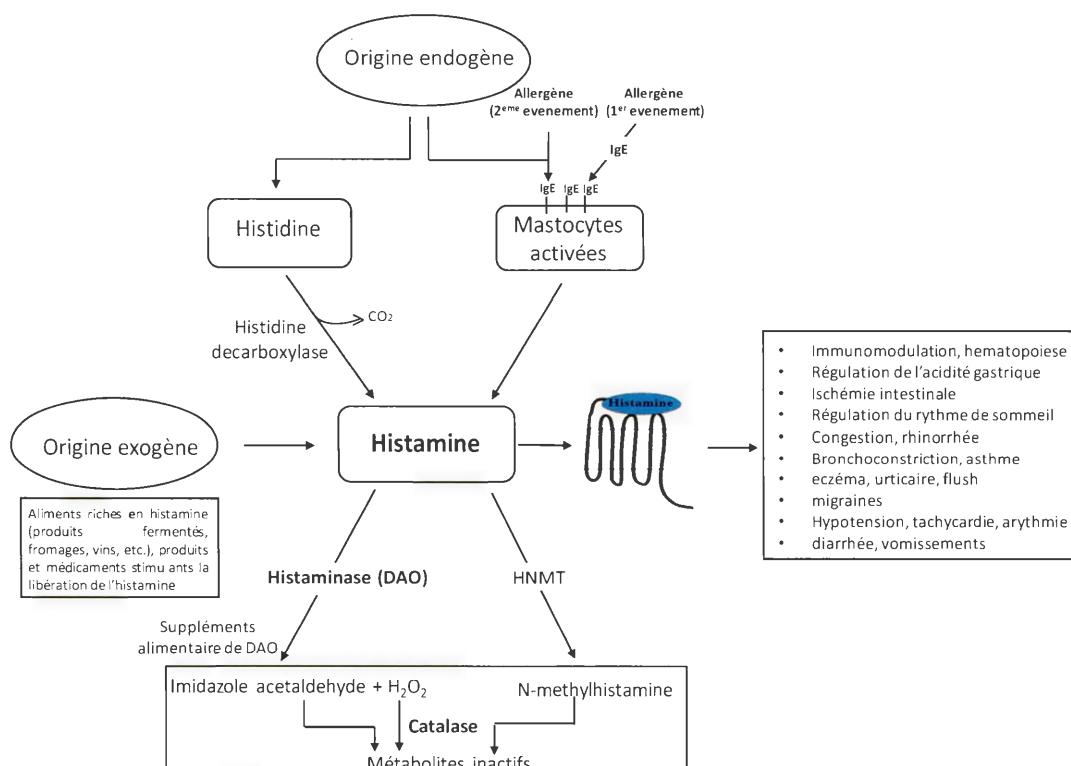
L'augmentation de la quantité d'histamine due à une déficience en activité de la DAO ou à une intoxication alimentaire pourrait conduire à des réactions pseudo-allergiques et d'intolérance (Maintz et Novak, 2007 ; Kovacova-Hanuscova, 2015 ; Mateescu *et al.*, 2017). L'histaminose alimentaire, ou l'intolérance alimentaire à l'histamine, résulte d'une dérégulation de l'homéostasie de l'histamine conduisant à son accumulation au niveau de l'intestin due à des facteurs exogènes, comme une intoxication alimentaire (alimentation riche en histamine) (Kovacova-Hanuscova *et al.*, 2015). De plus, une déficience de l'activité enzymatique de la DAO peut provoquer l'intolérance à l'histamine. Les symptômes peuvent être désagréables, voire graves et incluent des maux de tête (Kaliner *et al.*, 1982; Thomsen *et al.*, 1997; Thomsen *et al.*, 2001), de la rhinite (Druce et Kaliner, 1988; White *et al.*, 1990), l'eczéma, l'urticaire (Kaplan *et al.*, 1997), les malaises gastrointestinaux (colique, flatulence, diarrhée) et, dans des cas

extrêmes, des crises d'asthme (Maintz et Novak, 2007) ou même des chocs anaphylactiques, parfois létaux. L'histamine, comme agent pro-inflammatoire, présente aussi un effet délétère dans les dysfonctions entériques (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, entéropathie allergique). Plusieurs traitements incluant les corticostéroïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les immunomodulateurs, les antihistaminiques, sont utilisés afin de soulager les symptômes des dysfonctions entériques (Mateescu *et al.*, 2017). Ces thérapies, couramment utilisées, ne guérissent pas les dysfonctions liées à l'histamine et ont également des effets secondaires tels que la nausée, la somnolence, la perte de goût et de l'odorat, etc. Il en résulte la nécessité d'envisager d'autres traitements, entre autres, l'utilisation directe de la diamine oxydase pour traiter les histaminoses alimentaires et autres dysfonctions associées à l'histamine.

Il existe actuellement sur le marché une DAO d'origine animale (rein de porc) commercialisée sous la forme de supplément alimentaire visant à soulager les symptômes de l'intolérance à l'histamine. Une étude randomisée en double aveugle sur des individus souffrant d'intolérance alimentaire a été faite dans le but de vérifier la reproductibilité des symptômes liés à ce malaise (Komericki *et al.*, 2011). Malgré une grande variabilité pour établir une reproductibilité des symptômes, une réduction des signes a été observée chez les patients qui ont consommé des capsules de DAO (DAOSin® ou Histame®) lors de l'étude. Masini *et al.* (2004) ont aussi effectué une étude sur des cobayes des effets de la DAO dont une réaction similaire à l'asthme allergique qui a été induite par l'ovalbumine (il existe un consensus selon lequel l'histamine est un médiateur essentiel de l'inflammation et de bronchospasme, deux paramètres clés de l'asthme allergique, Page *et al.*, 2001). Par administration intrapéritonéale journalière, la DAO a généré une réduction de l'inflammation de la colite ulcéreuse induite chez le rat par une injection intra-rectale d'acide acétique 4% (Fogel *et al.*, 2006). Une réduction des anomalies respiratoires et une prévention d'un arrêt respiratoire ont été observées suite à un pré-traitement à la DAO par voie

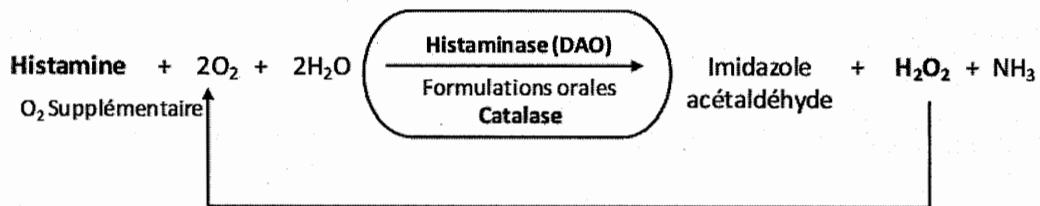
intrapéritonéale ou sous forme d'aérosols (Masini *et al.*, 2004). De plus, le traitement à la DAO a diminué les lésions au tissu pulmonaire causées par l'inflammation (Masini *et al.*, 2004) et a eu un effet contre la bronchoconstriction. La DAO a été aussi immobilisée sur BrCN-Sepharose (Federico *et al.*, 2000).

Très récemment, la diamine oxydase d'origine végétale extraite à partir de pois chiches (*Lathyrus sativus*) a été proposée comme agent thérapeutique afin de traiter des histaminoses et des dysfonctions reliées à l'histamine ou pour améliorer les traitements existants des maladies du colon enflammé (Mateescu *et al.*, 2017). Comme supplément alimentaire, la diamine oxydase (DAO) peut réduire les effets néfastes liés à l'accumulation de l'histamine (Mateescu *et al.*, 2017).



**Figure 1.5 :** Représentation schématique des origines (endogène et exogène) de l'histamine avec son implication possible dans des réactions pseudo-allergiques (d'après de Mateescu *et al.*, 2017).

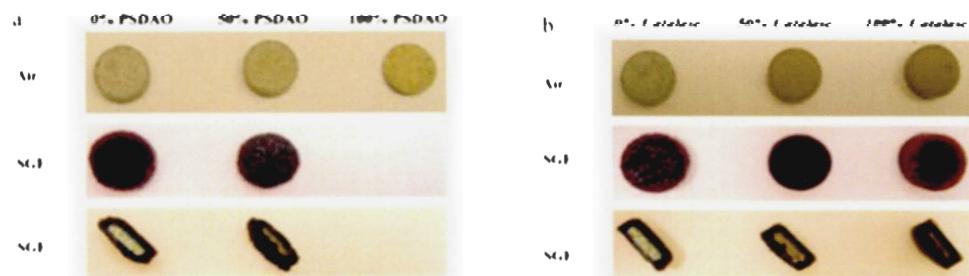
On peut donc supposer que l'utilisation de la diamine oxydase végétale comme agent thérapeutique est envisageable. Cette approche a pour avantage d'utiliser une enzyme d'origine végétale plus réactive et avec une meilleure affinité pour les diamines aliphatiques par rapport à celle provenant du sérum bovin (Pietrangeli *et al.*, 2007). L'ajout de la catalase (enzyme antioxydante) à l'enzyme DAO thérapeutique est proposé afin d'éliminer rapidement le peroxyde d'hydrogène, un produit secondaire (pro-oxydant) à la désamination catalysée par la DAO (Fig 1.6; Calinescu *et al.*, 2012; Mateescu *et al.*, 2017). La catalase assure la décomposition du peroxyde d'hydrogène (produit secondaire de la réaction) augmentant le taux d'oxygène disponible, favorisant ainsi par déplacement de l'équilibre de la réaction la dégradation de l'histamine. Les deux enzymes thérapeutiques sont formulées avec des excipients de type Carboxyméthyl Amidon offrant une protection aux enzymes contre le milieu gastrique et permettant une délivrance dans l'intestin (d'après Calinescu *et al.*, 2012).



**Figure 1.6 :** Schéma représentatif de la bio-élimination par désamination oxydative de l'histamine par la formulation composée de diamine oxydase (DAO) et de catalase administrable par voie orale (Calinescu *et al.*, 2012; Mateescu *et al.*, 2017).

Plusieurs systèmes ont été développés utilisant des matériaux biocompatibles, *i.e.* microsphères à base de carboxyméthyl amidon et alginat (Blemur *et al.*, 2016) et comprimés monolithiques de Carboxyméthyl amidon:Chitosane, afin d'offrir une protection du principe actif (DAO végétale) contenant la catalase (ou non) face à l'acidité de l'estomac et à la protéase gastrique (pepsine) et assurer sa délivrance de façon efficace et sécuritaire (Calinescu *et al.*, 2012). Le carboxyméthyl amidon et le chitosane sont des excipients macromoléculaires.

Les matrices hydrophyliques constituées de mélange binaires de Carboxyméthyl amidon : Chitosane (1:1) contribuent à la stabilisation physique et chimique des formes de dosage (Leonida et Mateescu, 2006; Calinescu et Mateescu, 2012). Ces matrices semblent de bons systèmes pour les formulations d'enzymes thérapeutiques administrables par voie orale (Calinescu *et al.*, 2012). Les comprimés monolithiques de Carboxyméthyl amidon : Chitosane offrent une protection efficace aux agents actifs (DAO végétale et catalase) contre l'acidité gastrique (Fig. 1.7).



**Figure 1.7:** Stabilité des formulations d'enzymes dans les tablettes monolithiques de Carboxyméthyl amidon : Chitosane (vue frontale et sections) en fonction du pH (d'après Calinescu *et al.*, 2012). Cet excipient binaire offre donc une protection gastrique aux enzymes thérapeutiques.

### 1.5.1.2 Applications analytiques de la DAO pour le dosage de l'histamine

La DAO est aussi utilisée pour des applications analytiques, notamment pour déterminer la présence de l'histamine ou d'autres amines biogènes (putrescine, cadaverine, tyramine) dans des échantillons biologiques ou sur des produits alimentaires. Une ingestion excessive de l'histamine peut conduire à une intoxication alimentaire. L'histamine peut rapidement s'accumuler dans les tissus de poissons et produits de mer dépendamment des quantités d'histidine qui y sont présentes et des conditions de conservation (Male *et al.*, 1996). Cette amine biogène est en effet produite après la mort du poisson sous l'action de bactéries qui produisent l'histidine décarboxylase impliquée dans la dégradation de l'histidine. L'histamine constitue à cet

effet un indicateur majeur et rapide de la décomposition des produits alimentaires tels que les poissons (Male *et al.*, 1996; Tombelli et Mascini, 1998; Patange *et al.*, 2005) et elle peut s'accumuler sans toutefois altérer l'odeur et la texture de l'aliment (Lehane et Olley, 2000). L'histamine se retrouve aussi dans les produits fermentés par les bactéries *i.e.* fromage, les produits transformés ou marinés. Les bactéries impliquées dans la formation de l'histamine prolifèrent à des températures de 7° à 10° C dans les ouies et viscères de poisson et cette prolifération est réduite ou inhibée à des températures inférieures à 5°C (Niraj *et al.*, 2012). D'autres bactéries impliquées restent néanmoins actives entre 0 et 5°C. La production de l'histamine peut être réduite selon le mode de conditionnement des aliments puisque l'histidine decarboxylase est plutôt active à des températures élevées (Niraj *et al.*, 2012). Certaines bactéries peuvent se développer durant la conservation "inadéquate" et donc secréter l'enzyme permettant la production de l'histamine. Certains produits alimentaires tels que les tomates, certains agrumes et baies sont également riches en histamine mais non lié à une activité bactérienne et d'autres produits sont capables d'induire la libération de l'histamine dans l'organisme (endogène). L'intoxication à l'histamine alimentaire est également causée par la consommation de poissons contaminés (*Scombroïd fish poisoning*) par les bactéries suite à une mauvaise conservation. Pour cela, des techniques simples et rapides de dosage de l'histamine dans les produits alimentaires sont très importantes.

Les biosenseurs sont des outils analytiques permettant de faire des bio-diagnostiques, de déterminer la présence et la concentration d'une substance spécifique (l'analyte) dans un échantillon biologique.

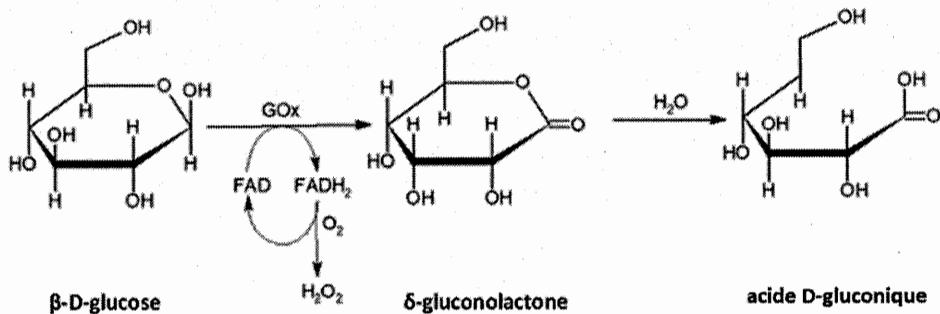
Les biosenseurs avec la DAO immobilisée permettent d'évaluer de façon rapide et efficace la présence et de quantifier des amines biogènes (histamine) et donc d'évaluer la fraîcheur des produits alimentaires (produits de mer, fromage, aliments fermentés). Le principe de base du biosenseur de l'histamine est la réaction de désamination oxydative en imidazole acétaldéhyde, peroxyde d'hydrogène et ammonium catalysée

par la diamine oxydative. La quantité de l'histamine peut être déterminée soit par la diminution du taux d'oxygène soit par une augmentation du peroxyde d'hydrogène produit durant la réaction enzymatique (première génération de biosenseurs ampérométriques de l'histamine) (Lange et Wittmann, 2001). La concentration de l'oxygène peut être mesurée par le couplage de la membrane avec la DAO immobilisée à un senseur électrochimique de l'oxygène. Le biosenseur à l'histamine basé sur la production du peroxyde d'hydrogène a diverses applications et offre de nombreuses facilités notamment dans le développement de versions miniatures ou implantables de ces senseurs. Néanmoins l'utilisation de ces capteurs peut être limitée par des problèmes d'interférence provenants de petites molécules electro-actives qui peuvent influencer la détection du potentiel de peroxyde d'hydrogène (Niraj *et al.*, 2012).

Une seconde génération de biocapteurss de l'histamine a été développé utilisant des médiateurs redox (*i.e.* Fc-COOH, ferrocène carboxylique) permettant le transfert des électrons de l'enzyme vers l'électrode avec un système bi-enzymatique incluant la peroxydase (HRP) (Wimmerova et Macholan, 1999).

### 1.5.2 Applications analytiques de la glucose oxydase

La glucose oxydase, enzyme à FAD (EC 1.1.3.4) hautement spécifique, est une enzyme homodimérique constituée de deux sous-unités identiques avec le FAD comme groupement prosthétique dans chaque sous-unité. Elle catalyse l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en D-glucono- $\delta$ -lactone et peroxyde d'hydrogène (Fig. 1.8). La glucose oxydase peut être d'origine animale, végétale ou microbienne. Une des principales applications de la glucose oxydase est le dosage du glucose dans le sang ou les fluides corporelles ou encore dans des bioréacteurs industriels (*i.e.* glycomètres, biosenseurs) (Du *et al.*, 2007; Courjean *et al.*, 2011). Elle peut aussi être utilisée dans l'industrie agroalimentaire notamment dans la production et la conservation de produits alimentaires (Bankar *et al.*, 2009). Cette enzyme a également des propriétés bactéricides.

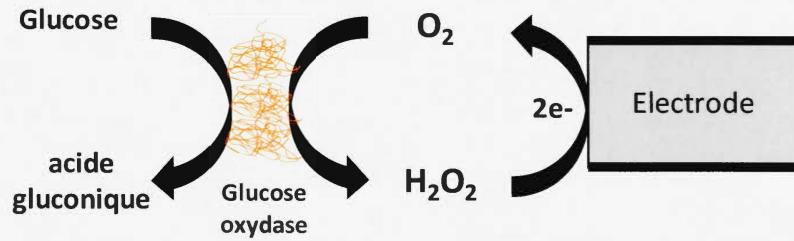


**Figure 1.8 :** Réaction d'oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase

Le glycomètre est utilisé pour doser rapidement et de façon efficace le glucose dans le sang ou dans d'autres fluides corporels permettant ainsi d'avoir les actions nécessaires si le taux de sucre est élevé ou bas. Le dosage du glucose dans le sang par le glycomètre peut permettre de contrôler la glycémie et donc de prévenir l'hyperglycémie ou l'hypoglycémie, réduire les risques liés aux complications de diabète ou encore permettre aux diabétiques de vérifier l'efficacité de leurs traitements incluant l'insuline (Yoo and Lee 2010).

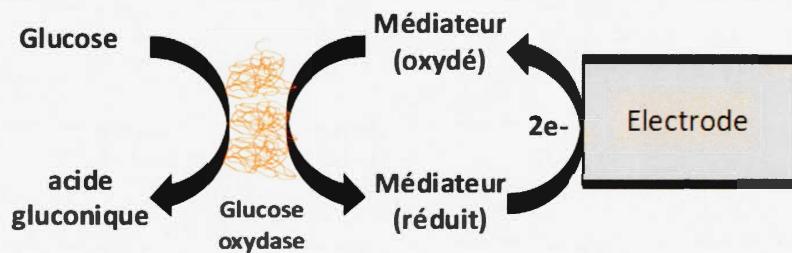
Le dosage du glucose par un senseur peut se faire par la mesure de l'oxygène consommé ou de la quantité du peroxyde d'hydrogène produite par la réaction enzymatique ou encore par l'utilisation de médiateurs immobilisés pour transférer les électrons de la glucose oxydase vers l'électrode. Les biosenseurs enzymatiques pour le glucose peuvent être subdivisés selon leur évolution :

La première génération de biosenseurs du glucose consiste en des réponses électriques dues au produit de la réaction d'oxydation qui est diffusé jusqu'au transducteur (Wang, 2001). Ces biosenseurs déterminent la quantité de glucose dans les échantillons à partir du peroxyde d'hydrogène produit par l'oxydation du glucose avec la glucose oxydase (Fig. 1.9).



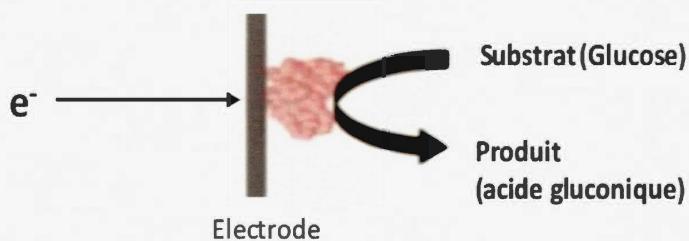
**Figure 1.9 :** Première génération de biosenseurs enzymatiques du glucose, basés sur la mesure du peroxyde d'hydrogène produit par la réaction.

Une seconde génération de biosenseurs (Fig. 1.10) a été développée à cause de certains inconvénients de ceux de la première génération (nécessité d'un potentiel élevé 0.6V pour des mesures ampérométriques du peroxyde d'hydrogène afin d'avoir une bonne sélectivité, fluctuations dues à la faible solubilité de l'oxygène dans les fluides biologiques, réduction de l'activité de l'enzyme due au peroxyde d'hydrogène, interférences avec d'autres produits tels que l'acétaminophène, l'acide ascorbique) (Reach et Wilson, 1992; Sasso *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1994; Wang, 2001) qui peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène provoquant ainsi une diminution apparente de l'activité enzymatique. Plusieurs médiateurs spécifiques (ferrocène, ferricyanide, quinines, etc.) sont présents entre la réaction et le transducteur (l'électrode) générant ainsi des réponses plus significatives (Cass *et al.*, 1984; Frew et Hill, 1987). L'utilisation de médiateurs redox élimine la nécessité de l'oxygène (variable) pour le transfert d'électrons à la surface de l'électrode (Wang, 2001). Également, les aspects de diffusion qui peut ralentir le processus à la surface de l'électrode sont éliminés. Les biosenseurs de la seconde génération présentent aussi des limites à leurs utilisations (compétitions élevées entre le médiateur redox et l'oxygène, modifications de réponses dues aux interférences avec d'autres espèces électro-actives, etc.)



**Figure 1.10 :** Biosenseurs enzymatiques de deuxième génération du glucose, basés sur l'utilisation de médiateurs redox.

Pour la troisième génération, la réaction produit elle-même des réponses (Fig. 1.11). Cette troisième génération se base sur un transfert direct des électrons du centre actif de l'enzyme vers l'électrode.



**Figure 1.11 :** Biosenseurs enzymatiques de troisième génération pour le glucose, basés sur un transfert direct d'électrons du site actif de la glucose oxydase vers l'électrode.

Les biosenseurs du glucose basés sur l'utilisation de nanotubes de carbone sont considérés comme la prochaine génération de biosenseurs ultra-sensible et ultra-rapide (Lin *et al.*, 2004). La glucose oxydase est immobilisée par des liaisons covalentes entre groupements amines de l'enzyme et groupements carboxyles des nanotubes. La réduction du peroxyde d'hydrogène généré par la réaction d'oxydation du glucose par la glucose oxydase sur les nanotubes va permettre une détection sélective du glucose.

## CHAPITRE II

### LES SURFACTANTS COMME MODULATEURS ENZYMATIQUES

#### 2.1 Généralités sur les surfactants

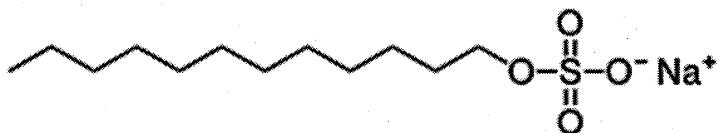
Il s'agit de composés amphiphiles constitués de deux parties de polarité différente (une tête polaire, hydrophile et une queue hydrophobe, apolaire) capables de modifier la tension superficielle entre deux surfaces (liquide-liquide ou liquide-solide) (Lange, 1999; Rosen, 2004). Les surfactants peuvent avoir des effets détersifs, émulsifiants, dispersifs, mouillants, moussants, antiseptiques (Tsujii, 1998; McClements, 2005). En phase aqueuse, les surfactants peuvent s'agencer de manière à former des structures micellaires avec les parties hydrophiles à la surface de la structure (en contact avec l'eau) et les côtés hydrophobes à l'intérieur de la structure (Fig. 2.1). A l'instar des micelles, d'autres types d'agrégats peuvent également être formés par des surfactants en phase aqueuse, entre autres, des micelles inverses, micelles cylindriques ou sphériques, des bicouches lipidiques (Israelachvili J., 1986).



**Figure 2.1 :** Différents types de structures pouvant être formés par différents surfactants.

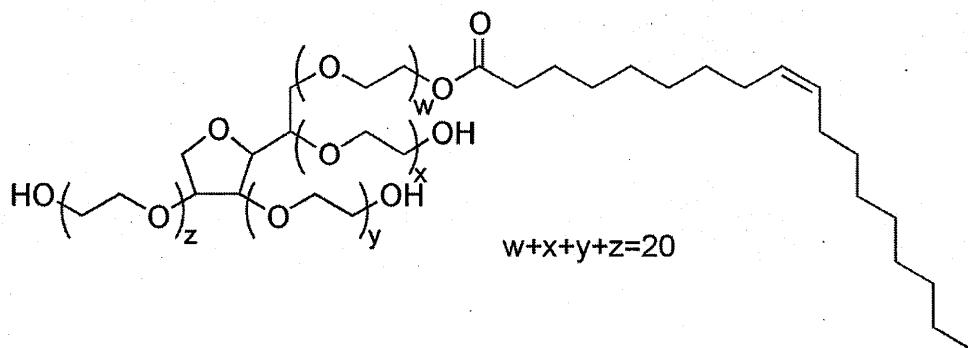
Les surfactants peuvent être classés en fonction de leur nature synthétique ou naturelle (origine animale ou végétale), en fonction de leur poids moléculaire et leur charge ionique. Ainsi, en fonction de leurs partie polaire, on peut distinguer :

Les surfactants ioniques, chargés négativement (surfactants anioniques) ou positivement (surfactants cationiques) (Nakama, 2017). Les surfactants ioniques incluent N-lauryl sarcosine, cetyltriméthyl - ammoniumbromide (CTAB) et le sodium cholate. Le sodium dodécylique sulfate (SDS) est aussi un exemple de surfactant anionique (Fig. 2.2) synthétique utilisé comme détergent, mais aussi comme agent solubilisant (pour lyser des cellules et extraire les protéines d'intérêt). Le SDS peut induire soit une dénaturation ou un repliement des protéines selon les quantités utilisées et selon la nature de la protéine. Ces surfactants sont généralement très agressifs et dénaturants car ils peuvent détruire les interactions inter - et intra - moléculaires protéine-protéine. Des études quantitatives ont montré les propriétés du SDS influençant les processus de repliement ou de dénaturation des protéines (Sehgal *et al.*, 2005). Les acides biliaires font également partie des surfactants ioniques mais sont moins agressifs et plus doux. Certaines propriétés des surfactants ioniques peuvent être affectées par la force ionique des solutions tampons en modifiant le degré d'ionisation de la tête polaire du surfactant et le degré d'hydratation locale. Par exemple la concentration micellaire critique (CMC) de ces surfactants peut fortement diminuer lorsque la concentration en NaCl du tampon augmente de 0 à 500 mM. Ainsi, la quantité d'électrolytes influence la capacité d'aggrégation des surfactants anioniques. Les surfactants anioniques sont largement utilisés dans le domaine industriel.



**Figure 2.2 :** Structure du SDS présentant sa tête hydrophile polaire et sa queue hydrophobe apolaire.

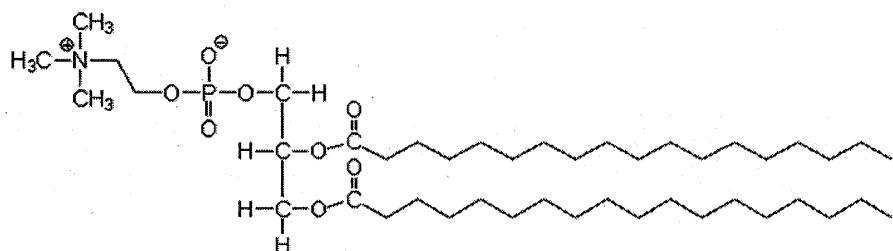
Les surfactants non ioniques ou neutres étant sans charge sur leurs groupements hydrophiles ne sont pas ionisés en solution aqueuse (Nakama, 2017). Entre autres, les maltosides, les glucosides, les polyvinylalcools (PVA), les polyoxyethylene glycols (PEG), le Tween peuvent être cités. Le polysorbate 80 (Tween 80) est un surfactant (Fig. 2.3) et agent émulsifiant non ionique synthétique et hydrosoluble ayant plusieurs applications biochimiques. Il est utilisé comme émulsifiant pour des produits agro-alimentaires ou encore comme surfactant et solubilisant en industrie cosmétique. Le tween 80 a également des applications analytiques et est utilisé comme excipient, solubilisant dans l'industrie pharmaceutique. Ces surfactants sont très doux et non agressifs sur les protéines. Ils dénaturent les interactions lipides-protéines et lipides-lipides mieux que les interactions de type protéine-protéine. Les surfactants neutres à courtes chaines (i.e., C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>) sont moins dénaturants que ceux à longues chaines (i.e., C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>) (Seddon *et al.*, 2004). Certaines propriétés des surfactants non ioniques ont sensibles à la température. La température influence en effet la capacité des surfactants à former les micelles. Il est donc important de connaître la température et l'intervalle de concentration pour lesquelles ces surfactants peuvent s'aggréger.



**Figure 2.3 :** Structure du Tween 80 présentant sa tête hydrophile polaire et sa queue hydrophobe apolaire (d'après Contois, 2010).

Les surfactants ampholytiques ayant les deux types de charge (anionique et cationique; Nakama, 2017) dans leurs groupements hydrophyles sont électriquement neutres

comme les surfactants non ioniques mais ont la capacité de dénaturer les interactions protéine-protéine et sont donc moyennement doux. Leurs propriétés sont sensibles au pH et sont dépendantes des électrolytes. On peut citer en exemple le dodécylphosphocholine, le lauryldiméthylamineoxyde. La lécithine (présente dans le jaune d'œuf, les graines de tournesol, de colza ou de soja) fait partie des surfactants ampholytiques (Fig. 2.4). Il s'agit d'une substance naturelle essentielle à l'organisme (source diététique de choline, utilisée dans le traitement de certains désordres neurologiques), mais elle est également utilisée comme émulsifiant, additif alimentaire ou encore comme stabilisant dans les industries pharmaceutique, agro-alimentaire et cosmétique. C'est un mélange de plusieurs glycérophospholipides dont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol, l'acide phosphatidique à des proportions différentes en fonction de la source de lécithine. Malgré une faible hydrosolubilité, la lécithine est un excellent émulsifiant. En milieu aqueux, ses phospholipides peuvent former diverses structures telles que des liposomes, des micelles.



**Figure 2.4 :** Structure de la lécithine présentant sa tête hydrophile polaire et sa chaîne hydrophobe.

Il y'a également des surfactants polymériques synthétiques (des homopolymères tels que le polyvinylalcool) ou naturels (macromolécules globulaires telles que la BSA ou fibrillaires telles que la caséine).

Les caractéristiques telles que la longueur de la chaîne alkyl, le degré d'insaturation ou de branchements, la présence de groupements aromatiques sur leur partie hydrophobe influence également les propriétés des surfactants (capacité d'agrégation de monomères de surfactants). La longueur de la chaîne hydrophobe du surfactant affecte l'hydrosolubilité des monomères et provoque la formation de micelles très compactes (Rosen, 2004). La présence d'insaturation et de branchements peut réduire la capacité de compaction des monomères.

La tête hydrophile et la taille de la chaîne hydrophobe peuvent affecter ensemble l'action des surfactants. Il s'agit de "HLB value" (Hydrophobic-Lipophilic Balance) avec des valeurs variant de 0 à 40. Cette valeur HLB est un ratio fractionnaire de la partie hydrophobique et celle hydrophylique qui permet donc de déterminer l'équilibre existant entre la partie hydrophile et la partie lipophile d'un surfactant. Les surfactants ont une hydrosolubilité très faible lorsque leur HLB est inférieure à 10. Une HLB comprise entre 10 et 40 indique des surfactants qui se solubilisent rapidement dans l'eau. Le SDS a par exemple une HLB de 40. La HLB est 16,7 pour le Tween 20 et 15 pour le Tween 80. Le Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) et le Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) possèdent le polysorbate comme tête hydrophyle mais diffèrent au niveau de leur queue hydrophobe ce qui influence leur valeur HLB. Le Tween 20 est constitué d'un acide gras C12 à chaîne linéaire saturée alors que le Tween 80 a un acide gras à chaîne linéaire insaturée (C18 :1) dans sa structure. Le Triton X-100 a une HLB de 13,5 et 12,4 pour le Triton X-114. Les Triton sont assez similaires mais se différencient au niveau du nombre de monomère par micelle formé (9,6 pour le Triton X-100 et 8 pour le Triton X-114) et au niveau de la distribution de taille des groupements polaires polyéthylène glycol (PEG). Le Triton X-100 nécessite donc un peu plus de monomères pour la formation des micelles par rapport au Triton X-114. Aussi le point de turbidité, la température à partir de laquelle les micelles s'aggrègent, de Triton X-100 est de 64 °C et celui de Triton X-114 est de 23 °C. Il existe également une corrélation entre la valeur HLB et la capacité de

paquetage des surfactants (Umbreit et Strominger, 1973; Krugliakov, 2000). La capacité des surfactants à former des micelles très compactées augmente lorsque la valeur HLB diminue. Plus l'hydrophobicité d'un surfactant augmente, plus ses monomères auront tendance à former des micelles lamellaires.

Un autre paramètre des surfactants est la CMC (Critical Micelle Concentration). Il s'agit de la concentration à partir de laquelle ils vont s'agréger en micelles (structures non covalentes). Lorsque la concentration totale de surfactants est en deçà de la CMC, ils sont libres en solution mais par ajout de surfactants, les micelles peuvent commencer à être formées (Rosen, 2004). La CMC d'un surfactant diminue dépendamment de l'augmentation de son hydrophobicité. La polarité des surfactants affecte leurs CMC. Ainsi, les surfactants ioniques ont une CMC plus élevée que celles des non ioniques. Ceci est due au phénomène de répulsion électrique, les têtes polaires de monomères voisins ayant tendance à se repousser. Les surfactants ampholytiques ont des CMC plus faibles que les ioniques. La présence d'électrolytes peut aussi modifier la CMC d'un surfactant car la concentration en sels dans le tampon par exemple peut altérer la capacité de compaction des monomères.

Les agents surfactants peuvent être utilisés pour diverses applications dans les domaines agroalimentaire, pharmaceutique, en génie chimique pour des synthèses, etc. Comme additifs alimentaires, ils peuvent donner une texture particulière aux produits alimentaires, préserver la dispersion des ingrédients dans les produits et modifier la viscosité des aliments. Les surfactants peuvent également être utilisés comme détergent ou agent solubilisant pour l'extraction de protéines mais aussi comme agents stabilisants (Tsuji, 1998).

## 2.2 Interaction protéines-surfactants

L'utilisation de surfactants comme stabilisants de protéines, d'enzymes ou autres principes actifs a été proposée en suivant les modèles d'interaction phospholipides-protéines membranaires dans les cellules (Helenius et Simons, 1975; Jones, 1975).

Les phospholipides sont des lipides membranaires amphiphiles composés d'une partie polaire hydrophile et de deux chaînes aliphatiques hydrophobes. Ils sont constitués de mono ou di-esters phosphoriques. Les phosphoglycérides, les acides phosphatidiques, les sphingomyélines font partie des phospholipides (Cooper et Geoffrey, 2000). La majorité des phospholipides sont des phosphoglycérides dont la partie hydrophile s'organise autour d'un résidu glycerol-3-phosphate estérifié par une molécule polaire. Les phospholipides sont des composants essentiels des membranes cellulaires au niveau desquelles ils s'organisent en bicoche phospholipidique avec le cholestérol (Singer et Nicolson, 1972). La bicoche est organisée de manière à ce que les parties hydrophobes soient à l'intérieur de la structure et les têtes polaires hydrophiles forment les deux surfaces de la bicoche (Singer et Nicolson, 1972). Les phospholipides assurent la fluidité membranaire et permettent le passage des molécules (Horton et al., 1994).

Les protéines interagissent avec la membrane par des liaisons électrostatiques, des liaisons hydrogène et des liaisons Van der Waals au niveau de domaines caractéristiques de protéines ou de lipides. Ces interactions étant faibles, elles sont facilement rompues par des variations de conditions telles que le pH.

Les systèmes surfactants-protéines ont été suggérés dans les domaines d'utilisation de protéines et d'enzymes à grande échelle afin de stabiliser la structure tridimensionnelle des protéines, augmenter leur activité catalytique, faciliter la diffusion des substrats et des produits (Bam *et al.*, 1995; Mondovi *et al.*, 1992; Arakawa et Kita, 2008). Les

surfactants peuvent interagir avec les protéines dépendamment de plusieurs paramètres tels que le pH, la force ionique, la température, la nature de la protéine, la longueur de la chaîne hydrocarbonée et la nature du groupement hydrophile du surfactant. Selon leur nature et la quantité utilisée, les surfactants peuvent dénaturer les protéines ou stabiliser leurs structures tridimensionnelles (Moosavi-Movahedi, 2005). Les protéines ou enzymes peuvent subir des dommages chimiques (oxydation des résidus acides aminés ou autres modifications chimiques) et/ou des dommages physiques (agrégation, déploiement, etc.) conduisant à leur dénaturation et inactivation. Ces deux types de dommages ne sont pas toujours indépendants. Les surfactants sont ajoutés aux protéines afin de prévenir les dommages durant les processus de purification, de filtration, de nébulisation, de lyophilisation et de stockage (Carpenter *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997; Randolph et Jones, 2002). Par leur nature amphiphile, les surfactants peuvent adapter leur orientation spécifique en milieu aqueux et interagir avec les protéines. Les surfactants neutres sont les plus utilisés pour stabiliser les protéines par rapport aux surfactants anioniques qui sont plus dénaturants (Loughheed *et al.*, 1983; Twardowski *et al.*, 1983; Chawla *et al.*, 1985).

## CHAPITRE III

### LES VITAMINES ET LEURS RÔLES BIOPROTECTEURS

Les vitamines (étymologie : « amines nécessaires à la vie », même si toutes les vitamines ne sont pas des amines) sont des substances organiques (sans valeur énergétique propre, mais essentielles à l'organisme) retrouvées chez les animaux et les plantes. Les vitamines doivent être apportées par l'alimentation car l'organisme humain ne peut en produire en quantité suffisante (Bender, 1992). Environ treize substances sont considérées comme vitamine. Ce sont des groupes de molécules très hétérogènes chimiquement et de masse moléculaire basse. Certaines vitamines ont des structures semblables à d'autres composés organiques (i.e. vitamine C et sucres, vitamine D et hormones stéroïdes, vitamine B12 et porphyrines). Les besoins journaliers en vitamines ne sont que de quelques fractions (microgrammes à quelques milligrammes) contrairement aux autres nutriments apportés à l'organisme pour la production de l'énergie ou encore pour la synthèse d'autres composés de l'organisme (protéines, lipides, glucides). Ceci s'explique par le fait que les vitamines agissent pour la plupart comme des cofacteurs ou coenzymes pour plusieurs réactions enzymatiques. Les vitamines doivent être apportées à l'organisme en faibles quantités par l'alimentation ou par d'autres sources (par l'exposition de la peau aux rayons solaires ultra-violets pour la vitamine D, à partir de la flore microbienne intestinale pour la vitamine K ou encore la niacine qui est synthétisée à partir du tryptophane).

La nomenclature des vitamines est obtenue à partir des dénominations chimiques de leur molécule mais des notations abrégées sous forme de lettres sont également utilisées.

Les vitamines peuvent généralement être subdivisées en deux groupes selon leur solubilité (Tableau 3.1). Le groupe des vitamines hydrosolubles (vitamines du complexe B et la vitamine C, les apports excédentaires sont éliminés par l'urine et elles ne sont généralement pas stockées de façon prolongée à l'exception de la vitamine B12) et le groupe des vitamines liposolubles (rétinol, vitamine D, tocophérol et phytoménadione, absorbées en même temps que les matières grasses puis stockées).

Avant d'être impliquées dans leurs différentes fonctions (coenzymes, cofacteurs), certaines vitamines subissent des modifications mais d'autres vitamines sont actives sous leur forme naturelle (*i.e.* vitamines antioxydantes telles que les vitamines C et E) (tableau 3.1).

### 3.1 Fonctions des vitamines

Diverses fonctions de vitamines ont été déterminées suite aux études de certaines maladies métaboliques (Munnich *et al.*, 1987). Certaines pathologies disparaissent par un important apport de vitamines, il s'agit de « vitamino-dépendances ». Ceci peut être due à une déficience en activité catalytique d'une enzyme ayant pour coenzyme un dérivé d'une vitamine spécifique dont le métabolisme ou la biodisponibilité sont modifiés. Les besoins en vitamines ont été précisés suite aux études cliniques de « vitamino-déficiences ». Les vitamines sont des substances essentielles et limitantes car l'organisme est incapable d'en produire et donc un besoin ou une déficience en une vitamine peut induire une maladie métabolique (Munnich *et al.*, 1987, Huang *et al.*, 2007). Le tableau 3.1 présente diverses fonctions des vitamines et des maladies qui leurs sont liées en cas de déficience.

Les vitamines ont diverses fonctions et interviennent dans plusieurs réactions biologiques et physiologiques.

### 3.1.1 Vitamines comme effecteurs enzymatiques

Fonction coenzymatique (Ball, 2008) : beaucoup d'enzymes nécessitent la présence d'une molécule de faible poids moléculaire pour leurs activités catalytiques. Le coenzyme peut être lié de façon covalente à l'enzyme (groupement prosthétique, *i.e.* FAD) ou peut jouer le rôle de cosubstrat (*i.e.* NAD dans des réactions d'oxydoréduction, pyridoxal phosphate pour les transaminations) (Lehninger, 1982). La pyridoxine (vitamine B6) est un des exemples de vitamine fonctionnant comme coenzyme. La forme active est le pyridoxal phosphate (PLP) synthétisé par la pyridoxal kinase présente dans plusieurs tissus. Le pyridoxal phosphate agit comme cofacteur des décarboxylases et des transaminases (Friedrich, 1988). La première étape de ces réactions est la formation d'une base de Schiff entre la fonction aldéhyde du PLP et la chaîne terminale (groupement  $\epsilon$ -amine) de la lysine sur l'enzyme. Ainsi le PLP doit être présent au voisinage immédiat des sites catalytiques des enzymes impliquées dans le processus de transamination ou de décarboxylation. Le PLP fut longtemps considéré comme cofacteur de l'amine oxydase sérique (Buffoni, 1990). Il est aussi utilisé comme suppléments alimentaires (vitamine B6) par les patients souffrant de dysfonctions liées à l'histamine (Martner-Hewes *et al.*, 1986; Maintz et Novak, 2007).

### 3.1.2 Vitamines comme antioxydants

Transport de protons et d'électrons : l'acide ascorbique par exemple est un agent réducteur agissant comme antioxydant (Ball, 2008; Peel, 2006) et capable de réduire l'oxygène moléculaire et les cytochromes a et c. Il intervient dans différentes réactions telles que la synthèse du collagène, la synthèse de la noradrénaline. La vitamine C est aussi utilisée comme supplément alimentaire pour réduire les effets nocifs associés aux dysfonctions liées à l'histamine (Johnston, 1996).

Stabilisation des membranes : la vitamine E existe sous deux formes. Il s'agit de vitamines liposolubles fonctionnant comme de puissants antioxydants (Ball, 2008)

dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines plasmatiques. L'effet antioxydant se fait par réaction avec un ion peroxyde. Les besoins en vitamine E augmentent en cas d'apport de grandes quantités d'acides gras poly-insaturés car les réactions de peroxydation interviennent au niveau des doubles liaisons des acides gras.

Certaines vitamines, telles que les vitamines A et D ont des fonctions hormonales en agissant par un mécanisme similaire à celui des hormones stéroïdiennes (liaison à un récepteur cytosolique ou à un récepteur nucléaire entraînant ensuite une modification de la synthèse protéique, Reichrath *et al.*, 2007)

**Tableau 3.1 : Vitamines et leurs formes actives**

Molécules	Vitamines	Formes actives	Fonctions/Conséquences d'une carence
<b>Vitamines hydrosolubles</b>			
<b>Thiamine</b>	Vitamine B1	Thiamine diphosphate (Thiamine pyrophosphate, PP)	Cofacteur de divers enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides, dans la voie des pentoses phosphate (transcétolase), dans le cycle de Krebs (alpha-cetoglutarate deshydrogenase). Béri-Béri, Encéphalopathies de Wernicke-Korsakoff
<b>Riboflavine</b>	Vitamine B2	Flavine Mononucléotide (FMN), Flavine Adénine Dinucléotide (FAD)	Fonctions antioxydantes (FAD comme cofacteur de glutathion réductase), chaîne de transport des électrons (FAD). Lésions cutanées (stomatite, glossite, perlèche) et des muqueuses
<b>Acide pantothénique</b>	Vitamine B5*	Coenzyme A, Acyl-Carrier Protein (ACP)	Synthèse de certaines hormones, métabolisme acétyl et d'autres acyl sous forme de coenzyme A. Anomalies neurologiques, arrêt de la croissance

<b>Pyridoxine pyridoxamine pyridoxal</b>	Vitamine B6	Pyridoxal phosphate	Cofacteur enzymatique dans le métabolisme des acides aminés, amines (transamination, décarboxylation), synthèse de la vitamine B3. Polynévrites, lésions cutanées, convulsions
<b>Niacine</b>	Vitamine PP ou B3*	Nicotinamide Adénine Dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ), NAD phosphate ( $\text{NADP}^+$ )	Cofacteurs d'enzymes métaboliques Pellagre, maladie de Hartnup
<b>Acide folique</b>	Vitamine B9	Tétrahydrofolate	Synthèse des purines, pyrimidines, acides nucléiques, méthylation de l'ADN, ARN et des protéines. Anémie mégaloblastique, glossite, stomatite angulaire
<b>Cobalamine</b>	Vitamine B12	Méthylcobalamine, Adénosylcobalamine	Métabolisme des acides nucléiques, cofacteur de la méthionine synthase et de la méthylmalonyl-coA mutase. Anémie mégaloblastique, myélopathie, neuropathie
<b>Acide ascorbique</b>	Vitamine C	Acide ascorbique déhydroascorbat	Réactions d'oxydo-réduction, antioxydant, antiscorbutique, stimulations des défenses naturelles et immunitaires. Scorbut, maladie de Barlow, poly-infections, pétéchies
<b>Biotine</b>	Vitamine H ou B8		Carboxylases biotine-dépendantes, métabolisme des acides gras, glucides, acides aminés. Ataxie, alopecie, dermatite

<b>Vitamines liposolubles</b>			
<b>Rétilol</b>	Vitamine A	Rétilol (regulation de l'expression génique), rétinal (rhodopsine), acide rétinoïque	Synthèse de la rhodopsine, améliore la vision, favorise la multiplication et la division cellulaire (croissance) morphogenèse embryonnaire. Xérophtalmie, cécité, héméralopie, tératogénèse
<b>Calciférol</b>	Vitamine D	1,25-dihydroxycholécalciférol, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	Métabolisme phosphocalcique (favorise l'absorption du calcium et du phosphore). Rachitisme, ostéomalacie, hypoparathyroïdie
<b>Tocophérol</b>	Vitamine E	D-alpha-tocophérol et autres dérivés	Antioxydant Anémie hémolytique du nouveau-né, neuropathie avec ataxie
<b>Ménadione (forme synthétique) Phylloquinone Ménaquinone-n</b>	Vitamine K1	Vitamine K réduite	Carboxylation post-traductionnelle des protéines vitamine-K dépendantes (facteurs de coagulation, protéines impliquées dans le métabolisme osseux). Syndrome hémorragique du nouveau né

## CHAPITRE IV

### PRÉSENTATION DU PROJET

La stabilisation des enzymes est d'un grand intérêt en raison des diverses applications industrielles, analytiques, pharmaceutiques des enzymes. Les protéines, enzymes ou autres principes actifs peuvent perdre leur activité durant les processus d'extraction-purification ou encore pendant le stockage. Les techniques de stabilisation permettent de maintenir une activité catalytique efficace et élevée des enzymes sur de longues périodes dans les divers domaines d'application. Plusieurs procédés de stabilisation ont été développés et certains peuvent être très coûteux.

La diamine oxydase est une enzyme thérapeutique prometteuse qui, par sa fonction catalytique (inactivation de l'histamine), a été proposée récemment comme traitement pour divers types de pathologies liées à la dérégulation de l'homéostasie de l'histamine (histaminoses alimentaires) et pour améliorer les traitements existants des maladies inflammatoires de l'intestin. Or, il est important que la DAO garde une activité catalytique élevée sur une longue période, sans toutefois abîmer des tissus à cause du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. D'autre part, des contractions intestinales induites par l'histamine peuvent être douloureuses surtout quand elles sont associées à ces pathologies. La réaction catalysée par la DAO produit le peroxyde d'hydrogène qui est un agent pro-oxydant pouvant endommager les cellules et tissus (Juimarie *et al.*, 2017) et pouvant aussi réduire l'activité catalytique de l'enzyme (Pietrangeli *et al.*, 2000). La catalase a été ajoutée à la formulation afin de décomposer le peroxyde d'hydrogène (Calinescu *et al.*, 2012; Mateescu *et al.*, 2017). Nos résultats préliminaires ont montré que la catalase est une

enzyme qui est instable et rapidement inactivée par les protéases intestinales. Ainsi le peroxyde d'hydrogène produit par la DAO ne peut être décomposé et donc peut inactiver l'enzyme thérapeutique ou encore endommager les cellules.

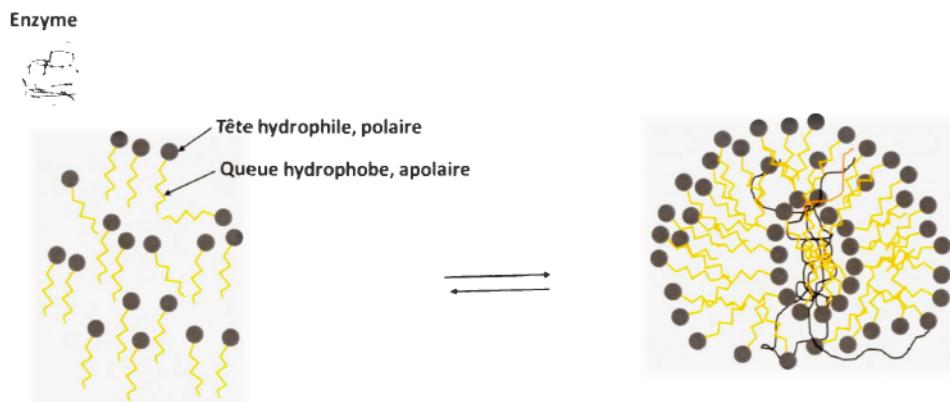
La glucose oxydase est une enzyme, qui par sa fonction d'oxydation du glucose est largement utilisée dans le domaine industriel, agro-alimentaire, analytique, pharmaceutique et médical. Toutes ces applications nécessitent des enzymes très actives et hautement stables (Matos *et al.*, 2012). Le peroxyde d'hydrogène, le produit secondaire à l'oxydation du glucose catalysée par GOx, peut inactiver l'activité de l'enzyme et donc réduire son efficacité.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de stabiliser l'activité de la diamine oxydase en l'associant avec des surfactants ou avec des antioxydants non-enzymatiques et d'augmenter ainsi son activité catalytique. Un autre objectif était de vérifier si ces procédés de stabilisation fonctionnent avec la glucose oxydase et ainsi être généralisés.

L'hypothèse du projet était que des surfactants biocompatibles peuvent interagir avec des résidus hydrophobes de certains acides aminés des enzymes, induisant une modification conformationnelle qui pourrait mieux exposer les sites actifs et ainsi facilitant l'accès du substrat et activant les enzymes. Considérant que des oxydases génèrent comme produit de réaction du peroxyde d'hydrogène et que celui-ci peut engendrer une inactivation de l'enzyme, nous avons émis l'hypothèse que des antioxydants capables de décomposer le peroxyde d'hydrogène pourraient avoir un effet stabilisant des oxydases.

Dans cette optique, des investigations analytiques et de stabilisation ont été faites en utilisant des agents émulsifiants et des vitamines aux propriétés antioxydantes. Deux techniques de stabilisation ont été envisagées :

- i. Isolement des enzymes dans des structures d'inclusions formées par les surfactants utilisés et permettant la diffusion des substrats et produits: Sodium dodécyl sulfate, polysorbat 80 (synthétiques) et la lécithine (produit naturel) offrant une protection physique aux enzymes contre le peroxyde d'hydrogène, contribuant ainsi au maintien de leur structure tridimensionnelle (Fig. 4.1).

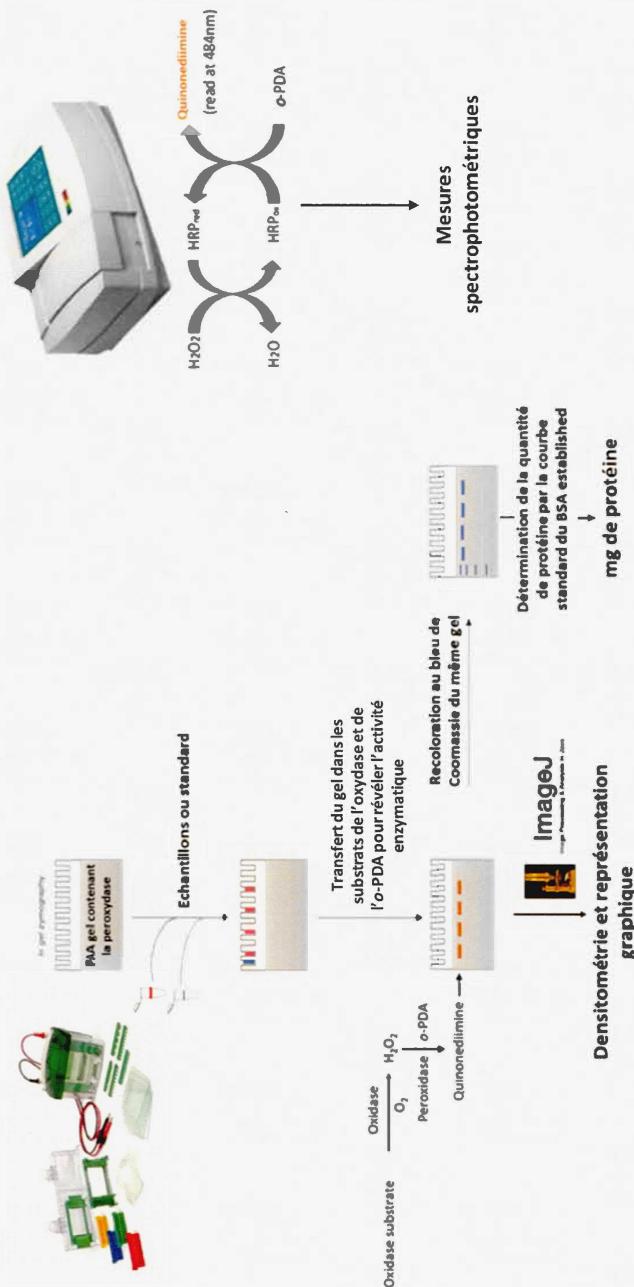


**Figure 4.1 :** Modification du microenvironnement, isolement et stabilisation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme par les surfactants.

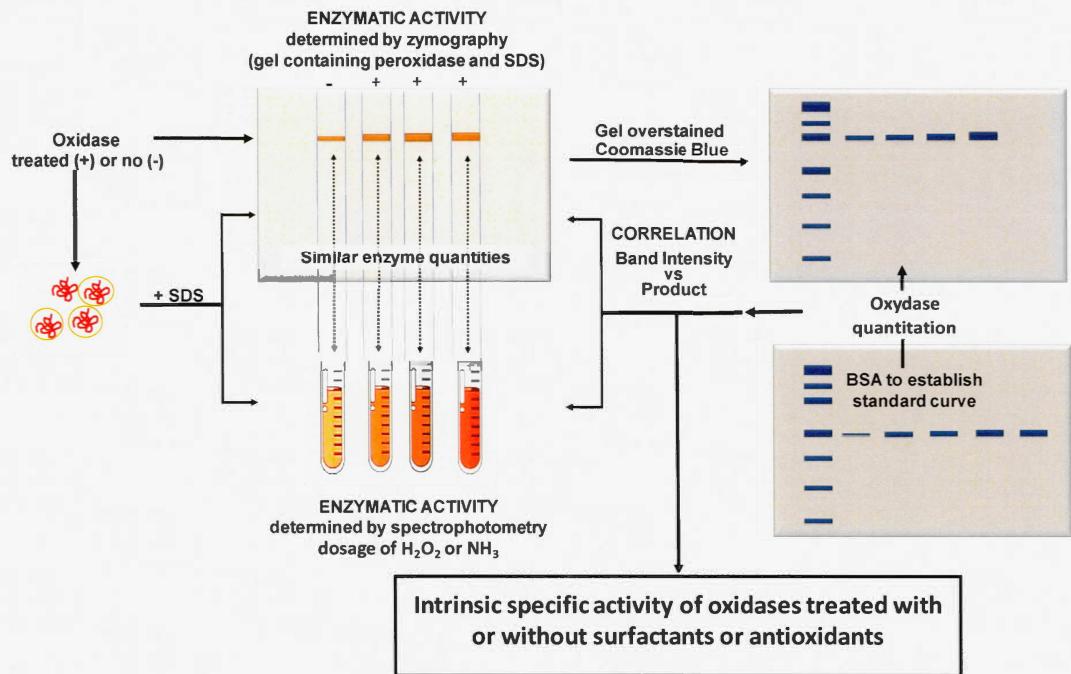
Le rôle des surfactants sur les activités des enzymes : des études précédentes avaient montré l'effet thermostabilisateur du polyvinyle alcool (PVA), un polymère synthétique avec des propriétés de surfactant neutre sur la diamine oxydase d'origine porcine (Befani *et al.*, 1989; Mondovi *et al.*, 1992). Aussi l'effet positif du SDS (2 %) sur l'activité catalytique de la DAO avait été étudié (Ahmadifar *et al.*, 2017) d'où notre choix de trois types de surfactants ayant des propriétés chimiques et physiques différentes afin de stabiliser les deux oxydases étudiées.

- ii. Protection des enzymes par le piégeage direct du peroxyde d'hydrogène par les antioxydants non-enzymatiques utilisés (pyridoxal phosphate, Trolox ou ascorbate de sodium).

**[Page manquante]**

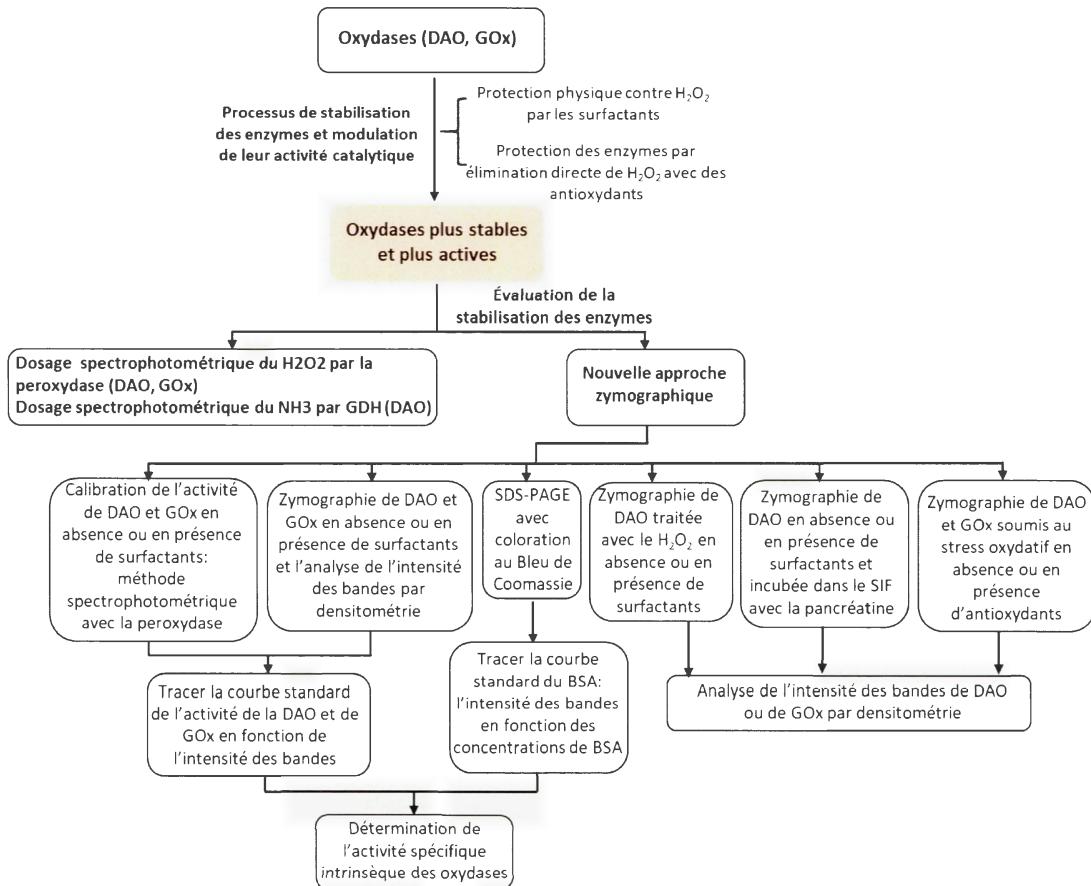


**Figure 4.2 :** Principe de la zymographie modifiée et corrélation avec les mesures par spectrophotométrie



**Figure 4.3 :** Procédure de zymographie (d'après Ahmadifar *et al.*, 2017). Cette procédure permet de déterminer l'activité oxydasique en absence ou en présence de surfactants (basée sur la détermination du peroxyde d'hydrogène produit par la DAO ou la GOx) ou des antioxydants et par le dosage spectrophotométrique du NH<sub>3</sub> par la DAO.

L'avancement du projet peut être suivi par le schéma suivant (Fig. 4.4) :



**Figure 4.4** : Présentation schématique des différents volets du projet de maîtrise

## CHAPITRE V

### STABILISATION DES ACTIVITÉS CATALYTIQUES DES OXYDASES ÉVALUÉE PAR LA ZYMOGRAPHIE. LE CAS DE LA DIAMINE OXYDASE

#### **Contribution de l'auteur principal et des co-auteurs**

Mireille D. Koudoufio: Contribution à la rédaction, préparation des protocoles, réalisation des expériences, traitement des résultats et recherche bibliographique

Tien Canh Le: élaboration du concept, supervision des expériences ainsi que l'analyse et le traitement des résultats

Lucia Marcocci: Contribution à la rédaction et la purification de la diamine oxydase

Paola Pietrangeli: Contribution à la rédaction et la purification de la diamine oxydase

Mircea Alexandru Mateescu: Direction du projet, élaboration du concept, coordination des travaux, contribution à la rédaction et la correction du manuscrit.

Mireille Djatougbévi Koudoufio<sup>1</sup>, Tien Canh Le<sup>1</sup>, Paola Pientrangeli<sup>2</sup>, Lucia Marcocci<sup>2</sup>,  
Mircea Alexandru Mateescu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Centres BioMed et Pharmaqam, Chaire de recherche en dysfonctions entériques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada

<sup>2</sup>Department of Biochemical Sciences "A Rossi-Fanelli", Sapienza University of Rome, Italy

L'une des problématiques liées à l'utilisation des enzymes pour diverses applications dans les domaines biotechnologique, pharmaceutique, analytique ou encore dans l'industrie agro-alimentaire est leur manque de stabilité et perte d'activité durant les procédés d'extraction-purification ou encore pendant le stockage. Dans ce projet, l'activité et la stabilité de deux oxydases ont été étudiées en utilisant deux conditions: (i) ajout de surfactants anionique (sodium dodecyl sulfate, sels biliaires), ampholytique (lécithine) ou neutre (tween 80) comme de possibles stabilisants pouvant offrir une protection physique contre le peroxyde d'hydrogène produit par les oxydases et (ii) élimination directe du peroxyde d'hydrogène ou des radicaux libres par des antioxydants (pyridoxal phosphate, Trolox ou l'ascorbat de sodium) protégeant ainsi l'enzyme face à l'oxydation ou l'agrégation. L'activité catalytique et la stabilité des enzymes ont été augmentées en fonction du type et des quantités de surfactants utilisés, les meilleurs résultats étant obtenus avec la lécithine. Le traitement des enzymes par les antioxydants a également augmenté leur activité catalytique dépendamment de la structure et de la capacité antioxydante des agents utilisés. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le Trolox et le pyridoxal phosphate.

## **Stabilization and modulation of oxidases enzymes: evaluation by zymographic approach**

Mireille Djatougbévi Koudoufio<sup>1</sup>, Tien Canh Le<sup>1</sup>, Paola Pientrangeli<sup>2</sup>, Lucia Marcocci<sup>2</sup>, Mircea Alexandru Mateescu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Centres CERMO-FC & Pharmaqam, Chaire de recherche en dysfonctions entériques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal H3C 3P8, Canada

<sup>2</sup>Department of Biochemical Sciences "A Rossi-Fanelli", Sapienza University of Rome, Italy P.le A. Moro 5, 00185 Rome, Italy

---

\* Corresponding author Mircea Alexandru Mateescu

Department of Chemistry, UQÀM, CP 8888, BranchA. Montreal (Québec) H3C 3P8, Canada

Phone: --1 (514) 987 4319

Fax: --1 (514) 987 4054

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

# Ce manuscrit est en voie de soumission dans "The Journal of Agriculture and Food Chemistry"  
(JAFC, ACAS)

### Abstract

One of the principal limits to the use of enzymes in biotechnology, pharmaceutical and foods industry is their insufficient stability and loss of their catalytic activity during processing. In this study, two strategies were approached to increase stability and activity of two largely used oxidases: (i) the addition of anionic, zwitterionic, neutral surfactants (sodium dodecyl sulfate, lecithin, Tween 80 or bile salts) as potential stabilizers affording physical protection to enzymes against various harsh conditions, including hydrogen peroxide (a product of catalytic activity of oxidases), and (ii) direct elimination of hydrogen peroxide by antioxidants (pyridoxal-5'-phosphate, Trolox or sodium ascorbate). Stability and activity of enzymes investigated by zymography and spectrophotometry assays were increased dependently on the chemical characteristics of surfactants used, the best results being obtained with lecithin. The investigated antioxidants were found to protect the oxidases against hydrogen peroxide and to enhance their activities. Trolox and pyridoxal-5'-phosphate induced the highest improvement of oxidase activities.

**Keywords:** Diamine oxidase, glucose oxidase, surfactants, antioxidants, enzyme stabilization, zymography.

### 5.1. Introduction

Enzymes have many applications in food, pharmaceutical, medical and analytical fields (Li *et al.*, 2012; Huisman *et al.*, 2013). Several factors such as pH, temperature and proteases can affect the stability and the activity of enzymes during the production processing, storage and handling (Peterson *et al.*, 2017). These factors constitute major limitations in various fields of enzyme applications (Takemori *et al.*, 1967; Stepankova *et al.*, 2013). Numerous strategies of stabilization are used to improve the shelf-life of the enzymes and their catalytic efficiency. Crystallization or immobilization of enzymes on natural or synthetic supports (Takemori *et al.*, 1967; Martinek *et al.*, 1977; Brennan *et al.*, 2003; Datta *et al.*, 2013; Stepankova *et al.*, 2013; Mohamad *et al.*, 2015) may afford their better stabilization. Chemical modifications for immobilization may include covalent attachments, intramolecular cross-linking, ionic complexation with polymers (Torchilin *et al.*, 1978; Wong *et al.*, 1992; Nordwald *et al.*, 2013; Stepankova *et al.*, 2013). However, although the stability of enzymes may be increased, their activity can be lowered due to their chemical modification. The addition of salts, polyols, polyelectrolytes, organic osmolytes may also contribute to increase stability of enzyme (Triantafyllou *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2001; Brennan *et al.*, 2003; Stepankova *et al.*, 2013). In addition, surfactants may influence the intrinsic properties of an enzyme modifying its micro environment without covalent modifications. The enzymes may also be microencapsulated into micelles or reversed micelles, with enhanced stability (Martinek *et al.*, 1989; Stepankova *et al.*, 2013).

Diamine oxidase (DAO, also known as histaminase) is a copper-containing enzyme (EC 1.4.3.22) of microbial (Cooper *et al.*, 1992), vegetal (Scoccianti *et al.*, 1990; McGuirl *et al.*, 1994; Pietrangeli *et al.*, 2007) or animal (Mondovi *et al.*, 1967) origin. Localized mainly in kidney, placenta, intestinal mucosa, DAO is involved in the oxidative deamination of various endogenous or exogenous polyamines and biogenic amines, in particular histamine, originating from decarboxylation of histidine by

histidine decarboxylase (Mateescu *et al.*, 2017). Histamine is widely distributed and involved in different important biological processes (regulation of gastric acidity, activity of smooth muscles, neurotransmission, inflammatory and immunological reactions, Mateescu *et al.*, 2017). Apart of its endogenous origin, exogeneous histamine may be introduced in organism by diet (foods particularly rich in histamine are scombroid fishes, sauerkraut, fermented dairy products, some fruits or vegetables) and certain foods or drugs may induce histamine realising. It is also an important mediator in allergic response and a possible ethiopathological agent of enteric dysfunctions such as food allergies, gastric ulcers, inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis (Mateescu *et al.*, 2017). Due to its capacity to catabolize histamine, DAO is considered also a promising therapeutic enzyme and recently, a novel approach was proposed to treat histamine-related dysfunctions with DAO extracted from a vegetal source (Mondovi *et al.*, 2013; Mateescu *et al.*, 2017; Mateescu *et al.*, 2018). Currently, pig-kidney DAO food integrators are commercialized (capsules) on the market under the name of DAOSiN® and G.I. Hist Support™ as dietary supplements to prevent food intolerance provoked by histamine intake.

Glucose oxidase (GOx) is a FAD enzyme (EC 1.1.3.4) that catalyzes the oxidation of glucose into gluconolactone. It is considered as the basis of many analytical and industrial applications particularly for glucose assays in biological samples (*e.g.* in blood for diabetes), in food and beverage and to monitor biotechnological processes involving glucose consumption or production. It is used as additive to improve foodstuffs preservation by oxygen removal (Wong *et al.*, 2008).

Both DAO and GOx, as well as other oxidases, generate hydrogen peroxide as product of their catalytic activity. Although H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not a free radical, it is a strong pro-oxidant and in the presence of metal, it may produce highly toxic hydroxyl free radicals (·OH) and initiate oxidative damages to tissue and cell structures (Jumarie *et al.*, 2017). It was also found that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may decrease the activity of enzymes by oxidation of amino acid residues (Pietrangeli *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2003). Thus, DAO orally administered to

reduce the level of exogenous histamine is susceptible to be degraded by the produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and also by the pancreatic proteases in the intestinal tract, justifying the interest to associate stabilizers and activity enhancers. Protection of enzymes by surfactants or by neutralization of hydrogen peroxide using antioxidants seems appropriate to preserve the enzyme activity and prolong their life-time. The main objective of this report was to evaluate the stability and the activity of diamine oxidase (DAO) and of glucose oxidase in presence of surfactants such as polysorbate sorbitan (Tween 80), sodium dodecyl sulfate (SDS), bile salts (BS) and lecithin or of antioxidants as sodium ascorbate, pyridoxal-5'-phosphate and Trolox. Since the presence of antioxidants disturbs current dosages based on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection, the determination of enzyme activities was carried out electrophoretically by a zymographic procedure proposed for the assay of various oxidases (Ahmadifar *et al.*, 2017; Le Tien *et al.*, 2018). Its principle is based on a coupled reaction with peroxidase included in SDS polyacrylamide gel used for the electrophoretical assay of DAO and GOx enzymes. After zymographic electrophoresis run, polyacrylamide (PAA) gels may be incubated in developing solution containing substrate of oxidase (putrescine for DAO or glucose for GOx) and a chromogenic substrate of peroxidase (*o*-phenylenediamine) to obtain coloured stained bands on gels in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced *in-situ* by the corresponding oxidation reaction (Calinescu *et al.*, 2009; Ahmadifar *et al.*, 2017; Le Tien *et al.*, 2018).

## 5.2. Materials and Methods

### 5.2.1. Materials

Diamine oxidase from *Lathyrus sativus* was purified as described by Jumarie *et al.*, 2017 and present a specific activity of 12.25 U DAO/mg of solid. Glucose oxidase (*Aspergillus niger*, 26.82 U/mg solid), horseradish peroxidase (HRP type I, 52 U/mg solid), pancreatin (from porcine pancreas, 4X), pepsin (from porcine gastric mucosa, 882 units/ mg protein), putrescine (1,4-diaminobutane dihydrochloride), β-D-glucose, sodium ascorbate, pyridoxal-5'-phosphate monohydrate, 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), bile extract porcine, Tween 80,

*ortho*-phenylene diamine (*o*-PDA) dihydrochloride, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), the Ammonia assay kit and Bradford reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acrylamide, N,N'-methylene-bis acrylamide and protein weight standard (Broad range) were from Bio-Rad (Richmond, VA, USA). The reagents were chemical grade and used as received without further purification.

**Table 5.1.** Composition and characteristics of buffers (mM) used in this study

Composition	50 mM potassium phosphate buffer pH 7.2 (PB)	50 mM acetate buffer, pH 5.1	Simulated Gastric Fluid, pH 1.2 (SGF) supplemented with pepsin	Simulated Intestinal Fluid, pH 6.8 (SIF) supplemented with pancreatin
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	46.7			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.3			50.0
NaCH <sub>3</sub> COO		50.0		
NaOH				13.2
NaCl			34.2	
HCl			50.7	
Pepsin			0.32 %	
Pancreatin				1 %
pH	7.2	5.1	1.2	6.8

## 5.2.2. Methods

### 5.2.2.1. Treatment of DAO/GOx with different surfactant agents

#### Treatment with surfactants

Enzyme samples containing i) no surfactants agents (control); ii) SDS 2 % (w/v); iii) polysorbate 2 % (w/v); iv) lecithin 0.1 % (w/v), were prepared and the activities of DAO and of GOx in presence or in absence of surfactants were determined by spectrophotometry and by zymography.

There is a growing interest on orally administered DAO enzyme for treatment of various intestinal dysfunctions (Calinescu *et al.*, 2012; Mondovi *et al.*, 2013; Mateescu

*et al.*, 2017; Mateescu *et al.*, 2018). For these reasons, this investigation was continued on the stability of this enzyme in simulated gastric and intestinal fluids and in the presence of denaturating hydrogen peroxide produced by oxidase reaction.

#### The effect of surfactants on the enzyme activity in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

To determine the effect of surfactants on DAO against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enzyme samples were incubated in hydrogen peroxide at different concentrations (0.03 % and 0.06 %) during 1 hour. Enzyme contained: i) no surfactant (negative control); ii) no surfactant + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (positive control); iii) SDS 2 % (w/v) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; iv) Tween 2 % (w/v) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, v) lecithin 0.1 % (w/v) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After 1h incubation at 37 °C, activity of DAO was assayed by zymography.

#### Protective effect of surfactants in simulated gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluids

The simulated gastric fluid (SGF) was prepared following the USP 24 & NF 19 method (Tab. 5.1). The SGF, pH 1.2, was then supplemented with pepsin (0.32 %). The simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8) was obtained following the USP 24 method (Tab. 5.1). It was supplemented with 1 % pancreatin (a commercial pancreatic preparation containing hydrolytic enzymes including trypsin and chymotrypsin proteases). DAO samples in buffer or in buffer containing surfactants were incubated in SGF (with 0.032 % of pepsin following USP recommendations) for 5 min or for 1 h at 37°C. Separately, samples were incubated in SIF (with pancreatin) for 2, 6, 24 h at 37 °C and the retained activity of enzyme was assayed by zymography. The enzyme activity of negative control (no agents, only buffer) were considerate as 100 %.

##### 5.2.2.2 Treatment of DAO/GOx with antioxidant bioactive agents

Enzyme samples were treated with different antioxidants, at concentrations of 0.2, 0.5, 1 mM for PLP; 0.01, 0.03, 0.06 mM for Trolox and 0.2, 0.5, 1 mM for Sodium

ascorbate. The enzyme activities were determined by zymography and by spectrophotometry (ammonia kit assay for DAO).

### 5.2.2.3. Determination of DAO and of GOx enzymatic activities

#### 5.2.2.3.1 Spectrophotometric assays of enzyme activities

##### Quantitation based on the released H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

The amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by DAO or by GOx were quantified by a horseradish peroxidase-coupled reaction.

For DAO assay, the determination medium was prepared as follows: 640 µL of 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.2 (PB) were mixed with 10 µL of horseradish peroxidase (HRP solution 0.1 mg/mL, 5.2 U mL<sup>-1</sup>), 50 µL of 30 mM *o*-PDA (prepared in PB) as chromogenic substrate of peroxidase and 200 µL of 30 mM putrescine (in PB) as substrate of DAO.

For GOx activity, the assay mixture contained 640 µL of 100 mM acetate buffer pH 5.5, 10 µL HRP (0.1 mg/mL, 5.2 U mL<sup>-1</sup> in the same acetate buffer), 50 µL of 30 mM *o*-PDA (in 50 mM acetate buffer pH 5.5) as substrate of peroxidase and 200 µL of 30 mM glucose (in 50 mM acetate buffer pH 5.5) as substrate of GOx.

For each determination, the assay mixtures were pre-incubated for 5 min at 37 °C. Then, a volume of 100 µL of DAO or of GOx solutions at different concentrations, treated or not with surfactants were added to start the reaction, followed for 5 min, at 37 °C. The assay reactions were then stopped by adding 100 µL of 4 M HCl and the Optical Density (OD) related to the formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was read at 484 nm using an Ocean Optic© fiber optic spectrometer.

The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by the catalytic activity of DAO or of GOx was evaluated referring to standard curves obtained under same experimental conditions with serial concentrations of commercial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> up to 20 µM final concentration.

One enzyme unit of DAO or of GOx was considered as the amount of enzymes that causes the generation of 1.0 µmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per minute.

The current measurement of an oxidase enzymatic activity via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is susceptible of interferences in presence of antioxidants. To avoid this, we have determinate the DAO activity by measuring the NH<sub>3</sub> (the other product of oxidative deamination of amines by DAO).

#### Quantitation based on the released NH<sub>3</sub>

The NH<sub>3</sub> assay with the Ammonia kit (Sigma-Aldrich) was done, as indicated by the manufacturer, following the oxidation of NADPH in a coupled reaction in which NH<sub>3</sub>-released from deamination of putrescine by DAO reacts with alpha-ketoglutaric acid (KGA) under the catalysis of L-glutamate dehydrogenase (GDH), to form oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP<sup>+</sup>).

Briefly, to 1 mL of ammonia assay reagent (containing 3.4 mM KGA and 0.23 mM NADPH), 200 µL of 30 mM putrescine (prepared in PB) and 10 µL of GDH (enzyme reagent) were added and incubated for 5 min at 37 °C. Then, 100 µL of DAO in presence or not of antioxidants were added and the rate of decrease of absorbency (ΔA/min) was followed at 340 nm for 10 min. For DAO samples containing antioxidants, the rate of NADPH oxidation due to the antioxidants alone was subtracted from the rate of NADPH oxidation due to the enzymatic release of NH<sub>3</sub> and to the antioxidants.

One enzyme unit of DAO was considered as the amount of enzyme that causes the oxidation of 1.0  $\mu\text{mol}$  of putrescine (NADPH) per minute at pH 7.2 and 37 °C.

The influence of surfactants or antioxidants on the activity of enzymes was monitored by spectrophotometry and by zymography procedures.

#### 5.2.2.3.2. Determination of DAO and GOx enzyme activities by zymography

Enzyme activities were also determined by zymography using entrapped peroxidase in SDS-PAA gels, as described by Ahmadifar *et al.*, 2017 and by Le Tien *et al.*, 2018.

##### Entrapment of peroxidase in SDS-PAA gel for zymography

The running 10 % SDS-PAA gel forming solution for peroxidase entrapment contained: 1 mL of HRP (1 mg/mL), 1.7 mL of 30 % acrylamide/bis-acrylamide (29:1), 1.3 mL of Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 50  $\mu\text{L}$  of 10 % SDS, 10  $\mu\text{L}$  of TEMED and 1 mL of distilled water (Ahmadifar *et al.*, 2017). The polymerization was initiated with 50  $\mu\text{L}$  of 10 % ammonium persulfate (APS).

The stacking gel (not containing peroxidase) was prepared by mixing 500  $\mu\text{L}$  of 30 % acrylamide/bis-acrylamide (29:1), 380  $\mu\text{L}$  of Tris-HCl 1 M (pH 6.8), 30  $\mu\text{L}$  of 10 % SDS, 2.1 mL of distilled water, 3  $\mu\text{L}$  of TEMED and 30  $\mu\text{L}$  of 10 % ammonium persulfate solution (APS) for a total volume of 3 mL of stacking gel buffer (Ahmadifar *et al.*, 2017).

##### Electrophoresis run

The gel were then loaded with 10  $\mu\text{L}$  of molecular weight standard (Broad Range) or with 20  $\mu\text{L}$  of solutions containing 1 volume of DAO (0.2 mg/mL, 200  $\mu\text{g}$  of extract) or of GOx (0.2 mg/mL) with or without surfactants or antioxidants and 1 volume of

SDS loading buffer (prepared with 5.3 mL distilled water, 1.7 mL Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2 mL 10 % SDS and 1 mL glycerol). The electrophoresis was then run using a Mini-Protean (Bio-Rad) device for 2 h at room temperature at 120 V, with electrophoresis running buffer (0.025 M Tris base, 0.192 M glycine and 0.1 % SDS) prepared by dissolving 3.0 g of Tris base, 14.4 g of glycine, and 1 g of SDS in 800 mL of distilled water; adjust the pH at 8.8 and complete to 1 L.

Quantitation of DAO and of GOx enzymatic activity on polyacrylamide zymography gels

At the end of the electrophoresis run, the gels were transferred in a solution of methanol:water (1:1 v/v) for 5 min, then rinsed with distilled water and incubated 5 min in dark at 25 °C under mild agitation with the developing solution (to reveal the enzyme activities). The developing solution contained 30 mM enzyme substrate (putrescine in PB or β-D glucose in 50 mM acetate buffer) and 30 mM of the peroxidase substrate, *o*-PDA (in PB, pH 7.2). The DAO or GOx activities were measured by densitometric analysis of bands of each sample (treated or not with surfactants or antioxidants). The gels were then scanned and the densities of the bands were evaluated by the imageJ software (Win64, version 1.47, National Institutes of Health, USA), considering as blank, a sector of the gel with no bands. This value was subtracted from the values of DAO or GOx bands in order to correct the results by elimination of the background noise in zymographic analysis. The activities of treated DAO or GOx were expressed in enzymatic unit (EU) and also in percentages reported to not-treated (control) enzyme samples considered as standard (100 %). The same gel was then restained with Coomassie brilliant blue G-250 for 1 hour under mild-agitation for the electrophoretic pattern (quantitation and molecular weights) and purity of enzymes.

The enzymatic activity of each sample on zymography was calculated by referring to standard, spectrophotometric method, as reported (Ahmadifar *et al.*, 2017). Thus, densitometric intensities of zymography were converted into DAO enzyme units by

correlation of DAO bands intensities with the concentration of hydrogen peroxide obtained by spectrophotometry (described in section 5.2.2.3.1) with the same concentrations of DAO, following Le Tien *et al.*, 2018. A standard curve of densitometric intensities versus concentrations of hydrogen peroxide (not shown) allowed the determination of catalytic activity of DAO and of GOx with or without modulators of enzyme activities (Ahmadifar *et al.*, 2017).

Protein concentrations were determined by plotting densitometric intensities of DAO or of GOx bands (of zymographic gels restained with blue brilliant Coomassie) on a standard calibration curve obtained with serial concentrations BSA run on SDS-PAA gel 10 % under the same electrophoretic conditions. For samples containing surfactant or antioxidant agents, BSA should be added with the corresponding concentration of agents.

#### 5.2.2.4. Statistical analysis

The data were presented as mean  $\pm$  Standard Devitaion (SD) and analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Graph Pad Prism software version 7.00 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA) was used. Significant differences ( $p < 0.05$ ) between the mean values of the triplicate samples were determined for various assays.

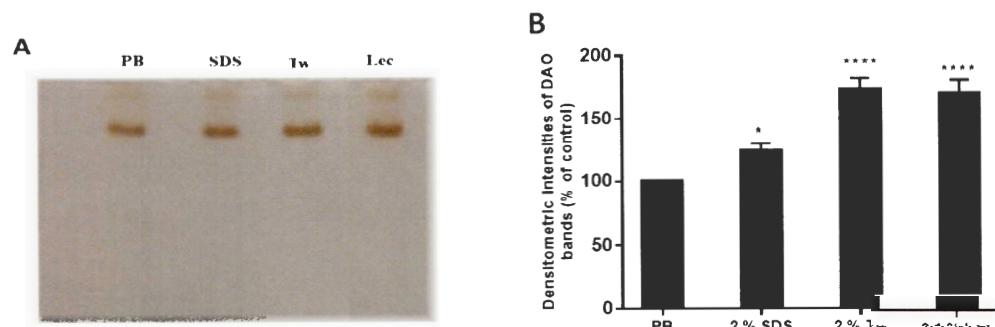
### 5.3. Results and Discussion

Enzyme stabilization by surfactants has many advantages and may be useful for industrial and food applications. Such stabilization processes were shown by surfactant-protein interactions following models of biological membranes based on proteins stabilized by phospholipids (Helenius et Simons, 1975; Jones, 1975).

### 5.3.1 Effect of surfactants on diamine oxidase activity

Several characteristics such as ionic charges and degree of hydrophobicity of surfactants can affect their ability to stabilize enzyme. Most of surfactants are amphiphilic (with polar head and non-polar hydrophobic tail, both of them able to interact with proteins, Moosavi-Mohavedi, 2005).

The influence of various concentrations of surfactants on DAO activity were assayed retaining those giving the best enhancement of enzyme activity. The effect of surfactants on activity of DAO was revealed by analysis of band intensities of DAO on zymography gels (Fig. 5.1 A). Optimal retained concentrations: 2 % for both SDS and Tween 80 and 0.1 % lecithin were found to induce and increase of 1.2 to 1.7 times of DAO activity (Fig. 5.1). The increase of DAO activity was significantly higher with neutral (Tween 80) and zwitterionic (lecithin) surfactants in comparison with negatively charged surfactant (SDS and bile salts). At surfactant concentrations higher than optimal, a slight decrease in activity of DAO was observed, probably due to a conformational alteration of enzyme generated by the surfactant-protein interactions.



**Figure 5.1.** Effect of surfactants on diamine oxidase activity evidenced by Zymography (A) on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel with entrapped-peroxidase and graphical representation (B) of surfactant effect from the densitometric intensities (%) of DAO (gel A), considering the activity of DAO bands in the absence of surfactants as 100 %. Samples of 0.2 mg/ml of DAO were treated with surfactants (2 % SDS, 2 % Tween, 0.1 % Lecithin) or not (50 mM PB). Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different

experiments, with significance showed as \*P<0.05 compared with the control sample and \*\*\*P<0.0001 compared with the control sample (PB).

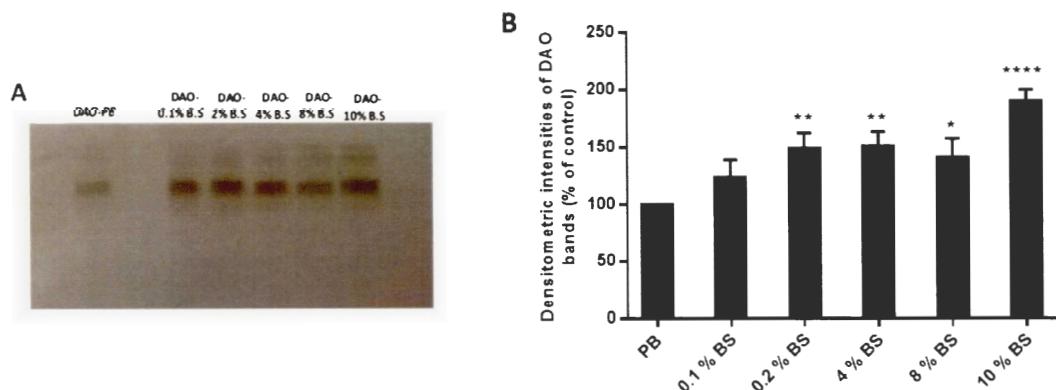
Similar results were obtained by using the spectrometrical method, in presence of different surfactants, activity of DAO was enhanced for 1.5 – 1.8 times. Densitometric intensities of zymography (Fig 5.1) were then converted into DAO enzyme units (Table 5.2) by correlation of DAO bands intensities with the concentration of hydrogen peroxide (Table 5.2) obtained by spectrophotometry with the same concentrations of DAO as described by Le Tien *et al.*, 2018. Protein concentrations were determined by plotting densitometric intensities of DAO bands (obtained by image analysis of zymography gel, fig. 5.1A) on a standard calibration curve obtained with BSA at serial concentrations run under the same electrophoretic conditions. For samples containing surfactant agents, BSA was added with the corresponding concentration of agents and a quantity of 2.4 µg of protein was obtained.

**Table 5.2.** Intrinsic specific activity (ISA) of diamine oxidase untreated (100 %) or treated with surfactants (following Le Tien *et al.*, 2018). Results are presented as mean values ± SD (n = 3).

Samples	µmole H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min	Enzyme activity (% of control)
<b>DAO in PB</b>	<b>4.47 ± 0,56</b>	<b>100</b>
<b>DAO in 2 % SDS</b>	<b>7.12 ± 0.53</b>	<b>159.32 ± 8.32</b>
<b>DAO in 2 % Tween</b>	<b>7.72 ± 0.35</b>	<b>178.42 ± 3.46</b>
<b>DAO in 0.1 % Lecithin</b>	<b>7.97 ± 0.15</b>	<b>172.83 ± 5.15</b>

DAO was stabilized by surfactants used in the present experiment and its activity was markedly improved, particularly with Tween and Lecithin. According to their structure, surfactants can be ionic (anionic, cationic), zwitterionic or non-ionic. The SDS is classified as an anionic surfactant and tend to be harsh and denaturing agent due to its

ability to disrupt intra and inter molecular protein-protein interaction. With SDS (5 % - 10 %), enzyme denaturation is fast but at low concentrations, SDS may induce the compaction and activation of proteins as reported (Zardeneta and Horowitz, 1994; Moosavi-Mohavedi, 2005). In our conditions, the DAO activity was improved with low and medium SDS concentrations. Bile salts are also ionic surfactants (milder than SDS, Seddon *et al.*, 2004). They also exert an activation of DAO (Fig. 5.2). This aspect seems important considering the presence of bile salts in intestinal lumen and fits well with data of Tchoumi *et al.*, 2018 showing in simulated intestinal fluid (SIF) a protection of DAO afforded by cholic acid.

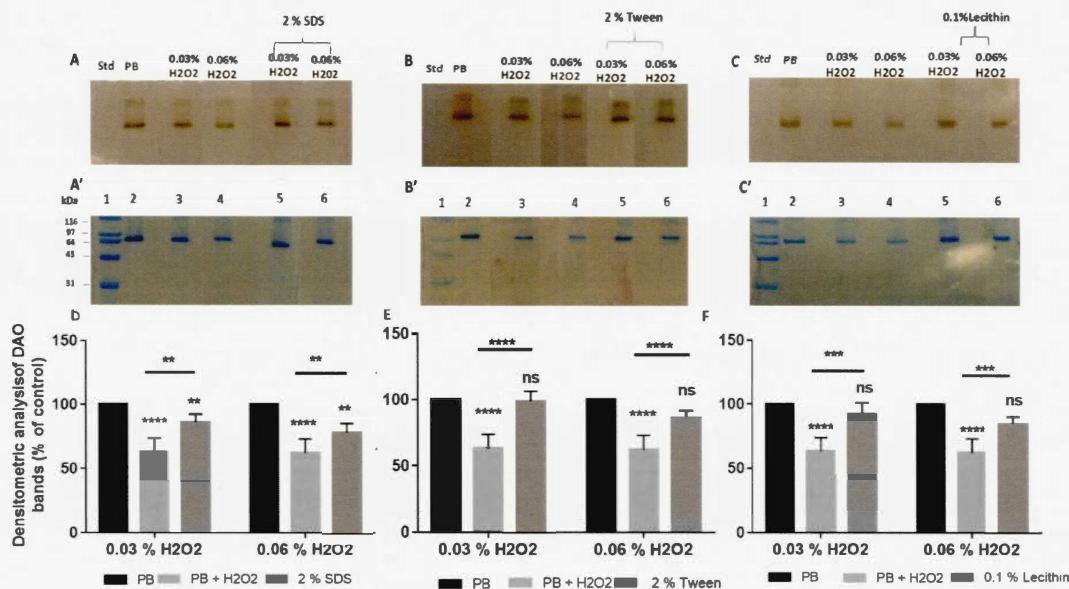


**Figure 5.2.** Effect of Bile salts on DAO activity evidenced by Zymography (A) on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel with entrapped-peroxidase and graphical representation (B) of Bile salts effect from the densitometric intensities (%) of DAO (gel A), considering the activity of DAO bands in the absence of Bile salts as 100 %. Samples of 0.1 mg/ml of DAO were treated with bile salts (0.1 %, 2 %, 4 %, 8 %, 10 %) or not (50 mM PB). Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different experiments, with significance showed as \*P<0.05, \*\*P = 0.025 and \*\*\*\*P<0.0001 compared with the control sample (50 mM PB) and no significance with 0.1 % BS.

Lecithin (classified as zwitterionic surfactant) is electrically neutral but has the ability to interfere in protein-protein interactions and contributes to a certain stability against denaturating factors. Lecithin afforded more protection to DAO enzyme and increased its activity more than SDS (Figs. 5.1 and 5.2) but at much lower concentration. Activity of DAO was also improved when treated with Tween (Fig. 5.1). As a non-ionic

surfactant, Tween is a mild and non denaturating agent. The size of alkyl chains (hydrophobic tail) can affect chemical properties and the effect of surfactants. Increasing hydrophobic tail induces a higher aggregation capacity and a good ability to stabilize enzymes (Rosen, 2004) as obtained with lecithin. Compared with the other surfactants used, lecithin has the longest hydrophobic tail, explaining the lower optimal concentration (0.1% versus 2% for SDS and Tween). This low optimal concentration shows the efficiency of lecithin as tensioactive agent which is probably due to its low HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) value. This may explain a high packing parameter (which increases with decreasing HLB, Umbreit and Strominger, 1973; Krugliakov, 2000) and the low CMC (Critical Micellar Concentration) that is the concentration of surfactants above which monomers self-assemble into micelles (Rosen, 2004). With smaller quantities of lecithin (low solubility in water and low HLB = 8), there is a rapid micellization with optimal enzyme micro-encapsulation. The SDS has the highest HLB value (40, readily soluble in water) due to the ionic groups explaining the 2 % as optimal concentration to entrap and thus protect the enzyme into micelles, similar to optimal concentration of Tween (with HLB = 15, a non-ionic and mild surfactant).

Hydrogen peroxide, a prooxidant, may have a damaging effect on proteins in solutions via oxidation of amino acids residues (Cheng et al., 2016). This process may have a major impact in the stability of oxidases that produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It was previously shown by Pietrangeli *et al.*, 2000 that the activity of DAO is decreased when enzyme is incubated in hydrogen peroxide and this effect is now evidenced by zymography (Fig. 5.3, lanes 3 and 4). Enzyme loses 25 % of its activity when incubated in 0.03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In contrast, no major loss of DAO enzymatic activity was noticed due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when treated with 0.1% Lecithin or 2 % Tween (Fig. 5.3, lanes 5 and 6) and only a loss of 12 % in activity was observed in the presence of 2 % SDS.



**Figure 5.3.** Protective effect of surfactants on DAO activity against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zymography (A, B, C) with Coomassie staining (A', B', C') of 0.2 mg/ml of diamine oxidase incubated in hydrogen peroxide (0.03 % and 0.06 %) during 1h after treatment with surfactants (2 % SDS, 0.1 % Lecithin, 2 % Tween) or with 50 mM PB, pH 7.2 (control) on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel. Graphical representation (D, E, F) of DAO treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with or without (100 %) surfactants. Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different experiments, with significance showed as \*\*P = 0.0029 and \*\*\*P<0.0001 compared with the control sample (50 mM PB).

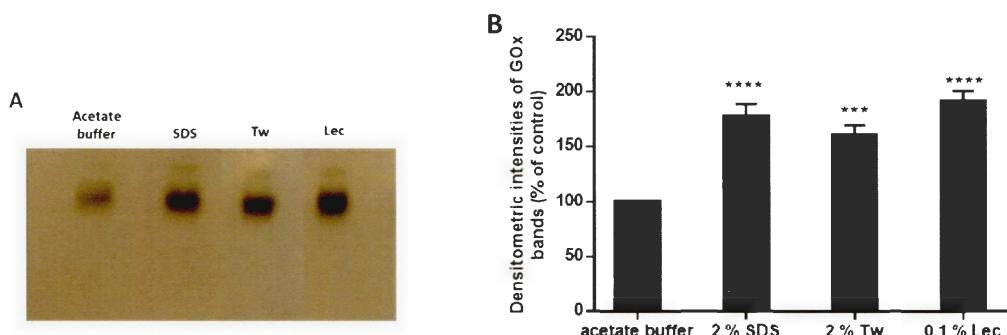
It is of interest to note that even Coomassie restaining (Fig. 5.3 A', B', C') showed a decrease amount of DAO exposed to 0.03 % and 0.06 % of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence of protective surfactants (lanes 3, 4), whereas the intensities of bands of DAO under surfactants protection (lanes 5, 6) were similar to that of control (lane 1).

The oxidative deamination of histamine catalyzed by DAO and oxidation of glucose catalyzed by GOx produce hydrogen peroxide which may decrease or inactivate the enzyme activity (Pietrangeli *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2003). Surfactants protect oxidases against produced hydrogen peroxide by a kind of micro-entrapment of enzyme in structures formed with the tensioactive agents. Similar result was obtained with glucose

oxidase (GOx) when treated with surfactants (Fig. 5.4). Best protection was found with zwitterionic and non-ionic surfactants, lecithin and Tween followed by SDS.

### 3.2. Effect of surfactants on GOx activity

As for DAO, in the case of GOx, an enhancement of catalytic activity was obtained when GOx was treated with surfactants (Fig. 5.4). The GOx activity was enhanced 1.9 times with lecithin, 1.8 times when treated with 2 % SDS and 1.6 times with Tween (Fig. 5.4.B). Previous studies reported a similar increase of stability and of GOx activity induced by SDS (Matos *et al.*, 2012). Some differences in activity improvement by each surfactant on DAO and GOx may be explained by different percentages of various charged or uncharged amino acids residues, in each enzyme.



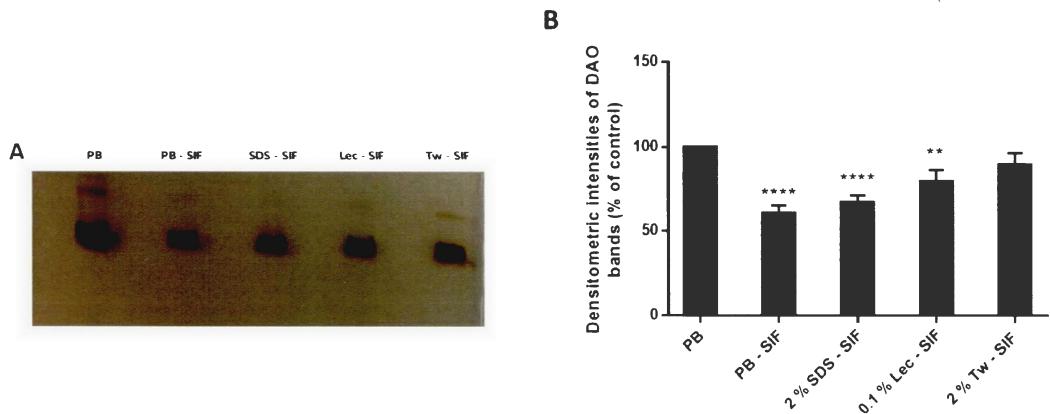
**Figure 5.4.** Effect of surfactants on glucose oxidase activity evidenced by Zymography (A) and graphical representation (B) of densitometric intensities (%) of bands of GOx with or without surfactants. Samples of 0.2 mg/ml of glucose oxidase were treated with surfactants (2 % SDS, 0.1 % Lecithin, 2 % Tween) or with 50 mM acetate buffer, pH 5.2 (control) on SDS-Polyacrylamide (10%) gel. Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different experiments, with significance showed as \*\*\*P = 0.0001 and \*\*\*\*P < 0.0001 compared with the control sample (50 mM acetate buffer).

It appears that the used surfactants may create a kind of micro-encapsulation, stabilizing the DAO or GOx enzyme but still allowing diffusion of substrate inside and product outside the enzyme environment. This modified micro-environment may offer

a physical stabilization of enzyme conformation with the effect of enzyme activation. In addition to micellar concentration, surfactants may interact directly with various functional group or non-polar region of the enzymes. Lecithin (zwitterionic surfactant) may interact with positively, negatively or uncharged amino acids residues in enzymes whereas neutral Tween may interact with non-polar segments of the enzymes. Both were found to improve the enzymatic activities of DAO and of GOx (Fig. 5.1 and 5.4) with Lecithin as the most efficient enzyme activity enhancer. A stabilization was also observed with bile salts that also enhance enzyme activity (Fig. 5.2). These interactions between enzymes and emulsifiers may stabilize enzymes and prevent hydrogen peroxide-induced protein damages.

### 3.3. Stability of DAO treated with surfactants in SGF and SIF

DAO was previously formulated together with catalase using the carboxy-methyl starch excipient for gastric protection and intestinal delivery (Calinescu *et al.*, 2012). DAO is not stable in acidic SGF (Simulated Gastric Fluid, pH 1.2) and the same result was observed in presence of surfactants (no protection of DAO in SGF by surfactants, Fig. S5.1). Even if DAO is more stable in simulated intestinal fluids (SIF) when incubated in SIF for 6 h, a decrease of activity was found, due to digestive enzymes (pancreatin containing trypsin and chymotrypsin). Differently, when the enzyme was treated with surfactants prior to incubation in SIF, a protection of enzyme was noticed (Fig. 5.5) significantly with lecithin and Tween, showing that surfactants may offer a certain physical protection of enzyme against intestinal proteases.



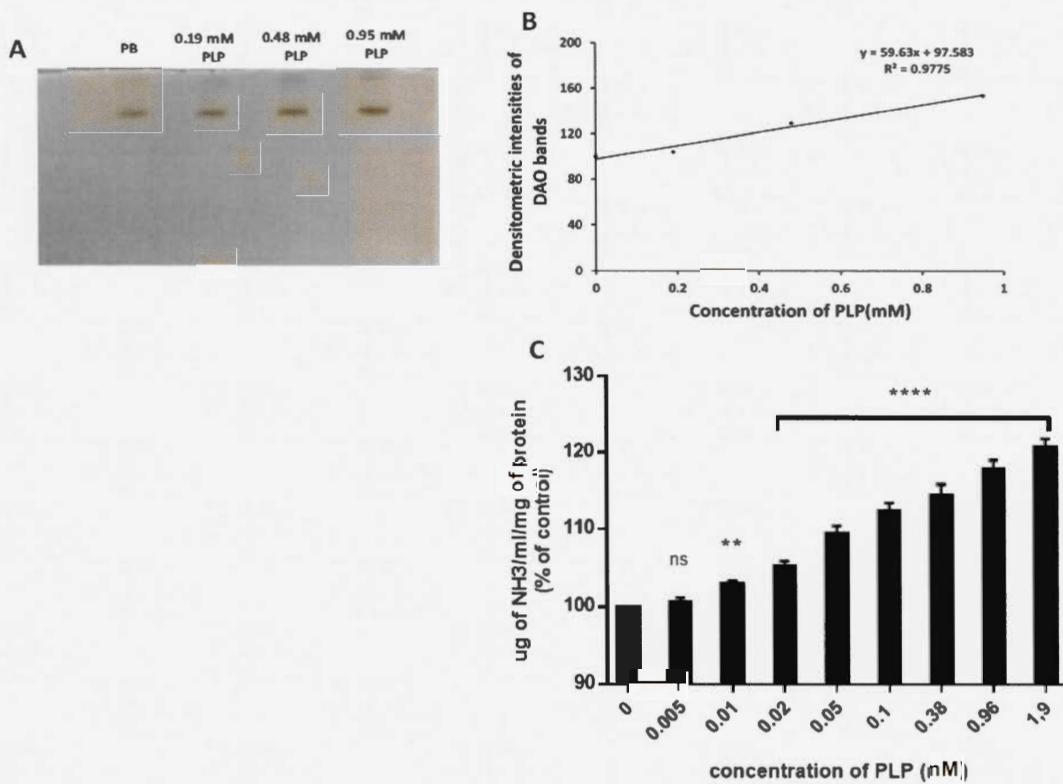
**Figure 5.5:** Protective effect of surfactants on DAO in SIF with pancreatin. Zymography (A) of 0.2 mg/ml of diamine oxidase incubated in SIF (with pancreatin) during 6h, 37°C after treatment with surfactants (2 % SDS, 0.1 % Lecithin, 2 % Tween) or with PB, pH 7.4 (control, 100 %) on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel and (B) graphical representation of densitometric bands of DAO treatment with SIF, with or without surfactants. Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different experiments, with significance showed as \*\*P = 0.0039 and \*\*\*\*P<0.0001 compared with the control sample (50 mM PB).

### 3.4. Effect of antioxidants on Diamine oxidase activity

Treatment of DAO with different antioxidants generated an improvement of the enzyme activity, depending of the antioxidant scavenging capacity and on its chemical nature (Fig. 5.6 – 5.8). DAO was treated with increasing concentrations of various antioxidants and a corresponding enhancement of activity measured by zymography and by spectrometrical assay based on NH<sub>3</sub> (instead H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) because the antioxidant, acting on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, will interfere with the dosage based on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. An optimal antioxidant concentration was retained to markedly improve the enzyme activity. These retained concentrations were: 0.5 mM PLP, 0.074 mM Trolox and 1 mM Sodium ascorbate (final concentrations).

Treatment with pyridoxal phosphate (PLP) induced an improvement of DAO activity of 1.5 times (Fig. 5.6 B) with the highest concentration of PLP (1 mM). The same result was observed when the ammonia by-product was assayed using ammonia kit assay for

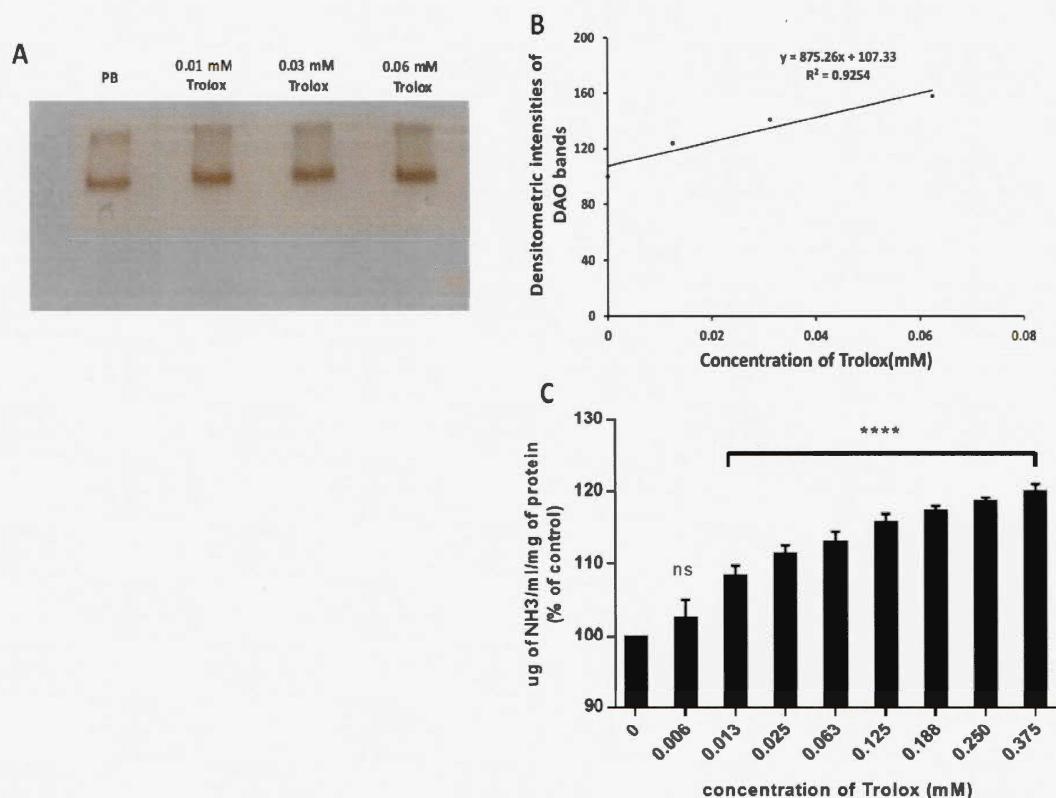
spectrophotometrical determination of the enzyme activity (Fig. 5.6 C). This kit is for the quantitative, enzymatic determination with L-glutamate dehydrogenase (GDH) of ammonia in food and in biological samples. Ammonia reacts with  $\alpha$ -ketoglutaric acid (KGA) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) under catalysis of L-glutamate dehydrogenase (GDH) to form L-glutamate and oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\text{NADP}^+$ ). The reaction rate was followed by measurement of the decrease in absorbance at 340 nm, due to the oxidation of NADPH which is proportional to the ammonia concentration. L-Glutamate dehydrogenase reacts specifically with ammonia released by deamination of putrescine by DAO).



**Figure 5.6.** The effect of PLP on DAO activity showed in Zymography (A) of 0.2 mg/ml DAO samples untreated (DAO in PB with 0 mM PLP) or treated with different concentration of PLP, on SDS-Polyacrylamide (10%) gel. Densitometric intensities of DAO bands (gel A) with intensities of bands at different antioxidant concentrations (B)

and DAO activity in presence of several concentration of PLP using ammonia kit assay (C). Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different experiments, with significance showed as \*\*P = 0.0092 and \*\*\*\*P<0.0001 compared with the control sample (0 mM of PLP).

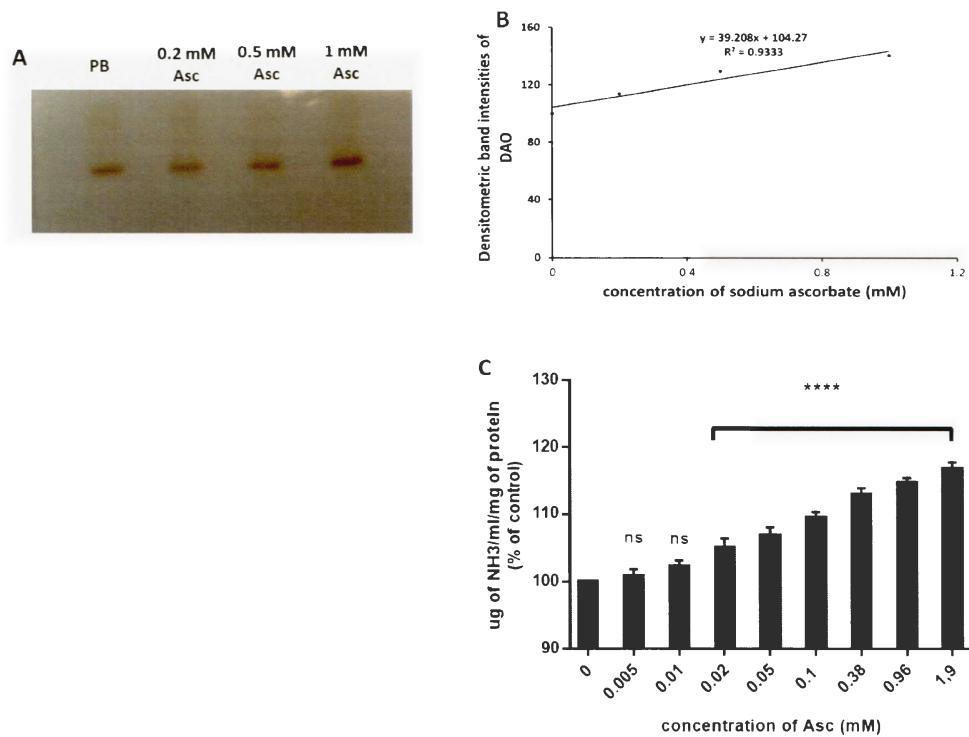
The second antioxidant (Trolox) used induced a similar effect as PLP but at a much lower concentration (Fig. 5.7). An activation of enzyme activity of 1.4 - 1.5 times was found just with 0.06 mM of Trolox (15 times lower than the optimal concentration of PLP) (Fig. 5.6 B).



**Figure 5.7.** Effect of Trolox antioxidant on DAO activity as found in Zymography (A) with 0.2 mg/ml DAO samples treated or not with Trolox at different concentrations, on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel. Graphical presentation of densitometric intensities of bands (B) and DAO activity (C) in presence of several concentrations of Trolox using spectrophotometric ammonia kit assay (n=3). Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different

experiments, with significance showed as \*\*\*\*P<0.0001 compared with the control sample (0 mM of Trolox).

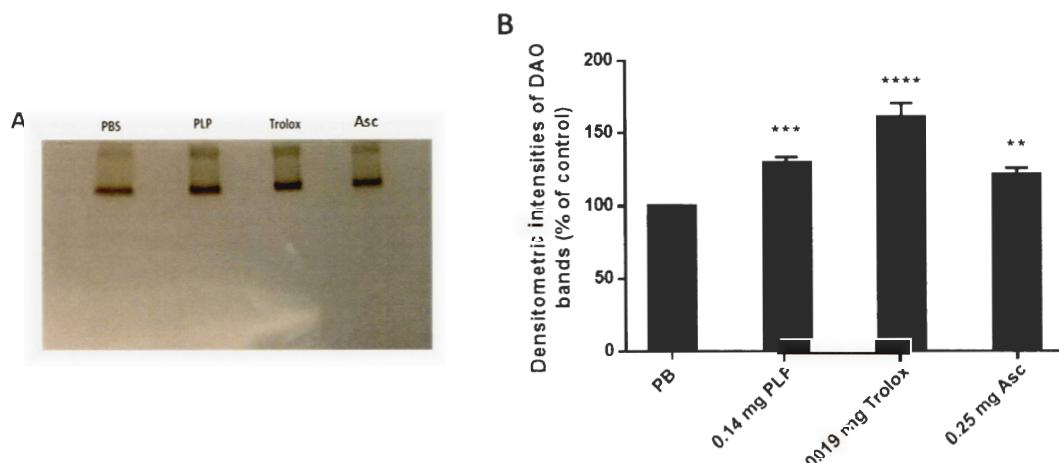
Sodium ascorbate improved the activity of DAO (Fig. 5.7) but less than pyridoxal pyridoxal and Trolox. Activity of DAO was slightly improved (1.14 times) with the optimal concentration of sodium ascorbate (1.9 mM) (Fig. 5.8 C). The same result was obtained with the spectrophotometrical ammonia kit assay. An explanation of this lower activation may be the sodium salt form of ascorbate acid used to enhance its solubility (Sodium is known to interact with the catalytic site of enzyme, Le Tien *et al.*, 2018).



**Figure 5.8.** Effect of sodium ascorbate on DAO activity, in Zymography (A) of DAO treated or not with different concentrations of Sodium Ascorbate (0.2 mg/ml DAO in PB) on SDS-Polyacrylamide (10%) gel. Densitometric intensities of zymography bands (gel A) versus ascorbate concentration (B) and spectrometric determination (C) of DAO activity in presence of different concentrations of Sodium Ascorbate using

ammonia kit assay ( $n=3$ ). Data represent mean  $\pm$  SD  $n=3$  different experiments, with significance showed as  $****P<0.0001$  compared with the control sample (0 mM of sodium ascorbate).

An optimal concentration for each non-enzymatic antioxidant was retained for the increase of DAO activity (Fig. 5.9) monitored by zymography. Trolox, at a lower concentration (0.074 mM) induced a better enhancement (Fig. 5.9) of enzyme activity (1.6 times) than pyridoxal phosphate (1.3 times) and sodium ascorbate (1.2 times) at 1 mM. These results show that higher antioxidant capacity may induce a greater increase of enzyme activity and a better protection of oxidase against produced  $H_2O_2$ . It is worth to mention that PLP induces an enhancement of DAO activity (Fig. 5.9) even if its antioxidant capacity is low (Tab. S5.1).



**Figure 5.9.** Effect of various agents with antioxidant properties at their optimal concentration on DAO activity as showed by Zymography (A) on SDS-Polyacrylamide (10%) gel of 0.2 mg/ml DAO (in PB) and densitometric intensities (B) of zymography bands versus the antioxidant treatment. Data represent mean  $\pm$  SD  $n=3$  different experiments. with significance showed as  $**P = 0.0074$ ,  $***P = 0.0007$  and  $****P<0.0001$  compared with the control sample (DAO in PB).

The  $H_2O_2$  decreased DAO enzyme activity, probably by oxidation of certain amino acid residues. Moreover,  $H_2O_2$  may also induce the oxidation of Topoquinone (TPQ), the

principal cofactor of copper-containing amine oxidases, which is involved in catalytic oxidation of biogenic amines. Treatment with antioxidants could directly and readily reduce the level of produced hydrogen peroxide and scavenge certain free radicals, protecting thus the enzyme against oxidative damage. The putative involvement of various antioxidants with different scavenging capacities was investigated in terms of oxidase activity and protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In fact, Trolox (the agent with highest antioxidant capacity, Table S5.1) induced a better enhancement of enzyme activity in comparison with pyridoxal phosphate and with sodium ascorbate (Figs. 5.6 – 5.9). The PLP induced an increase of DAO activity, despite its weak antioxidant capacity (Gliszczyńska-Świgło, 2006). PLP was considered as cofactor for several enzyme systems (Bender, 2003). In fact, PLP may form Schiff-base with several amino acids as intermediates in transamination (Bender, 2003). Furthermore, for many years PLP was also considered a cofactor of amine oxidases (Blaschko et Buffoni, 1965; Buffoni, 1990). The modulation of DAO activity by PLP, here reported, may be more related to its structure and capacity to interact with biogenic amines (DAO substrates), rather than to its antioxidant properties. In fact, in terms of antioxidant properties, it was found that Trolox and sodium ascorbate have a higher antioxidant capacity than PLP (Table 1S). Thus, PLP may not only protect the DAO enzyme as antioxidant, but also participate during the oxidative deamination as a helper (as TPQ does for the enzymatical process). The oxidation of amines by amine oxidases involves the formation of a Schiff-base followed by proton abstraction and hydrolysis to give a reduced aminodiphenol form of the TPQ. The reduced TPQ forms a Cu(I)-semiquinone intermediate which is reoxidized by the dioxygen (O<sub>2</sub>) to Cu (II), releasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and regenerating TPQ (McGuirl et al, 1994; Kumar *et al.*, 1996). The PLP may react with biogenic amines in a similar way to the interaction with amines in transamination. Antioxidants may enhance the activation cycle of Topoquinone. Moreover, antioxidants may decompose the produced hydrogen peroxide acting as positive modulator of oxidases activity (similar results were obtained with glucose oxidase, Fig. S5.2).

Surfactants and vitamins with antioxidant properties may have a role in stabilization and modulation of oxidases with therapeutic or biotechnological applications.

Among surfactants, lecithin – a natural phospholipid, appeared as the tensioactive agent with perspectives to be used for orally administered enzymes, contributing to “*in situ*” protection against released hydrogen peroxide.

Among other antioxidants, pyridoxal phosphate was found as a good enhancer for the diamine oxidase activity.

Synergic effect on DAO activity was not found when these 2 agents (antioxidants and surfactants) were combined (Fig.S5.3). The enzyme activity was inhibited by the combination with SDS and PLP.

These observations may be of interest for further formulations including lecithin and pyridoxal phosphate as stabilizers and enhancers of oral therapeutic enzymes.

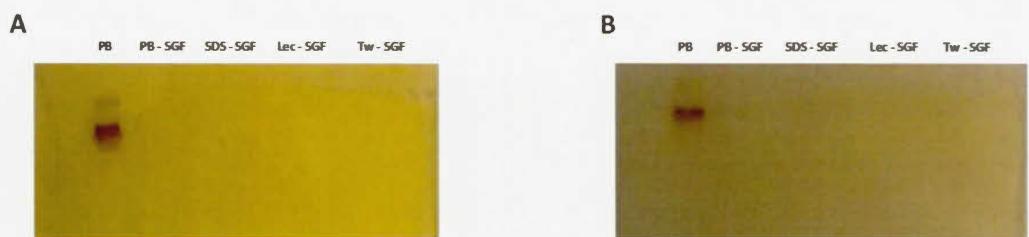
#### **List of abbreviations:**

**APS**, ammonium persulfate; **Asc**, sodium ascorbate; **B.S**, Bile salts; **DAO**, diamine oxidase; **GDH**, L-Glutamate Dehydrogenase; **GOx**, glucose oxidase; **KGA**,  $\alpha$ -ketoglutaric acid; **Lec**: Lecithin; **NEAs**: non-enzymatic antioxidants; **PB**, Potassium Phosphate Buffer; **PLP**, pyridoxal-5'-phosphate; **SDS**, sodium dodecyl sulfate; **SDS-PAGE**, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; **TPQ**, topaquinone; **Tro**, Trolox; **Tw**, Tween.

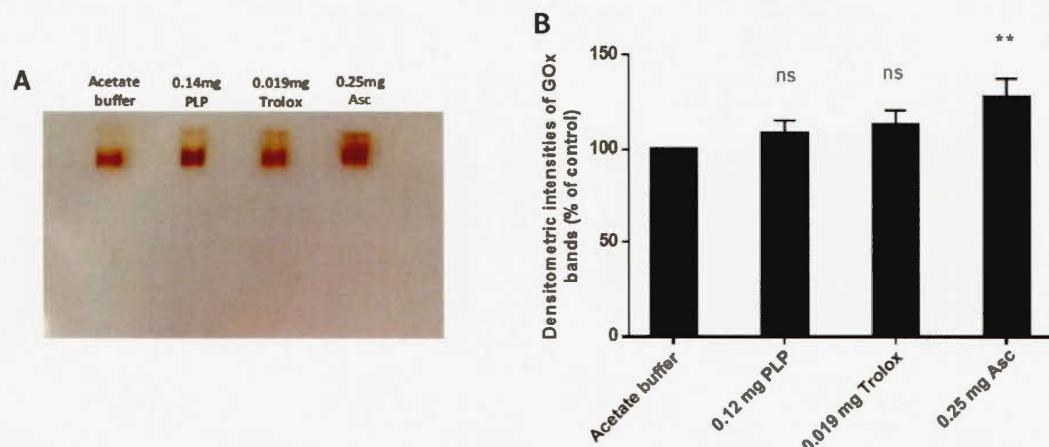
### Acknowledgements

Financial support from NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council) of Canada (Discovery Program), from Fondation Courtois (Canada) and from Joint Project Italia – Canada – Quebec (2017–2019) is gratefully acknowledged.

### Supplementary information

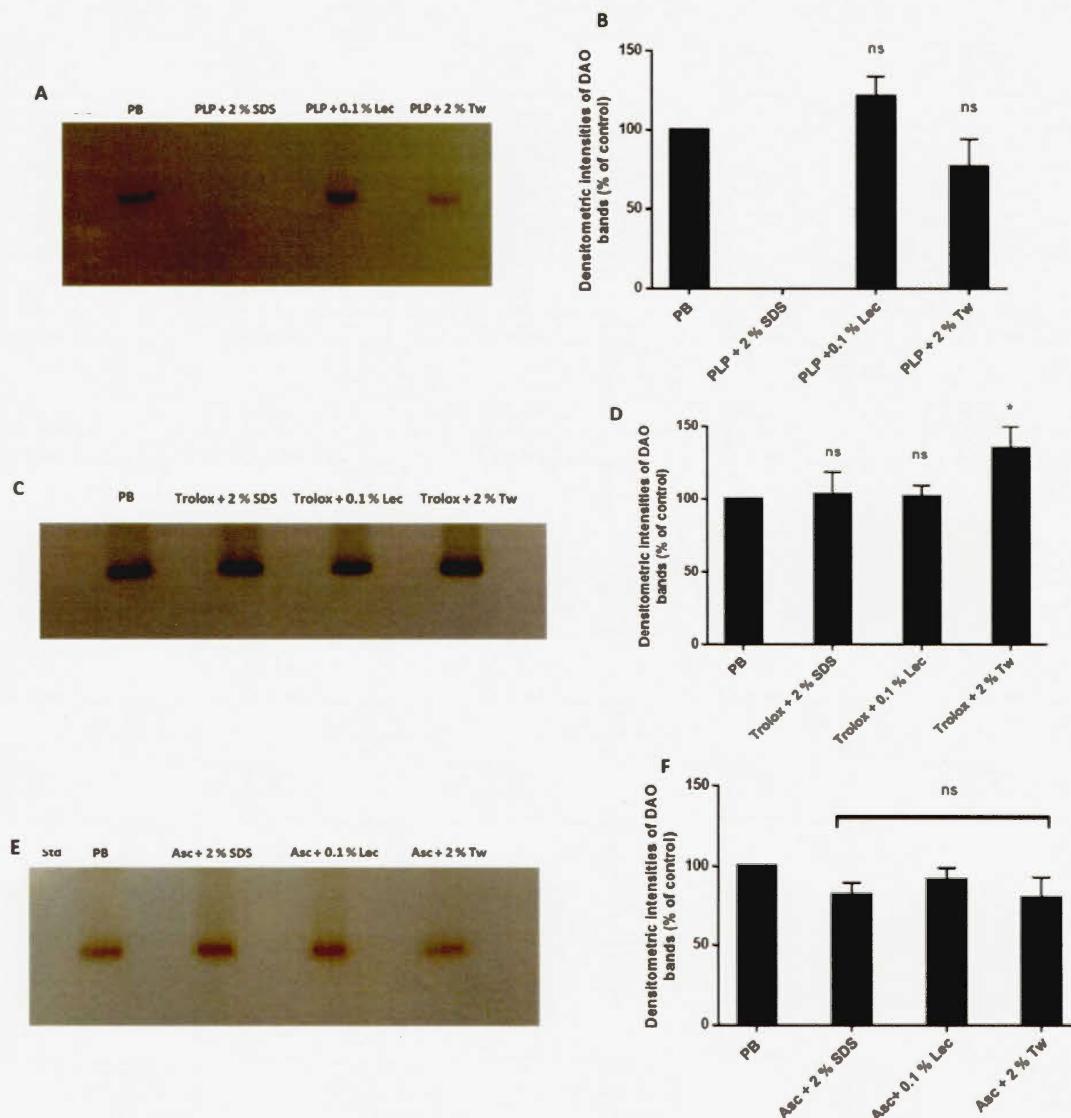


**Figure S5.1:** Effect of surfactants on DAO in SGF with pepsin. Zymography (A, B) of 0.2 mg/ml of diamine oxidase incubated in SGF (with pepsin) during 5 min (gel A) or 1 h (gel B), 37° C after treatment with surfactants (2 % SDS, 0.1 % Lecithin, 2 % Tween) or with 100 mM Potassium PB, pH 7.4 (control, 100 %) on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel.



**Figure S5.2:** Effect of various antioxidant at their optimal concentration on GOx activity as showed by Zymography (A) on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel of 1 μM GOx (control: GOx in 50 mM acetate buffer, pH 5.5) and graphical representation (B) of densitometric intensities of zymography bands versus the antioxidant treatment.

Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different experiments, with significance showed as \*\*P = 0.0053 compared with the control sample (GOx in 50 mM acetate buffer).



**Figure S5.3:** Effect of antioxidants PLP, Trolox, sodium ascorbate at their optimal concentrations combined with surfactants on DAO activity as showed by Zymography (A, C, E) on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel of 0.2 mg/mL DAO and graphical representation (B, D, F) of densitometric intensities of zymography bands versus the

treatments. Data represent mean  $\pm$  SD n=3 different experiments, with significance showed as \*P = 0.0138 compared with the control sample (DAO in PB).

**Table S5.1:** Antioxidant capacity of each antioxidant using Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), measurement with Trolox (used as standard).

0.5 mM of each sample	% of discoloration of ABTS
Trolox	94.3
PLP	5.1
Sodium ascorbate	88.3

The TEAC method consists in measuring of the 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical monocation (ABTS<sup>•+</sup>) reduction with a decoloration induced by the scavenger to be analyzed (Konan *et al.*, 2016). The antioxidant capacity is measured using the ABTS Discoloration Assay. the results were expressed in equivalents of Trolox considered as a standard reference scavenger.

A TEAC value was assigned to sodium ascorbate and PLP (to scavenge the ABTS<sup>•+</sup>) by comparing their scavenging capacity to that of Trolox. TEAC value found for PLP was 2.56 U Trolox/mg of PLP and 5.29 U Trolox/ $\mu$ g of sodium ascorbate for sodium ascorbate.

## Les références citées dans ce manuscrit sont trouvables à la liste des références (section Bibliographie, page 92).

## CHAPITRE VI

### DISCUSSION ET CONCLUSION

Les oxydases sont des enzymes impliquées dans la régulation de divers processus physiologiques mais elles sont également utilisées pour diverses applications dans les domaines pharmaceutique, médical, analytique, agroalimentaire(Mano, 2012, Dijkman *et al.*, 2013). Comme la plupart des enzymes, leur utilisation est limitée par une certaine instabilité et une perte d'activité catalytique dans le temps, dues au processus de dénaturation ou encore par la présence d'inhibiteurs (Randolph et Jones, 2002). Plusieurs techniques de stabilisation sont utilisées à cet effet (Stepankova *et al.*, 2013). Certaines de ces techniques dépendent de la nature des enzymes et peuvent également être couteuses. La diamine oxydase est une oxydase à cuivre récemment proposée comme agent thérapeutique pour traiter les pathologies liées à l'histamine (Mateescu *et al.*, 2017). De récentes études ont également montré les effets antispasmodiques de la DAO en cas de contractions excessives et douloureuses liées à l'histamine. Suite à une délivrance intestinale de cette enzyme, le peroxyde d'hydrogène généré comme produit secondaire peut endommager les tissus et aussi réduire l'activité de l'enzyme(Pietrangeli *et al.*, 2002; Jumarie *et al.*, 2017). La catalase a été proposée pour une formulation bi-enzymatique administrable par voie orale (Calinescu *et al.*, 2012; Mateescu *et al.*, 2017) mais la catalase n'est pas très stable en milieu intestinal d'où la nécessité d'utiliser d'autres approches afin de protéger l'organisme et les enzymes thérapeutiques. Dans ce contexte, les surfactants (SDS, lécithine, Tween 80) et les antioxydants non-enzymatiques (PLP, Trolox, Ascorbate de sodium ; en remplacement de la catalase) ont été proposés afin de stabiliser la DAO thérapeutique, éliminer le peroxyde d'hydrogène et si possible augmenter son activité catalytique. Le choix des surfactants repose sur des études préalables (Mondovi *et al.*, 1997; Moosavi-Movahedi,

2005; Ahmadifar *et al.*, 2017) révélant que ces agents peuvent générer, en fonction de leur nature et des quantités utilisées, soit une dénaturation ou une stabilisation de la structure tridimensionnelle des protéines. Les antioxydants ont été choisis selon leur capacité antioxydante mais également en fonction de leurs structure et fonctions.

La glucose oxydase est une oxydase à FAD largement utilisée pour des applications analytiques et agro-alimentaires(Du *et al.*, 2007; Bankar *et al.*, 2009; Courjean *et al.*, 2011). Toutes ces applications nécessitent une enzyme très active et stable. Le peroxyde d'hydrogène généré par l'oxydation du glucose par la glucose oxydase inactive également l'enzyme (Bao *et al.*, 2003). Pour cela un autre objectif de ce projet était de vérifier si les approches proposées pour la stabilisation de la DAO fonctionnent également avec la glucose oxydase.

La methode d'évaluation de la stabilisation des deux oxydases et de la modulation de leur activité catalytique a été la zymographie (Calinescu *et al.*, 2012; Ahmadifar *et al.*, 2017; Le Tien *et al.*, 2018.)

L'activité des enzymes a été augmentée (plus de 1,6 fois) en présence des surfactants (Fig. 5.2, Tableau 5.1). La stabilisation et la modulation des activités catalytiques dépendent de la nature et de la quantité de surfactant. La lécithine, produit naturel, a la partie hydrophobe la plus importante de tous les 3 surfactants utilisés avec une HLB faible. Pour cela, seulement 0,1 % lécithine était nécessaire pour stabiliser les enzymes comparativement à 2% pour le SDS (anionique) et le tween (neutre) qui ont une HLB plus élevée. Au-delà de 0,1 %, les structures formées par la lécithine sont très compactes réduisant la diffusion des substrats.

Le Tween et la lécithine ont plus d'effets stabilisants sur la DAO en comparaison avec le SDS. Le SDS, étant anionique, est plus agressif que les deux autres surfactants et a tendance à dénaturer rapidement les protéines mais avec 2%, il y a une augmentation

de l'activité catalytique des enzymes (Fig.5.1 ; 5.4), possiblement suite à une meilleure exposition de son site actif et facilitant ainsi l'accès du substrat. Il n'est pas exclut une interaction des surfactants avec des résidus hydrophobes des acides aminés entourant le site actif et ainsi mieux exposant le site actif de l'enzyme. Ces résultats confirment en effet les travaux publiés par Tchoumi *et al.*, 2018 montrant que des biomolécules peuvent stabiliser et augmenter l'activité de la DAO.

La glucose oxydase est mieux stabilisée par la lécithine et le SDS (Fig. 5.4) confirmant ainsi que la nature de l'enzyme (pourcentage et localisation des acides aminés chargés ou neutres) peut influencer sa stabilisation par les surfactants.

Les surfactants en milieu aqueux peuvent interagir avec les enzymes offrant ainsi une protection physique à l'enzyme et aussi modifiant le microenvironnement. Ces effets protectifs des surfactants sur la DAO ont été observés également avec la BSA qui est un surfactant polymérique naturel et d'autres biomolécules contenues dans les sels biliaires (Tchoumi *et al.*, 2018). L'activité catalytique des enzymes se trouve donc augmentée en présence des surfactants.

En milieu gastrique, la DAO est inactivée par l'action protéolytique de la pepsine et du pH (acidité gastrique). Les surfactants n'ont pas d'effet protecteur sur la DAO en milieu gastrique (Fig.S5.1). Cependant, certains excipients développés pour la libération intestinale offrent une résistance gastrique à l'enzyme thérapeutique (Calinescu *et al.*, 2012).

En milieu intestinal en présence de la pancréatine, les surfactants, surtout le tween et la lécithine, offrent une protection à l'enzyme (Fig. 5.5).

Le peroxyde d'hydrogène est un pro-oxydant qui provoque l'oxydation des résidus acides aminés des protéines ou des enzymes pouvant ainsi les inactiver (Pietrangeli *et al.*, 2000 ; Bao *et al.*, 2003).

Les activités catalytiques de la DAO et de la GOx sont augmentées en présence de trolox et d'ascorbate de sodium, deux antioxydants avec des capacités antioxydantes élevées (Table S5.1, Fig. 5.8 et S5.2). Le trolox peut empêcher l'action du peroxyde d'hydrogène produit par la désamination de l'histamine et donc protège la diamine oxydase de l'oxydation. L'ascorbate de sodium a moins d'effet modulateur sur la DAO mais stimule plus l'activité de la GOx (Fig. 5.9 et S5.2). L'effet modulateur et stabilisateur des antioxydants dépend de leur structure et de leur capacité antioxydante. Les antioxydants peuvent également protéger l'enzyme face à d'autres radicaux libres.

Le phosphate de pyridoxal (PLP) a des fonctions de coenzyme pour des décarboxylases et transaminases (Bender, 2003). Il forme des intermédiaires (base de Schiff) avec des acides aminés et des amines modifiant ainsi les vitesses des réactions enzymatiques. Le phosphate de pyridoxal a été longtemps considéré comme cofacteur de l'amine oxydase sérique (Blaschko & Buffoni, 1965; Buffoni, 1990). Ensuite, la topaquinone a été reconnue comme coenzyme des amines oxydases à cuivre. Cependant, nos résultats montrent qu'en présence de PLP, l'activité de la diamine oxydase est augmentée (Fig. 5.6 et 5.9). En plus, le PLP est pris comme supplément alimentaire (vitamine B6) par des sujets afin de rehausser l'activité de la DAO (Martner-Hewess *et al.*, 1986; Maintz et Novak, 2007). Le PLP peut donc interagir avec des résidus lysine de la DAO augmentant ainsi la vitesse catalytique. Le PLP a également une activité antioxydante éliminant le peroxyde d'hydrogène ce qui protège l'enzyme face à l'oxydation et l'agrégation.

Les enzymes sont donc protégées par les surfactants mais le peroxyde d'hydrogène produit n'est pas éliminé. Les antioxydants non-enzymatiques protègent les enzymes par le piégeage direct du peroxyde d'hydrogène.

La combinaison de ces deux types d'agents, surfactants et antioxydants, n'a pas d'effet synergique sur l'activité oxydasique. Des combinaisons (SDS-PLP) ont plutôt un effet inhibiteur sur l'activité de la DAO (Fig. S5.3). Cependant, les combinaisons entre la lécithine et le PLP puis le Tween et le Trolox semblent augmenter l'activité enzymatique de la DAO (Fig. S5.3) même si cette augmentation n'est pas significative pour la lécithine et le PLP.

En conclusion, ce projet de recherche avait pour but d'élaborer des systèmes afin de protéger la DAO, enzyme thérapeutique, et l'organisme contre le peroxyde d'hydrogène. L'autre objectif était de stabiliser et d'augmenter son activité avec des surfactants et des agents antioxydants et, si possible, d'étendre ces applications à la glucose oxydase. Compte tenu de leur structure et quantité, les surfactants ont un effet stabilisant sur les deux enzymes et augmentent leur activité catalytique. Les antioxydants protègent également l'activité de ces deux enzymes par élimination directe du peroxyde d'hydrogène empêchant ainsi l'oxydation des enzymes. Également, par la réduction des ponts disulfures, d'éventuelles agrégations des enzymes sont prévenues. Ces procédures utilisées pour la stabilisation sont moins coûteuses comparativement à d'autres procédés et cette approche peut être étendue à d'autres enzymes de type oxydase dont la réaction produit le peroxyde d'hydrogène. Ces travaux et les résultats obtenus montrent l'importance des surfactants et des vitamines aux propriétés antioxydantes comme effecteurs dans la stabilisation et la modulation des activités d'enzymes thérapeutiques ou d'autres enzymes aux applications biotechnologiques.

La lécithine (produit naturel) et le phosphate de pyridoxal (vitamine B6) pourraient être utilisés dans le futur comme ajouts à la formulation de l'enzyme thérapeutique administrable par voie orale. De point de vue réglementaire, cet aspect est faisable, la lécithine et la vitamine B6 faisant partie des produits GRAS (Generally Recognized As Safe).

## ANNEXE A : MINI REVIEW



Journal of Gastroenterology Research

Review Article

Open Access

### Plant Histaminase as Bioactive Agent to Lower the Histamine Level: A Mini-Review

Mircea Alexandru Mateescu<sup>1\*</sup>, Mireille Djatoughbévi Koudoufio<sup>1</sup>, Armelle Tchoumi Neree<sup>1</sup> and Bruno Mondoví<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, Canada

<sup>2</sup>Department of Biochemical Sciences "A Rossi-Fanelli", Sapienza University of Rome, Italy

#### Abstract

Histamine is a biogenic amine originating endogenously or exogenously from Histidine by enzymatic decarboxylation. Endogenous histamine is mostly generated by basophils and mast cells that, when activated, will release histamine that is involved in various regulatory processes but also will induce multiple allergic effects (hypotension, tachycardia, vascular risks) including anaphylactic shock and possible death. For some histamine related symptoms (itching, asthma, hyperacidity), there are antihistaminic drugs (e.g. Desloratadine-Aerius®, Loratadine-Claritin®, Ranitidine-Zantac®) whereas for anaphylaxis, epinephrine (Epipen®) is required. Exogenous histamine, frequently associated to fermented food and beverages, some fruits, fish, may induce a food histaminosis and trigger pseudo-allergic phenomena for which there is no current treatment available. Histamine may also exert some pro-inflammatory effects, particularly damaging for subjects with Inflammatory Bowel Diseases (IBD) as Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC), mostly treated with anti-inflammatory drugs. Histamine deleterious effects and those produced as side-effects of antihistaminic drugs (allergic phenomena) or of anti-inflammatory drugs are inconvenient (nauses, diarrhea, dizziness).

For this reason, novel enzymatic strategies with Diamine Oxidase (DAO, histaminase) to decrease the histamine levels in allergic reactions to food and in ulcerative colitis were recently proposed. This may alleviate the symptoms associated with IBD and food allergens. The therapeutic concept is that histaminase will decrease the level of histamine in the intestine by oxidation, involving the dissolved oxygen. Since the by-product of the DAO reaction is hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), a pro-oxidant agent generating undesirable oxidative damaging effects, a combination of catalase and vegetal histaminase in tablet formulations for oral administration was proposed. Catalase will decompose  $H_2O_2$  generating *in situ* more oxygen, promoting thus the decomposition of histamine under histaminase action. Thus, the dual enzymatic histaminase + catalase tablets, could contribute to a healthier intestinal mucosa. This DAO approach seems a non-toxic way to improve the treatment IBD and related inflammatory pathologies.

#### Keywords

Histamine, Diamine Oxidase (DAO, Histaminase), Catalase, Inflammatory Bowel Diseases (IBD), Food histaminosis, Lower intestine and Colon delivery

#### Introduction

Histamine is a biologically active molecule: biogenic amine generated by the alpha-decarboxylation of the amino acid histidine by histidine decarboxylase. This biogenic amine is widely distributed and is involved in various important biological processes (regulation of gastric acidity, activity of smooth muscles as well as inflammatory and immunological reactions) through the activation of one or more of the four specific histamine receptors H1, H2, H3, H4 on target cells [1,2]. In general, H1 and H2 receptors are present in the vascular smooth muscle cells (SMCs) and endothelial cells, H3 and H4 receptors

are mostly expressed in central nervous system and in the enteric nervous system and H4 is expressed in bone

\*Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu, Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Branch A, Montreal, Québec, H3C 3P8, Canada. E-mail: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Received: February 21, 2017; Accepted: April 08, 2017; Published online: April 10, 2017

Citation: Mateescu MA, Koudoufio MD, Tchoumi NA, et al. (2017) Plant Histaminase as Bioactive Agent to Lower the Histamine Level: A Mini-Review. J Gastroenterol Res 1(1):34-41

marrow, liver, lung, spleen, small intestine and colon.

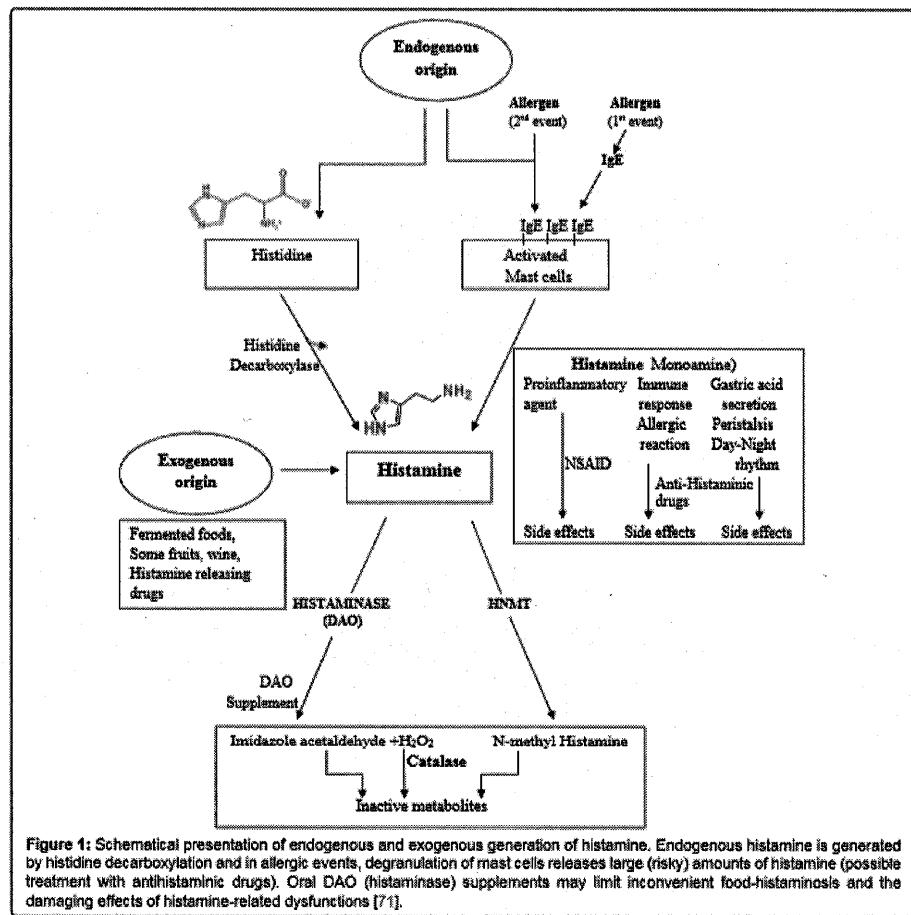
#### Histamine: friend & foe and its signalling issues

Histamine can act as vasodilator and as vasoconstrictor of smooth muscle such as uterine and gut smooth muscle [3-5]. As a vasoactive biogenic amine, histamine is able to act on H1-H4 receptors activating the G protein and trigger signals modulating vasoconstrictor. Histamine may strongly increase vascular permeability and regulate the blood pressure. Histamine may also induce tachycardia and arrhythmias depending on the activated receptor and location of target cells [6]. Furthermore, histamine also mediates neurotransmission in the central nervous system [7], immunomodulation [8], hematopoiesis [9],

cell proliferation [10], angiogenesis in tumour models i.e., adenocarcinoma of stomach or large bowel [11-13]. It also promotes mucosal and gastric acid secretion. As a constrictor of smooth muscle, histamine activates H1 receptors located on SMCs (smooth muscle cells) inducing peristalsis [2,14].

#### Origin of histamine

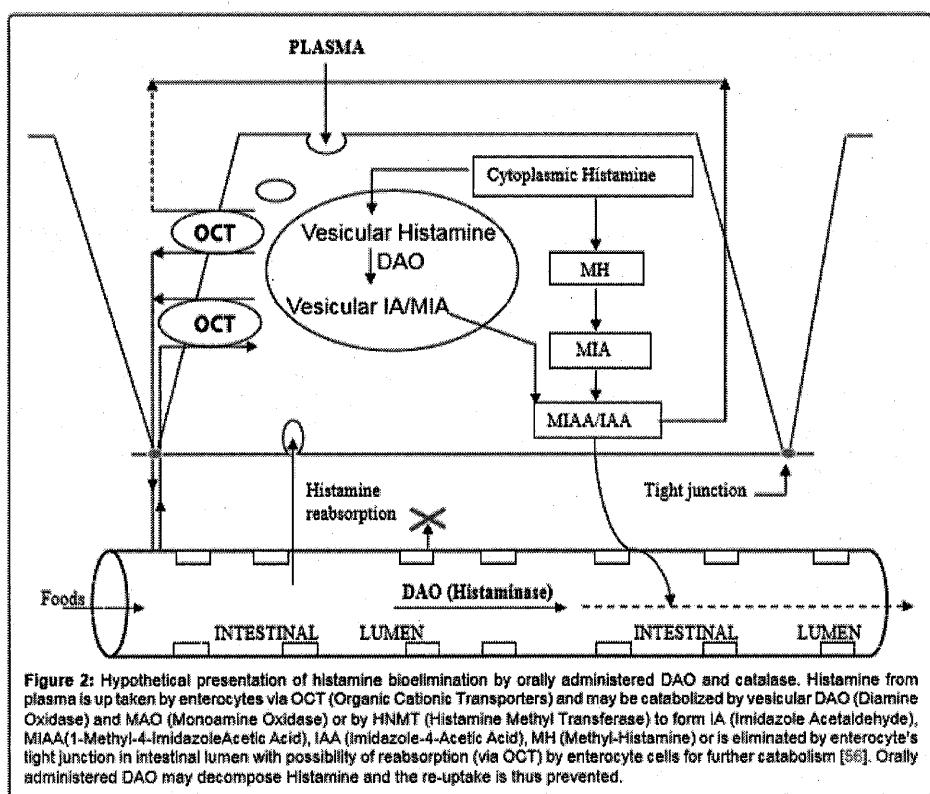
**Endogenous origin:** Histamine is produced by the organism itself and is present in many tissues. Histamine is mostly generated in gastric enterochromaffin-like (ECL) cells, histaminergic neurons, basophiles and mast cells [15,16] which store it in intracellular vesicles (Figure 1). Histamine is released as result of allergens and other ex-



**Figure 1:** Schematical presentation of endogenous and exogenous generation of histamine. Endogenous histamine is generated by histidine decarboxylation and in allergic events, degranulation of mast cells releases large (risky) amounts of histamine (possible treatment with antihistaminic drugs). Oral DAO (histaminase) supplements may limit inconvenient food-histaminosis and the damaging effects of histamine-related dysfunctions [7].

ogenous factors. For instance allergens, at a first allergic event, will trigger specific antibodies (IgE) that will rapidly act on basophiles and on mast cells. At a subsequent allergic event, the allergen will be recognised by the IgE antibodies retained by the basophil and mast cells inducing degranulation of histamine vesicles with histamine release, which will induce drastic allergic phenomena (Figure 1). Besides allergens, mast cells degranulation may also be mediated by non-immuno stimuli such as neuropeptides [17], hyperosmolarity [18], lipoproteins and platelet activating factor [19], adenosine [20]. In addition to these mechanisms, various medications and many agents such as opiates [21,22], muscle relaxants [23] plasma expanders and radiocontrast materials [24] as well as physical factors (i.e. extreme temperature, vibrations) [25,26] can be responsible of histamine release. All these mentioned allergens, chemical and physical factors are responsible of deleterious histamine able to induce allergic phenomena including anaphylactic shock and possibly death.

Most recent knowledge on histamine functions was acquired in the last decade. Histamine is normally catabolized by copper diamine oxidase (DAO) and FAD (Flavin-Adenine-Dinucleotide) monoamine oxidase (MAO) and also by histamine N-methyltransferase (HNMT). These enzymes are localized at cellular level, but histamine is unable to easily enter the intracellular space except when the transport is mediated by organic cationic transporters (OCT) as described by [27] Ogasawara, et al. The OCT facilitate in and out processes from extracellular space into the cells and from cells to plasma or other external fluids (Figure 2). For instance the access of biogenic amines (as cationic agents) from plasma into the cells can be mediated by OCT. Thus histamine may be converted in products that will be eliminated (Figure 1 and Figure 2). Histamine not metabolised can be eliminated via OCT into the intestinal lumen. Cannot be excluded the access of exogenous histamine via OCTs disposed on Enterocyte's tight junctions. In this case, an excess



of histamine histamine may be a risk for pseudoallergic phenomena.

**Exogenous origin:** Histamine may often be present in certain foods, particularly fish, cheese, dairy products, some fruits and fermented food items (some wines, beers, sauerkraut [6,28,29]). It is almost impossible to remove histamine present in food through freezing or cooking [15]. This ingested exogenous histamine can generate a condition called food histaminosis and the symptoms are similar to those induced by allergenic factors; this is why food-histaminosis is considered as a pseudo-allergy with duration of 3-4 days and for which there is no current treatment.

#### Amine oxidases and physiological catabolism of histamine

The diamine oxidase (DAO, also known as Histaminase), is a copper-enzyme (EC 1.4.3.22) present in different tissues (kidney, placenta) and in intestinal mucosa where is abundant [30]. It regulates cells proliferation via degradation (oxidative deamination) of polyamines (known to be involved in control of protein synthesis, growth, differentiation and cells proliferating mechanism [31,32]). DAO also inactivates the endogenous and exogenous excess of dietary histamine preventing "pseudo-allergic" reactions such as food histaminosis (Figure 2).

Histamine can be metabolised principally by two processes, via oxidative deamination by DAO copper-enzyme or by monoamine oxidase (MAO, a FAD-enzyme) and via histamine N-methyl transferase (HNMT) by histamine methylation [6,33,34]. These mechanisms depend on the localisation of histamine and generate different end products. Stored in secretory granules structures associated to plasma membrane of cells, DAO protein is released in circulation via heparin and by immunotherapy stimulation inducing degranulation. DAO activity is elevated in intestinal mucosa and villi, kidney and placenta [6,35]. HNMT is a cytosolic enzyme which inactivates intracellular histamine [15].

**Intoxication with histamine:** It is a food histaminosis caused by ingestion of a high content of histamine [15,36]. Common symptoms of histaminosis include headache, arrhythmia, tachycardia, nausea, anxiety, abdominal cramps, diarrhea and nasal congestion. Other conditions such as reduction of diamine oxidase activity or the presence of factors inducing degranulation of mast cells can also increase histamine toxicity. For instance, in the case of scombroid fish poisoning, in addition to the high level of histamine, the decomposition process of fish may also release other biogenic amines (cadaverine, putrescine) which can further potentiate toxicity through inhibition of intestinal diamine oxidase [15,37]. In addition to histamine-rich foods, many other foods may increase histamine release via allergenic factors by

mast cells degranulation (Figure 1) and/or inhibition of DAO activity. A fragility of duodenal mast cells with elevated degranulation and histamine release was shown in subjects with pseudo allergic history [6].

#### Role of histamine in enteric dysfunctions

In gastrointestinal tract, histamine is involved in various physiological processes such as inflammatory responses, regulation of intestinal motility and gastric acid secretion [38,39]. It is also implicated in gastrointestinal ailments such as gastric ulcers, Inflammatory Bowel Diseases, ulcerative colitis and food allergies [2].

**Histamine and gastric acidity:** Due to stimulation by mediators (including histamine and gastrin), parietal cells of stomach secrete gastric acid (hydrochloric acid, pH 1.2-3.8), with the role to solubilize ingested foods and to induce the release of pepsin [40,41]. Histamine released from ECL cells, stimulates gastric acid secretion through activation of histamine receptors H2 on parietal cells [24,42,43]. Histamine may contribute to the formation of duodenal ulcers by increasing gastric acid release [44,45]. Receptors H2-antagonists are able to inhibit gastric acidity and are used in treatment of peptic ulcers [46-48].

**Histamine as mediator of acute inflammatory response:** On the endothelium, the histamine-activation of H1-receptors stimulates PLC (Phospholipase C), the key enzyme responsible for the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) to 1,2-diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) intracellular messengers. The DAG stimulates protein kinase C (PKC) implicated in vasoconstriction, and IP3 triggers the release of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ions from reticulum endoplasmic to cytosol [49] forming calcium/calmodulin complexes and activating endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [50]. The nitric oxide (NO) binds to the sGC (sodium Guanylyl cyclase) increasing the level of cGMP and vasorelaxation. The NO is also oxidized to peroxynitrite anions (ONOO<sup>-</sup>), which stimulates nuclear factor kappa B (NFkB) to (pro) inflammatory mediators and enhances cyclooxygenase-2 (COX-2) prostaglandins and thromboxane A2 (TX2).

**Histamine intolerance:** Histamine released from granulocytes and transported in blood stream is usually rapidly inactivated. This mechanism is effective in healthy body but can be disrupted by: i) a strong release of histamine (histamine intoxication) and ii) a low activity of the DAO due to some food contents (biogenic amines) as well as enteric dysfunctions (i.e. intestinal inflammatory conditions and damaged enterocytes, known as related to a low level of DAO). Low DAO activity can also be due to genetic predisposition [15].

**Drugs-induced histaminosis:** Some drugs have the capacity to inhibit the DAO activity or favour the release of histamine and enhance histamine intolerance [6,51-53].

**Inflammatory bowel diseases and current treatment:** IBD is a group of disorders (Crohn's disease, Ulcerative colitis) characterised by severe inflammation and potential ulceration of sections of the gastrointestinal tract. In Crohn's disease the inflammation commonly affects the small intestine and/or colon but may attain any area of gastrointestinal tract from mouth to anus. In ulcerative colitis the inflammation is mostly limited to the colon. Both can increase the risk of colorectal cancer. Degranulation and number of mast cells is strongly increased in mucosa of the ileum and of the colon of patients with IBD [54,55].

Histamine released from mast cells and that eliminated from plasma via OCT [27,56] as well as that from food intake may enhance the inflammation level and markedly contribute to severity of IBD [55]. Anti-inflammatory drugs as 5-aminosalicylic acid (5-ASA, mesalazine), corticosteroids, NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs), immune-suppressor drugs (infliximab, cyclosporine, azathioprine) and antibiotics are currently used for IBD treatment [57]. Furthermore, certain drugs have side's effects such as loss of sense of smell, drowsiness, nausea, vomiting, dizziness and urinary disorders. Some vegetal supplements as curcumin [58,59], Cissampelos glaberrima [60] and recently cannabis [61,62] were found to produce significant clinical benefits to patients with IBD, without side effects. These treatments reduce symptoms, may provide remission for various durations, but still not afford complete recovery (cissaglaberrimine and trilobinine-two alkaloids) are plant antihistaminic.

It is worth to note that in gastrointestinal diseases including Crohn's disease and ulcerative colitis, the level and activity of Diamine oxidase is reduced, leading to a lower degradation and accumulation of histamine (pro-inflammatory factor) [63-65].

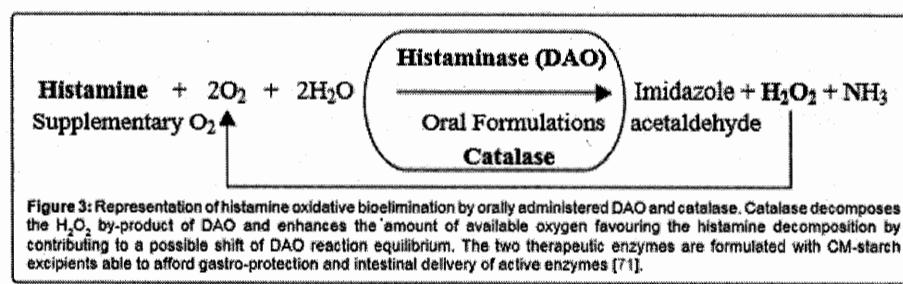
#### Novel Approach of Histaminase: Catalase in Treatment of IBD

The premises of the novel approach are: a) In IBD, the level and activity of Diamine oxidase is reduced, leading

to a lower degradation and accumulation of histamine as pro-inflammatory agent [63,65] b) Current treatments target histaminic receptors to reduce allergic effects but cannot reduce the level of histamine in the intestinal lumen; c) An oral Pig-Kidney DAO supplement is commercially available as Histame' or DAOSIN<sup>®</sup> capsules recommended for food histaminosis and histamine-related intestinal dysfunctions [66].

Recently, a novel approach [67,68] was proposed to treat histamine-related dysfunctions with a vegetal DAO extract from White Pea (*Lathyrus sativus*). Another recent study on vegetal DAO alone or in combination with catalase, showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by DAO and histamine at concentrations higher than 1 mM is toxic to the Caco-2 cells and that in the presence of catalase, the DAO-induced increase of histamine toxicity was abolished [69]. Theser results support the hypothesis that adding catalase to formulation of DAO will protect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by DAO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may act as pro-oxidant). Catalase is a homo-tetrameric enzyme (EC 1.11.1.6) able to rapidly decompose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [70].

The novel approach of oral administration of combined DAO and catalase (Figure 3) appears of interest for the treatment of food histaminosis and of histamine-related enteric dysfunctions and also to ameliorate the treatment of IBD: Crohn's disease (particularly ileocolitis, jejunoleitis) and ulcerative colitis [67,71]. Concerning the ammonia by-product of DAO generated during the oxidative desamination it is known that it may play various deleterious effects as Neurotoxic [72] and as an agent causing colon mucosal cell damage [73]. Further studies are needed to evaluate the amounts of NH<sub>3</sub> released following the administration of DAO pills related to the amount generated by intestinal bacteria and that eliminated (intestinal absorption and by feces). This approach based on a vegetal DAO associated to Catalase is now in development and the bioactive enzymes will be formulated for oral administration as monolithic tablets conceived for lower intestine and colon delivery [66,67,74].



### Acknowledgements

Financial support from Fondation Courtois (Canada) is gratefully acknowledged. Thanks are due to Dr. Pompilia Ispas-Szabo for helpful discussions.

### References

- Jutel M, Akdis M, Akdis CA (2009) Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 39: 1786-1800.
- Benly P (2015) Role of Histamine in Acute Inflammation. *J Pharm Sci & Res* 6: 373-376.
- Manera M, Giannarino A, Perugini M, et al. (2008) In vitro evaluation of gut contractile response to histamine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Res Vet Sci* 84: 126-131.
- Rangachari PK (1992) Histamine: merciful messenger in the gut. *Am J Physiol* 262: 1-13.
- Szelag A, Merwid-Lad A, Trocha M (2002) Histamine receptors in the female reproductive system. Part I. Role of the mast cells and histamine in female reproductive system. *Ginekol Pol* 73: 627-635.
- Maintz L, Novak N (2007) Histamine and Histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* 85: 1185-1196.
- Schwartz JC (1975) Histamine as a transmitter in the brain. *Life Sciences* 17: 503-517.
- Bäumer W, Rossbach K (2010) Histamine as an immunomodulator. *J Dtsch Dermatol Ges* 8: 495-504.
- Schneider E, Bertron AF, Dy M (2011) Modulation of hematopoiesis through histamine receptor signaling. *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 467-473.
- Molina-Hernández A, Velasco I (2008) Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *J Neurochem* 106: 706-717.
- Kusche J, Bieganski T, Hesterberg R, et al. (1980) The influence of carcinoma growth on diamine oxidase activity in human gastrointestinal tract. *Agents Actions* 10: 110-113.
- Norrby K (1995) Evidence of a dual role of endogenous histamine in angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 76: 87-92.
- Raihel M, Ulrich P, Hochberger J, et al. (1998) Measurement of gut diamine oxidase activity. Diamine oxidase as a new biologic marker of colorectal proliferation? *Ann N Y Acad Sci* 859: 262-266.
- Leura R, Brozius MM, Smit MJ, et al. (1991) Effects of histamine H1-, H2- and H3-receptor selective drugs on the mechanical activity of guinea-pig small and large intestine. *Br J Pharmacol* 102: 170-185.
- Kovacova-Hanuscova E, Buday T, Gavlikova S, et al. (2015) Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol Immunopathol (Madrid)* 43: 498-506.
- Smolinska S, Jutel M, Cramer R, et al. (2014) Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy* 69: 273-281.
- Gaudenzio N, Sibilano R, Marichal T, et al. (2016) Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. *J Clin Invest* 126: 3981-3998.
- Proud D, Bailey GS, Naclerio RL, et al. (1992) Tryptase and histamine as markers to evaluate mast cell activation during the responses to nasal challenge with allergen, cold, dry air, and hyperosmolar solutions. *J Allergy Clin Immunol* 89: 1098-1110.
- Nilsson G, Metcalfe DD, Taub DD (2000) Demonstration that platelet-activating factor is capable of activating mast cells and inducing a chemotactic response. *Immunology* 99: 314-319.
- Marquardt DL, Parker CW, Sullivan TJ (1978) Potentiation of Mast Cell Mediator Release by Adenosine. *J Immunol* 120: 871-878.
- Casale TB, Bowman S, Kaliner M (1984) Induction of human cutaneous mast cell degranulation by opiates and endogenous opioid peptides: Evidence for opiate and nonopiate receptor participation. *J Allergy Clin Immunol* 73: 775-781.
- Blunk JA, Schmelz M, Zeck S, et al. (2004) Opioid-induced mast cell activation and vascular responses is not mediated by mu-opioid receptors: an *in vivo* micro dialysis study in human skin. *Anesth Analg* 98: 384-370.
- Koppert W, Blunk JA, Petersen RJ, et al. (2001) Different patterns of mast cell activation by muscle relaxants in human skin. *Anesthesiology* 95: 659-667.
- Genovese A, Stellato C, Marsella AC, et al. (1996) Role of Mast Cells, Basophils and Their Mediators in Adverse Reactions to General Anesthetics and Radiocontrast Media. *Int Arch Allergy Immunol* 110: 13-22.
- Casale TB, Keay MT, Kaliner M (1986) Exercise-induced anaphylactic syndromes. Insights into diagnostic and pathophysiological features. *JAMA* 255: 2049-2053.
- Huston DP, Bressler RB, Kaliner M, et al. (1986) Prevention of mast-cell degranulation by ketotifen in patients with physical urticarias. *Ann Intern Med* 104: 507-510.
- Ogasawara M, Yamachi K, Satoh Y, et al. (2006) Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J Pharmacol Sci* 101: 24-30.
- Bodmer S, Imark O, Kneubühl M (1999) Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflamm Res* 48: 296-300.
- Silva Santos MH (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* 29: 213-231.
- Wolvekamp MC, de Bruin RW (1994) Diamine oxidase: an overview of historical, biochemical and functional aspects. *Dig Dis* 12: 2-14.
- Heby O (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 18: 1-20.
- Fukudome I, Kobayashi M, Dabanaika K, et al. (2014) Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. *Med Mol Morphol* 47: 100-107.
- Valen G, Kaszaki J, Szabo I, et al. (1996) Activity of histamine metabolizing and catabolizing enzymes during reperfusion of isolated, globally ischemic rat hearts. *Inflamm Res* 45: 145-149.
- Klocke J, Mätzler SA, Huetz GN, et al. (2005) Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflamm Res* 54: S54-S57.

35. Schweiger HG, Stutzer B, Maier H, et al. (1998) Expression and cellular localisation of diamine oxidase in the gastrointestinal tract of pigs. *Inflamm Res* 47: 562-563.
36. Visciano P, Schirone M, Tofalo R, et al. (2014) Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Front Microbiol* 5: 500.
37. Preston L (2011) Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Addit Contam Part A - Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28: 1547-1560.
38. Fargeas MJ, Fioramonti J, Bueno L (1989) Involvement of Different Receptors in the Central and Peripheral Effects of Histamine on Intestinal Motility in the Rat. *J Pharm Pharmacol* 41: 534-540.
39. Poll E, Pozzoli C, Corruzi G (2001) Role of histamine H(3) receptors in the control of gastrointestinal motility. An overview. *J Physiol Paris* 95: 67-74.
40. Smith JL (2003) The Role of Gastric Acid in Preventing Foodborne Disease and How Bacteria Overcome Acid Conditions. *J Food Prot* 66: 1292-1303.
41. Serfaty-Lacroix C, Wood RJ, Voytko D, et al. (1995) Hypochlorhydria from short-term omeprazole treatment does not inhibit intestinal absorption of calcium, phosphorus, magnesium or zinc from food in humans. *J Am Coll Nutr* 14: 364-368.
42. Schubert ML (1999) Regulation of gastric acid secretion. *Curr Opinin in Gastroenterology* 15: 457.
43. Barocelli E, Ballabeni V (2003) Histamine in the control of gastric acid secretion: a topic review. *Pharmacol Res* 47: 299-304.
44. Troldi H, Lorenz W, Rohde H, et al. (1976) Histamine and peptic ulcer: a prospective study of mucosal histamine concentration in duodenal ulcer patients and in control subjects suffering from various gastrointestinal diseases. *Klin Woehnschr* 54: 947-955.
45. Man WK, Boesby S, Michalowski A, et al. (1990) Histamine, histamine formation capacity and gastrin in cysteamine-induced peptic ulcer. *J Exp Pathol* 71: 95-104.
46. Gledhill T, Howard OM, Buck M, et al. (1983) Single nocturnal dose of an H2 receptor antagonist for the treatment of duodenal ulcer. *Gut* 24: 904-908.
47. Parsons ME (1985) Histamine and the pathogenesis of duodenal ulcer disease. *Gut* 26: 1159-1164.
48. Deakin M, Williams JG (1992) Histamine H2-receptor antagonists in peptic ulcer disease. Efficacy in healing peptic ulcers. *Drugs* 44: 709-719.
49. Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70: 281-312.
50. Lantuejou F, Iouzaen L, Devynck MA, et al. (1998) Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem J* 330: 685-689.
51. Sattler J, Hesterberg R, Lorenz W, et al. (1985) Inhibition of human and canine diamine oxidase by drugs used in an intensive care unit: relevance for clinical side effects? *Agents Actions* 16: 91-94.
52. Sattler J, Hesterberg R, Schmidt U, et al. (1987) Inhibition of intestinal diamine oxidase by detergents: a problem for drug formulations with water insoluble agents applied by the intravenous route? *Agents Actions* 20: 270-273.
53. Sattler J, Häfner D, Klotter J, et al. (1988) Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: Plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents Actions* 23: 361-365.
54. He SH (2004) Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 10: 309-318.
55. Nolte H, Spjeldnaes N, Kruse A, et al. (1990) Histamine release from gut mast cells in patients with inflammatory Bowel Disease. *Gut* 31: 791-794.
56. Aschenbach JR, Honscha KU, von Vietinghoff V, et al. (2009) Bioelimination of histamine in epithelia of the porcine proximal colon of pigs. *Inflamm Res* 56: 269-276.
57. Triantafyllidis JK, Merikas E, Georgopoulos F (2011) Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drugs Des Devel Ther* 5: 185-210.
58. Hanai H, Sugimoto K (2009) Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 15: 2087-2094.
59. Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O, et al. (2007) Curcumin prevents the development of dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci* 52: 2993-2998.
60. Alves MF, Scotti MT, Scotti L, et al. (2016) Secondary metabolites from cissampelos, A possible source for new leads with anti-inflammatory activity. PMID: 26029072.
61. Ahmed W, Katz S (2016) Therapeutic Use of Cannabis in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol* 12: 668-679.
62. Naftali T, Bar-Lev Schleider L, Dolan I, et al. (2013) Cannabis induces a clinical response in patients with Crohn's disease: a prospective placebo-controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11: 1276-1280.
63. D'Agostino L, Daniele B, Pignata S, et al. (1988) Postheparin plasma diamine oxidase in subjects with small bowel disease: Diagnostic efficiency of a simplified test. *Digestion* 41: 48-54.
64. Kuehne MA, Schweiger HG, Weidenhiller M, et al. (2004) Both catabolic pathways of histamine via histamine-N-methyltransferase and diamine oxidase are diminished in the colonic mucosa of patients with food allergy. *Inflamm Res* 53: S31-S32.
65. Schmidt WU, Sattler J, Hesterberg R, et al. (1990) Human intestinal diamine oxidase (DAO) activity in Crohn's disease: a new marker of disease assessment? *Agents Action* 30: 267-270.
66. Missbichler A, Mayer I, Pongracz C, et al. (2010) 19 Supplementation of enteric coated diamine oxidase improves intestinal degradation of food-borne biogenic amines in case of histamine intolerance. *Clinical Nutr Suppl* 5: 11.
67. Mateescu MA, Catinescu C, Ispas-Szabo P, et al. (2011) Oral enzyme compositions for intestinal delivery. Canadian patent 2831535.
68. Mondovi B, Fogel WA, Federico R, et al. (2013) Effects of Amino Oxidases in Allergic and Histamine-Mediated Conditions. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 7: 20-34.
69. Jumarie C, Seide M, Marcocci L, et al. (2017) Diamine Oxidase from White Pea (*Lathyrus sativus*) Combined with Catalase Protects the Human Intestinal Caco-2 Cell Line from His-

- tamine Damage. *Appl Biochem Biotechnol* doi: 10.1007/s12010-016-2390-2393.
70. Scibior D, Czeczot H (2006) Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 60: 170-180.
71. Calinescu C, Mondovi B, Federico R, et al. (2012) Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *Int J Pharm* 428: 48-56.
72. Albrecht J (1998) Roles of neuroactive amino acids in ammonia neurotoxicity. *J Neurosci Res* 51: 133-138.
73. Lin HC, Visek WJ (1991) Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *The Journal of nutrition* 121: 887-893.
74. Blenur L, Le Tien C, Marocci L, et al. (2016) Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnol Appl Biochem* 63: 344-353.

ANNEXE B : POSTER N°65 AU SYMPOSIUM DU RESEAU UQ SUR LA  
RECHERCHE BIOMEDICALE ET BIOPHARMACEUTIQUE (10-11 MAI 2018),  
MONT-GABRIEL (QUÉBEC), CANADA

**Stabilisation et modulation des activités catalytiques des enzymes oxydases,  
évaluation par l'approche zymographique.**

Mireille Koudoufio, Canh T. Le, Lucia Marcocci, Paola Pietrangeli, Mircea Alexandru Mateescu

Les oxydases jouent plusieurs rôles importants dans l'organisme et sont utilisées pour des applications biotechnologiques, analytiques, alimentaires. Plusieurs processus de stabilisation sont utilisés car ces enzymes ne sont généralement pas stables, tendent à se dénaturer et perdent leurs activités. La diamine oxydase (DAO, encore appelée histaminase) catalysant la désamination oxydative de l'histamine a été proposée comme agent thérapeutique alternatif pour des histaminoses alimentaires et comme supplément alimentaire pour prévenir les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Des excipients pharmaceutiques ont été proposés visant une délivrance intestinale de la DAO. Le peroxyde d'hydrogène généré comme produit secondaire à la désamination de l'histamine pourrait endommager des cellules ou tissus mais aussi réduire l'activité de l'enzyme. D'où la nécessité d'élaborer des systèmes pour protéger l'enzyme thérapeutique et l'organisme. L'objectif principal dans cette étude a été de stabiliser la DAO en utilisant différents agents émulsifiants (protection par isolement) et antioxydants (protection par réduction du peroxyde d'hydrogène). L'activité de la DAO est principalement déterminée par la méthode zymographique. Les résultats montrent que l'enzyme est non seulement plus stable mais aussi que son activité a été améliorée avec une augmentation significative de plus de 170 %, particulièrement avec la lécithine et la vitamine E. Des résultats similaires ont été obtenus pour la glucose oxydase. Pour des formulations futures, la lécithine et la vitamine B6 seront proposées comme ajouts dans les formulations de DAO, en étant non toxiques, d'origine naturelle et considérées comme GRAS (Generally Recognized as Safe).

**UQAM**

## STABILIZATION AND MODULATION OF OXIDASES: EVALUATION BY ZYMOGRAPHIC APPROACH

**BioMed**

**Mireille D. Koudoufio<sup>1</sup>, T. Canh Le<sup>1</sup>, L. Marcocci<sup>2</sup>, P. Pietrangeli<sup>2</sup>, M. A. Mateescu<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Centre BioMed, Centre PharmaQam & Chaire de recherche sur les dysfonctionnements entériques « Allerdyse », Université du Québec à Montréal, C.P. 3888, Succursale Centre-Ville, Montréal H3C 3P8, Canada

<sup>2</sup>Department of Biochemical Sciences "A Rossi-Fanelli", Sapienza University of Rome, Italy

**INTRODUCTION**

Oxidases are largely used enzymes for several applications. Diamine oxidase (DAO), also known as histaminase, is a copper-containing enzyme that is involved in various regulatory processes such as inactivation of endogenous and exogenous excess of histamine, preventing pseudo-allergic reactions including food histaminosis. Recently, vegetal DAO was proposed as therapeutic agent to treat histamine related dysfunctions. Hydrogen peroxide, one of the by-products of oxidative deamination of histamine catalyzed by DAO, is toxic to intestinal cells and can inactivate the therapeutic enzyme.

**Reaction:**  $\text{Histamine} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Histamine-N}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

**Objectives**

Elaborate systems that can protect DAO and organism against the produced hydrogen peroxide. Verify if these systems can be applied with glucose oxidase (Gox).

**METHODS**

**EMULSIFIER**

SDS, Lecithin, Tween, Gelsolin

**ANTIOXIDANTS**

Phosphatidylserine, Trolox, Sodium ascorbate

Enzyme stabilization by surfactants has many advantages and is used for industrial applications as previous studies suggested the use of surfactant-protein systems as a model of biological membranes (stabilization of the three-dimensional structure of membrane proteins by phospholipids). Several characteristics such as structure, ionic charges, hydrophobicity etc. of surfactants used can affect their ability to participate in stabilization of enzyme.

**DAO activity was increased by the presence of SDS, Lecithin, Tween**

**Gox activity was increased by the presence of SDS, Lecithin, Tween**

**Fig.1. Zymography (A) and Coomassie staining (B) of DAO treated with surfactants (2% SDS, 0.1% Lecithin, 2% Tween) or not on polyacrylamide SDS-PAGE gel (10%). Graphical representation (C) of densitometric intensities of bands gel (A)**

**Fig.4. Zymography (A) with Coomassie staining (B) of glucose oxidase treated with surfactants (2% SDS, 0.1% Lecithin, 2% Tween) or not on SDS-Polyacrylamide (10%) gel. Graphical representation (C) of surfactants presence or not versus the densitometric intensities (%) of bands (gel A).**

**Table 1. Intrinsic specific Activity (ISA) of DAO in absence or presence of 3 emulsifiers agents SDS, Lecithin, Tween**

Sample	Intrinsic Specific Activity (% of control)
DAO+PBS	100
DAO+2%SDS	108.32±0.33
DAO+0.1%Lecithin	117.40±0.10
DAO+2%Tween	117.40±0.10

Treatment with surfactants increased DAO activity by more than 1.6 times.

**DAO activity was increased by biliar salts used**

**Gox activity was increased by the presence of PLP, Trolox, Sodium ascorbate**

**Fig.2. Zymography of DAO in absence or presence of biliar salts (A) on polyacrylamide SDS-PAGE gel (10%) and graphical representation (B) of densitometric analysis of gel (A). Enzyme activity was increased 2 time with 10% of biliar salts**

**Fig.5. Zymography (A) of Gox treated with different concentration of each non-enzymatic antioxidants or not on SDS-Polyacrylamide (10%) gel and graphical representation (C) of each antioxidant versus the densitometric intensities of bands (gel A).**

**Fig.6. Zymography (A) of Gox treated with different concentration of each non-enzymatic antioxidants or not on polyacrylamide SDS-PAGE (10%) gel and graphical representation (B) of densitometric analysis of gel (A).**

**CONCLUSION**

This study confirmed the importance can surfactants and vitamins with antioxidant properties have in stabilization and modulation of enzymes with therapeutic properties or biotechnological applications.

**REFERENCES**

- K. Pietrangeli et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 397 (2009), 174-8
- M. A. Mateescu et al., Canadian patent 2631526 (2011)
- S. Almouzni et al., *Anal. Chem. Acta* 975 (2017), 78-85

**Foundation Cognis**

**PharmaQam**

ANNEXE C : POSTER N°85 AU SYMPOSIUM DU RESEAU UQ SUR LA  
RECHERCHE BIOMEDICALE ET BIOPHARMACEUTIQUE (10-11 MAI 2018),  
MONT-GABRIEL (QUÉBEC), CANADA

**Contrôle de la motilité intestinale par l'histaminase végétale et modulation de  
son activité par le phosphate de pyridoxal.**

Rodolphe Soret, Armelle Nérée Tchoumi, Mireille Koudoufio, Lucia Marcocci,  
Paola Pietrangeli, Nicolas Pilon, Mircea Alexandru Mateescu

L'histamine, une amine biogène issue de la décarboxylation de l'histidine. En réponse à une stimulation par des allergènes, l'histamine est libérée et ainsi régule divers processus biologiques et physiologiques tels que les réponses immunitaire et inflammatoire. L'histamine peut aussi contrôler l'acidité gastrique et des contractions musculaires du tractus gastro-intestinal. Une fois produite, l'histamine est dégradée par des systèmes enzymatiques incluant la diamine oxydase (DAO, histaminase). Les contractions intestinales excessives peuvent être liées aux dysfonctions liées à l'histamine.

**Objectifs :** Le principal but de cette étude était d'investiguer l'effet de la DAO d'origine végétale sur la motilité intestinale exacerbée par l'histamine. Un autre objectif était d'évaluer l'effet bénéfique de la vitamine B6 sur l'activité de la DAO.

**Hypothèse :** La désamination oxydative de l'histamine par la DAO pourrait réduire la quantité d'histamine chez les patients souffrant de l'intolérance à l'histamine et donc diminuer les contractions intestinales douloureuses à l'instar des antihistaminiques couramment utilisés.

**Méthode :** Le tissu obtenu suite à la dissection de la partie distale colique de souris femelle FvB (4-5 semaines), a été placé dans la chambre de motricité et traité avec différentes concentrations d'histamine pour stimuler la motilité. Ensuite, différentes concentrations de DAO ont été ajoutées pour évaluer l'effet antispasmodique en absence ou en présence de pyridoxal phosphate (vitamine B6).

**Résultats :** La DAO limite la motilité intestinale exacerbée par l'histamine et le pyridoxal phosphate augmente cette action bénéfique de la DAO.

**Conclusions :** La DAO apparaît donc comme une enzyme thérapeutique prometteuse comme antispasmodique en cas de dysfonctions entériques liées à l'histamine.

UQÀM

## Contrôle de la motilité intestinale par l'histaminase végétale et modulation de son activité par le pyridoxal phosphate



Rodolphe Soret<sup>1</sup>, Armelle Nérée Tchoumi<sup>2</sup>, Mireille Koudoufio<sup>2</sup>, Lucia Marcocci<sup>2</sup>, Paola Pietrangeli<sup>2</sup>, Nicolas Pilon<sup>1</sup>, Mircea Alexandru Mateescu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Département des sciences biologiques, Centre BioMed et Chaire de recherche sur les maladies génétiques rares, Université du Québec à Montréal (UQAM), CP. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal H3C 3PB, Canada

<sup>2</sup>Département de Chimie, Centre BioMed, Centre Pharmaqam et Chaire de recherche sur les dysfonctionnements entéroïques

x Allerdyz « Université du Québec à Montréal (UQAM), Canada

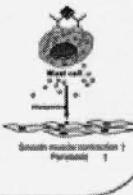
<sup>2</sup>Département des Sciences Biochimiques « Rossi-Fanelli », Università di Roma « Sapienza », Rome, Italy

### INTRODUCTION

L'histamine est une amine biogène issue de la décarboxylation de l'histidine par l'histidine décarboxylase. Elle est naturellement produite par l'organisme puis est stockée dans les vésicules intracellulaires de mastocytes, basophils mais elle peut aussi provenir de l'alimentation. En réponse à divers stimuli, l'histamine est libérée et elle implique dans divers processus biologiques incluant la contraction des muscles lisses, les réponses inflammatoires et immunitaires, etc. L'histamine est dégradée par des systèmes enzymatiques incluant la diamine oxydase (DAO, histaminase). Une déséquilibre de l'héméostasie de l'histamine provoquant son accumulation peut conduire à divers réactions allergiques et dysfonctionnements entraînant avec des symptômes diagnostiqués voire graves. Les contractions intestinales excessives avec diarrhée et vomissements sont parmi ces symptômes. La DAO d'origine végétale a été récemment proposée pour traiter les histaminoses et autres dysfonctionnements dues à l'histamine.

L'objectif principal de cette étude est d'investiguer l'effet de la DAO d'origine végétale sur la motilité intestinale exacerbée par l'histamine.

Un autre objectif est d'évaluer l'effet thérapeutique de pyridoxal phosphate (Vit. B6) sur l'activité de la DAO et vérifier si la DAO peut être également proposée comme agent antigastro-éosinophile en cas de maladies inflammatoires de l'intestin et histaminoses alimentaires.



### APPROCHE EXPERIMENTALE

La partie distale du côlon de souris femelles FVB (4-5 semaines) a été placée dans la chambre de motilité et traitée avec différentes concentrations d'histamine pour stimuler la motilité. Ensuite, différentes concentrations de DAO ont été ajoutées pour évaluer l'effet antigastro-éosinophile en absence ou en présence de pyridoxal phosphate (vitamine B6).



La désamination oxydative de l'histamine par la DAO pourrait réduire la quantité d'histamine chez les patients souffrant de l'intolérance à l'histamine et donc diminuer les contractions intestinales des personnes à l'instar des antihistaminiques couramment utilisés.



### CONCLUSION - PERSPECTIVES

- La motilité intestinale est stimulée par l'histamine
- Réduction de la motilité intestinale exacerbée par le traitement avec DAO
- La DAO apparaît comme enzyme thérapeutique prometteuse et antigastro-éosinophile pour traiter les dysfonctionnements liés à l'histamine
- Comparer la quantité de DAO nécessaire pour normaliser le péristaltisme par rapport à la quantité d'antihistaminique qui induit le même effet
- Vérifier si l'histamine a un effet direct sur le muscle ou si elle induit la contraction via le système nerveux entérique

### Établir la concentration d'histamine nécessaire pour avoir un effet sur le péristaltisme

A)

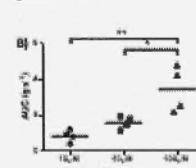
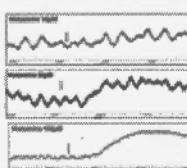


Fig.1. Effet contractile de l'histamine. Réponses contractiles du muscle solaire au traitement avec 3 concentrations d'histamine (A) et représentation graphique des réponses en fonction des concentrations d'histamine (B). Réduction de la contraction musculaire avec les concentrations croissantes d'histamine.

### Établir la concentration d'histaminase nécessaire pour annuler l'effet de l'histamine sur le péristaltisme

A)

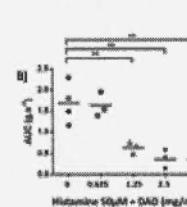
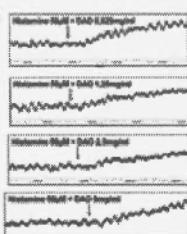


Fig.2. Effet contractile de l'histamine en présence de différentes concentrations d'histaminase. Réponses contractiles du muscle solaire au traitement avec différentes concentrations de DAO après stimulation par l'histamine (10<sup>-6</sup> M) (A) et représentation graphique des réponses en fonction des concentrations d'histaminase (B). Réduction avec les concentrations croissantes d'histaminase de la contraction musculaire élue par l'histamine.

### Étudier l'effet positif de pyridoxal phosphate (PLP) sur l'action antigastro-éosinophile de l'histaminase

A)

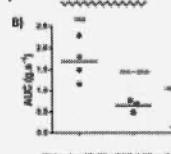
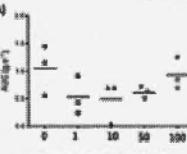


Fig.3. Effet contractile de l'histamine en présence de PLP ou PLP+DAO. Représentation graphique des réponses contractiles du muscle en fonction des concentrations croissantes de PLP (A) et en fonction de la présence de DAO + PLP (B). PLP augmente l'effet antigastro-éosinophile de la DAO.

### REMERCIEMENTS

pharmaqam

SAPIENZA  
Universita di Roma

INSERM  
CRSNG

Fondation Courtois

## BIBLIOGRAPHIE

- Agostinelli, E., Przybytkowski, E. et Averill-Bates, D.A. (1996). Glucose, glutathione, and cellular response to spermine oxidation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 649-656
- Ahmadifar, S., Le, T. C., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M.A. (2017). Zymographic approach to determine the intrinsic enzyme specific activity of diamine oxidase in presence of interfering enzymes. *Analytica Chimica Acta*, 975, 78-85
- Arakawa, T., et Kita, Y. (2000). Protection of bovine serum albumin from aggregation by Tween 80. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, 646-651.
- Argento-Cerù, M. et Autuori, F. (1985). Localization of diamine oxidase in animal tissues. Dans B. Mondovi: Structure and functions of amine oxidases. Boca Raton: CRC Press
- Atanasiu, R., Dumoulin, M-J., Chahine, R., Mateescu, M.A. et Nadeau, R. (1995). Antiarrhythmic effects of ceruloplasmin during reperfusion in the ischemic isolated. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 73, 1253- 1261
- Ball, M.F.G. (2008). Vitamins: Their Role in the Human Body. John Wiley & Sons
- Bam, N.B., Randolph, T.W. et Cleland, J. L. (1995). Stability of protein formulations: investigation of surfactant effects by a novel EPR spectroscopic technique. *Pharmaceutical Research*, 12, 2-11.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. et Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase an overview. *Biotechnology Advances*, 27(4): 489-501.
- Bao, J., Furumoto, K., Yoshimoto, M., Fukunaga, K. et Nakao, K. (2003). Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 69–72
- Befani, O., Sabatini, S., Mateescu, M.A. et Mondoví, B. (1989). Peculiar effects of temperature and polyvinylalcohol on the activity of bovine serum amine oxidase.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 163, 1168-1174

Beltramini, M., Colangelo, N., Giomi, F., Bubacco, L., Di Muro, P., Hellmann, N., Jeanicke, E. et Decker, H. (2005). Quaternary structure and functional properties of Penaeus monodon hemocyanin. Federation of European Biochemical Societies Journal, 272, 2060-2075.

Bender, D.A. (1992). Nutritional biochemistry of the vitamins. Cambridge: Cambridge University Press.

Bender, D.A. (2003). Vitamin B6/Physiology. Encyclopedia of Food sciences and Nutrition (second edition).

Benedetti, M.S. et Dostert, P. (1989). Monoamine oxidase, brain ageing and degenerative diseases. Biochemical Pharmacology, 38, 555-561.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. et Stryer, L. (2007). Biochemistry, 6th edition, New York: W. H. Freeman and company.

Berry, M.D., Juorio, A.V. et Paterson, I.A. (1994). The functional role of monoamine oxidases A and B in the mammalian central nervous system. Progress in Neurobiology, 42, 375-391.

Billett, E.E. (2004). Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. Neurotoxicology, 25, 139-48.

Blaschko, H. et Buffoni, F. (1965). Pyridoxal phosphate as a constituent of the histaminase (benzylamine oxidase) of pig plasma. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 163, 45-60

Blemlur, L., Le, T.C., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M.A. (2015). Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. Biotechnology and Applied Biochemistry, 63, 344-353

Blunk JA, Schmelz M, Zeck S, Skov P, Likar R. et Koppert, W. (2004). Opioid-induced mast cell activation and vascular responses is not mediated by mu-opioid receptors: an *in vivo* micro dialysis study in human skin. Anesthesia and Analgesia, 98, 364-370

Brennan, J.D., Benjamin, D., DiBattista, E. et Gulcev, M. D. (2003). Using Sugar and Amino Acid Additives to Stabilize Enzymes within Sol-Gel Derived Silica. Chemistry of Materials, 15, 737-745

- Buffoni, F. (1990). Nature of the organic cofactor of pig plasma benzylamine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1040 (1), 77-83.
- Buffoni, F. (2009). History. Dans G. Floris et B. Mondovi. *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology*. Boca Raton : CRC Press.
- Cadenas, E. et Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 222-230
- Calinescu, C., Mondovi, B., Federico, R., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M.A. (2012). Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 428, 48-56
- Calinescu, C., Federico, R., Mondovi, B. et Mateescu, M. A. (2009). Zymographic assay of plant diamine oxidase on entrapped peroxidase polyacrylamide gel electrophoresis. A study of stability to proteolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1281-1290
- Carpenter, J.F. et Chang, B.S. (1996). Lyophilization of protein pharmaceuticals. *Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing, and Preservation*, K.E. Avis and V.L. Wu, eds., Interpharm Press, Buffalo Grove, IL
- Casale, T.B., Bowman, S. et Kaliner, M. (1984). Induction of human cutaneous mast cell degranulation by opiates and endogenous opioid peptides: Evidence for opiate and nonopiate receptor participation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73, 775-781.
- Cash, K.J. et Clark, H.A. (2010). Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, 16, 584-593
- Cass, A.E.G., Francis, D.G., Hill, H.A.O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L. et Turner, A.P.F. (1984). Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose. *Analytical Chemistry*, 56, 667-671.
- Chang, B.S., Kendrick, B.S. et Carpenter, J.F. (1996). Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1325.
- Chawla, A.S., Hinsberg, I. Blaise, P. et Johnson, P. (1985). Aggregation of insulin, containing surfactants in contact with different materials. *Diabetes*, 34, 420-424

- Cheng, W., Zheng, X. et Yang, M. (2016). Hydrogen Peroxide Induced Protein Oxidation During Storage and Lyophilization Process. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 1837-1842
- Cogoni, A., Piras, C., Farni, R., Melis, A. et Floris, G. (1990). *Hordeum vulgare* seedlings amine oxidase. Purification and properties. *Plant Physiology*, 93, 818-821.
- Contois, J. (2010). Method for measuring lipoprotein-specific apolipoproteins. US patent 2010/0323376 A1
- Cooper, R.A., Knowles, P.F., Brown, D.E., McGuirl, M.A. et Dooley, D.M. (1992). Evidence for copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal*, 288, 337-340
- Cooper, G.M. (2000). Structure of the Plasma Membrane. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates
- Costa, S., Tzanov, T.Z., Paar, A., Gudelj, M., Gubitz, G.M. et Cavaco-Paulo, A. (2001). Immobilization of catalases from *Bacillus SF* on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 815-819.
- Courjean, O. et Mano, N. (2011) Recombinant glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* for efficient bio electrochemical applications in physiological conditions. *Journal of Biotechnology*, 151, 122-9
- Datta, S., Christena, R. L. et Rajaram, S.R.Y. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3, 1-9
- Davis, G.K. et Mertz, W. (1987). Copper. Dans W. Mertz: Trace elements in human and animal nutrition, New York: Academie Press.
- De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D.E. et Mattevi, A. (2005). Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 12684-12689.
- Dijkman, P.W., de Gonzalo, G., Mattevi, A. et Fraaije, W.M. (2013). Flavoprotein oxidases: classification and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 5177-5188

- Druce, H.M. et Kaliner, M.A.(1988). Allergic rhinitis. Journal of the American Medical Association, 259, 260-263.
- Du, Y., Luo, X.L., Xu, J.J. et Chen, H.Y. (2007). A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor. Bioelectrochemistry., 70, 342-347.
- Federico, R., Befani, O., Mondovi, B., Mulhbacher, J. et Mateescu, M.A. (2000). Immobilization of plant histaminase for medical applications. Inflammation Research, 49, S60-S61.
- Fogel, W.A. et Lewinski, A. (2006). The effects of diamine oxidase administration on experimental ulcerative colitis in rats. Inflammation Research, 55, S63-S64.
- Fogel, W.A., Toporowska-Kowalska, E. et Stasiak, A. (2009). Copper amine oxidases in intestinal diseases. Dans G. Floris et B. Mondovi: Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology, Boca Raton: CRC Press.
- Fowler, J.S., Volkow, N.D., Wang, G.J., Logan, J., Pappas, N., Shea, C. et MacGregor, R. (1997). Age-related increases in brain monoamine oxidase B in living healthy human subjects. Neurobiology of Aging, 18, 431-435
- Frew, J.E. et Hill, H.A.O. (1987). Electrochemical Biosensors. Analytical chemistry, 59, 933A-944A.
- Friedrich, W. (1988). Vitamins. Edition Walter de Gruyter
- Genovese A., Stellato C., Marsella, A.C., Adt, M. et Marone, G. (1996). Role of Mast Cells, Basophils and Their Mediators in Adverse Reactions to General Anesthetics and Radiocontrast Media. International Archives of Allergy and Immunology, 110, 13-22.
- Gildon, N.B. Et Vanarsdel, P.P. (1961). Histamine metabolism. California Medicine, 95, 237-238
- Gliszczynska-Świgło, A. (2006). Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. Food Chemistry, 96, 131- 136

- Glover, V., Sandler, M., Owen, F. et Riley, G.J. (1977). Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature*, 265, 80-81.
- Helenius, A. et Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 415, 29-79
- Honzawa, Y., Nakase, H., Matsuura, M. et Chiba, T. (2011). Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17, E23-E25.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D. et Scrimgeour, K.G. (1994). *Principes de Biochimie*. De Boeck Université, Bruxelles.
- Huang, H.Y., Caballero, B., Chang, S., Alberg, A.J., Semba, R.D., Schneyer, C., Wilson, R.F., Cheng, T.Y. et Prokopowicz, G. (2007) Multivitamin/Mineral supplements and prevention of chronic disease: executive summary. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 265S-268S.
- Huisman, G.W. et Collier, S.J. (2013). On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17, 284 – 292
- Ilett, K.F., George, C.F. et Davies D.S. (1980). The effect of monoamine oxidase inhibitors on 'first- pass' metabolism of tyramine in dog intestine. *Biochemical Pharmacology*, 29, 2551-2556.
- Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis principles and Applications*. Springer, New-York, 57, 74-76.
- Israelachvili, J. (1986). Physical Principles of Surfactant Self-Association Into Micelles, Bilayers, Vesicles and Microemulsion Droplets. In: Mittal K.L., Bothorel P. (eds) *Surfactants in Solution*. Springer, Boston, MA
- Johnston, C.S. (1996). The antihistamine action of ascorbic acid. *Subcellular Biochemistry*, 25, 189–213
- Jones, M. N. (1975). Surfactants in membrane solubilisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 177, 137-159
- Jones, L.S., Bam, N.B. et Randolph, T.W. (1997). Surfactant-stabilized protein formulations: A review of protein-surfactant interactions and novel analytical methodologies, in: *Therapeutic Protein and Peptide Formulation and Delivery*. Z.

- Shahrokh, V. Sluzky, J. L. Cleland, S. J. Shire and T. W. Randolph, eds. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Jumarie, C., Séide, M., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M.A. (2017). Diamine Oxidase from White Pea (*Lathyrus sativus*) Combined with Catalase Protects the Human Intestinal Caco-2 Cell Line from Histamine Damage. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182, 1171-1181
- Kaliner, M. (1985). Mast cell mediators and asthma. *Chest®*, 87(suppl):2S-5S.
- Kaplan, A.P. (1988). Urticaria and angioedema. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, eds. Allergy; principles and practice. 3rd ed. St. Louis: The CV Mosby Co, 1377-1401
- Kim, M., Okajima, T., Kishishita, S., Yoshimura, M., Kawamori, A., Tanizawa, K. et Yamaguchi, H. (2002). X-ray snapshots of quinone cofactor biogenesis in bacterial copper amine oxidase. *Nature Structural Biology*, 9, 591-596.
- Kivirand, K. et Rinken, T. (2007). Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Chemistry*, 56, 164-171
- Klinman, J.P. et Mu, D. (1994). Quinoenzymes in biology. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 299-344.
- Komericki, P., Klein, G., Reider, N., Hawranek, T., Strimitzer, T., Lang, R., Kranzelbinder, B. et Aberer, W. (2011). Histamine intolerance: Jack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: a randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wien Klin Wochenschr*, 123, 15-20.
- Konan, K.V., Le Tien, C. et Mateescu, M.A. (2016). Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Analytical Methods*, 8, 5638-5644
- Kovacova-Hanuscova, E. Buday, T. Gavliakova, S. et Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia (Madr.)*, 43: 498-506
- Krugliakov, P. (2000). Hydrophile-Lipophile Balance of Surfactants and Solid Particles: Physicochemical Aspects and Applications Amsterdam, Elsevier Science.

- Kumar, V., Dooley, D.M., Freeman, H.C., Guss, J.M., Harvey, I., McGuirl, M.A., Wilce, M.C.J. et Zubak, V. (1996). Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution-Structure., 4, 943–955
- Lange, K.R. (1999). Surfactants: A Practical Handbook, Hanser.
- Lange, J. et Wittmann, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372, 276-283
- Laurent, J. (1982) Les enzymes, production et utilisations industrielles. Gauthier-villars, France, 51-52, 53-54
- Le Tien, C., Mateescu, M. A., Ahmadifar, S., Marcocci, L. et Pietrangeli, P. (2018). Zymographic determination of Intrinsic Specific Activity of Oxidases in Presence of Interfering Proteins in Protein Gel Detection and Imaging. In: B. Kurien & H. Scofield (eds) Methods and Protocols. Humana Press, Springer Nature, Switzerland.
- Lehane, L. et Olley, J. (2000) Histamine fish poisoning revisited. International Journal of Food Microbiology, 58, 1–37
- Lehninger, A.L. (1982). Principles of biochemistry. Worth Publishers, New-York.
- Leonida, M. et Mateescu, M.A. (2006). Drug release profiles from chitosan-carboxymethyl-starch matrices stabilized by ionic interactions. Transactions of the 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society #827
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. et Wang, X. (2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2, 1-11
- Lin, Y., Lu, F., Tu, Y. et Ren, Z. (2004). Glucose Biosensors Based on Carbon Nanotube Nanoelectrode Ensembles. Nano Letters (American Chemical Society), 4, N° 2
- Loughheed, W.D., Albisser, A.M., Martindale, H.M., Chow, J.C. et Clement, J.R. (1983). Physical stability of insulin formulations. Diabetes, 34, 424.
- Mahy, N., Andres, N., Andrade, C. et Saura, J. (2000). Age-related changes of MAO-A and -B distribution in human and mouse brain. Neurobiology (Budapest, Hungary), 8, 47-54.

- Maintz, L. et Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. American Journal of Clinical Nutrition, 85, 1185-1196.
- Makino, N. (1985). An oxygenation-linked dye binding to Limulus polyphemus hemocyanin. European Journal of Biochemistry, 146, 563-569.
- Markl, J., savel, A., Knabe, B., Storz, H., Krabbe, T., Abel, S. et Markl, B. (1986). Mercury ions-a tool to study the specific role of individual subunits in the allosteric interaction of arthropod hemocyanins. Invertebrate oxygen carriers, Heidelberg : Springer, 403-406
- Male, K.B., Bouvrette P., Luong J.H.T. et Gibbs B.F. (1996). Amperometric biosensor for total histamine, putrescine and cadaverine using diamine oxidase. Journal of Food Science, 61, 1012-1016
- Mano, N. (2012). Features and applications of bilirubin oxidases. Applied Microbiology and Biotechnology, 96, 301-307
- Martinek, K., Klibanov, A.M., Goldmacher, V.S. et Berezin, I.V. (1977). The principles of enzyme stabilization. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. Biochimica et Biophysica Acta, 485, 1-12
- Martinek, K., Klyachko, N.L., Kabanov, A.V., Khmelnitsky, Y.L. et Levashov, A.V. (1989). Micellar enzymology: its relation to membranology. Biochimica et Biophysica Acta, 981, 161-172
- Martner-Hewes, P.M., Hunt, I.F., Murphy, N.J., Swendseid, M.E. et Settlage, R.H. (1986). Vitamin B-6 nutriture and plasma diamine oxidase activity in pregnant Hispanic teenagers. American Journal of Clinical Nutrition, 44, 907-913.
- Masini, E., Vannacci, A., Giannini, L., Befani, O., Nistri, S., Alexandru Mateescu, M., Marinaioni, P.F., Mondovi, B. et Federico, R. (2004). Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. European Journal of Pharmacology, 502, 253-264.
- Mateescu, M.A., Koudoufio, D.M., Tchoumi Neree, A. et Mondovi, B. (2017). Plant Histaminase as Bioactive Agent to Lower the Histamine Level: A Mini-Review. Journal of Gastroenterology Research, 1, 34-41
- Mateescu, M.A., Calinescu, C., Ispas-Szabo, P., Mondovi, B. et Rodolfo, F. (2018). Oral enzyme compositions for intestinal delivery. US patent 9 878 040.

- Mateescu, M.A., Chahine, W., Roger, S., Atanasiu, R., Yamaguchi, N., Lalumiére, G. et Nadeau, R. (1995). Protection of myocardial tissue against deleterious effects of oxygen free radicals by ceruloplasmin. *Arzneim.-Forsch./Drug Research*, 45, 476-480.
- Matos, M., Simpson, B.K., Ramírez, H.L., Cao, R., Torres-Labandeira, J.J. et Hernández, K. (2012). Stabilization of glucose oxidase with cyclodextrin-branched carboxymethylcellulose. *Biotecnología Aplicada*, 29, 29-34.
- McClements, D.J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. CRC Press, 2<sup>nd</sup> edition.
- McGrath, A.P., Hilmer, K.M., Collyer, C.A., Dooley, D.M. et Guss, J.M. (2010). A new crystal form of human diamine oxidase. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 66, 137-142.
- McGuirl, M.A., McCahon, C.D., McKeown, K.A. et Dooley, D.M. (1994). Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies. *Plant Physiology*, 106, 1205-1211
- Mohamad, N.R., Che Marzuki, N.H., Buang, N.A., Huyop, F. et Abdul Wahab, R. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29, 205-220
- Mondovi, B., Rotilio, G., Costa, M.T., Finazzi-Agrò, A., Chiancone, E. et Hansen, R.E. (1967). Diamine oxidase from pig kidney. *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 1160-1167.
- Mondovi, B., Befani, O., Gerosa, P. et Mateescu, M.A. (1992). Specific temperature dependence of diamine oxidase activity and its thermal stability in the presence of polyvinylalcohol. *Agents Actions*, 37, 220-226
- Mondovi, B., Fogel, W.A., Federico, R., Calinescu, C., Mateescu, M.A., Rosa, A.C. et Masini, E. (2013). Effects of Amine Oxidases in Allergic and Histamine-Mediated Conditions. *Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery*, 7, 20-34
- Moosavi-Movahedi, A.A. (2005). Thermodynamics of protein denaturation by sodium dodecyl sulfate. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2, 189-196

- Morris, N.J., Ducret, A., Aebersold, R., Ross, S.A., Keller, S.R. et Lienhard, G.E. (1997). Membrane amine oxidase cloning and identification as a major protein in the adipocyte plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 9388-9392.
- Mu, D., Medzihradzky, K.F., Adams, G.W., Mayer, P., Hines, W.M., Burlingame, A.L., Smith, A.J., Cai, D. et Klinnan, J.P. (1994). Primary structures for a mammalian cellular and serum copper amine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 9926-9932.
- Munnich, A., Ogier, H. et Saudubray, J.M. (1987). Les vitamines : Aspects métaboliques, nutritionnels et thérapeutiques. Editions Masson, Paris.
- Nakama, Y. (2017). Surfactants. In: K. Sakamoto, Robert Y. Lochhead, Howard I. Maibach, Y. Yamashita (eds) Cosmetic science and Technology. Elsevier, 231-244.
- Nicotra, A., Pierucci, F., Parvez, H. et Senatori, O. (2004). Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology*, 25, 155-165
- Niraj, M.M., Pandey, G. et Pandey, S. (2012). Histamine biosensor: a review. *International journal of Pharmaceutical sciences and research*, 11, 4158-4168.
- Nordwald, E.M. et Kaar, J.L. (2013). Stabilization of Enzymes in Ionic Liquids Via Modification of Enzyme Charge. *Biotechnology and Bioengineering*, 110, 2352-2360
- Page, S., Ammit, A.J., Black, J.L. et Armour, C.L. (2001). Human mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281, L1313-L1323.
- Parsons, M.R., Convery, M.A., Wilmot, C.M., Yadav, K.D.S., Blakeley, V., Corner, A.S., Philips, S. et Knowles, P.F. (1995). Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of Escherichia coli at 2 Å resolution. *Structure*, 3, 1171-1184.
- Patange, S.B., Mukundan, M.K. et Kumar, K.A. (2005). A simple and rapid method for calorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food Control*, 16, 465-472
- Peel, T. (2006). Vitamin C: New Research. Nova Publishers.

- Peterson, M.E., Daniel, R.M., Danson, M.J. et Eisenthal, R. (2007). The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *Biochemical Journal*, 402, 331– 337
- Pietrangeli, P., Nocera, S., Fattibene, P., Wang, X., Mondovi, B. et Morpurgo, L. (2000). Modulation of bovine serum amine oxidase activity by hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267, 174-178
- Pietrangeli, P., Federico, R., Mondovi, B. et Morpurgo L. (2007). Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 997–1004
- Pollegioni, L., Molla, G., Sacchi, S., Rosini, E., Verga, R. et Pilone, MS. (2008). Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnoloy*, 78, 1-16
- Qian, Z.M., et Ke, Y. (2001). Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 35, 287-294
- Randolph, T.W. et Jones, L.S. (2002) Rational Design of Stable Protein Formulations, surfactant-Protein Interactions. *Pharmaceutical Biotechnology*, 13, 159-175
- Reach, G. et Wilson, G.S. (1992). Can continuous glucose monitoring be used for the treatment of diabetes. *Analytical Chemistry*, 64, 381A-384A.
- Reichrath, J., Lehmann , B., Carlberg, C., Varani, J. et Zouboulis, C.C. (2007). Vitamins as hormones. *Horm Metab Res.*, 39, 71-84
- Rosen, M. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. (2004). 3rd edition, Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.
- Sasso, S.V., Pierce, R.J., Walla, R. et Yacynych, A.M. (1990). Electropolymerized 1,2-Diaminobenzene as a Means to Prevent Interferences and Fouling and to Stabilize Immobilized Enzyme in Electrochemical Biosensors. *Analytical Chemistry*, 62, 1111-1117
- Salvato, B. et Beltramini, M. (1990). Hemocyanin: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site. *Life Chemistry Reports*, 8, 1-4 7.
- Sanchez, D., Ganfomina, M.D., Gutierrez., G. et Bastani, M.J. (1998). Molecular characterization and phylogenetic relationship of a protein with potential oxygen-

- binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects? Molecular Biology and Evolution, 15, 415-426.
- Saura, J., Richards, J.G. et Mahy, N. (1994) Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs. Neurobiology of Aging, 15, 399-408.
- Scoccianti, V., Torrigiani, P. et Bagni, N. (1990). Distribution of diamine oxidase activity and polyamine pattern in bean and soybean seedlings at different stages of germination. Physiologia Plantarum, 80, 515-519.
- Seddon, A.M., Curnow, P. et Booth, P.J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. Biochimica et Biophysica Acta, 1666, 105-117.
- Sehgal, P. Mogensen, J.E. et Otzen, D.E. (2005). Using micellar mole fractions to assess membrane protein stability in mixed micelles. Biochimica et Biophysica Acta, 1716, 59-68.
- Senra Valera, A., Bosco Lopez Saez, J.J. et Quintela Senra, D. (1997). Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer. Cancer Letters, 121, 139-145
- Singer, S.J. et Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 175, 720-731
- Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R. et Damborsky, J. (2013). Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. ACS Catalysis, 3, 2823-2836
- Takemori, S., Furuya, E., Suzuki, H. et Katagiri, M. (1967). Stabilization of Enzyme Activity by an Organic Solvent. Nature, 215, 417-419
- Tchoumi Neree, A., Pietrangeli, P., Ispas Szabo, P., Mateescu M.A. et Marcocci, L. (2018). Stability of Vegetal Diamine Oxidase in Simulated Intestinal Media: Protective Role of Cholic Acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66, 12657-12665
- Thomsen, LL. (1997). Investigations into the role of nitric oxide and the large intracranial arteries in migraine headache. Cephalgia, 17, 873-895.
- Thomsen, LL. et Olesen, J. (2001). Nitric oxide in primary headaches. Current Opinion in Neurology, 14, 315-321

- Tombelli, S. et Mascini, M. (1998). Electrochemical biosensors for biogenic amines: A comparison between different approaches. *Analytica Chimica Acta*, 358(3), 277–284.
- Torchilin, V.P., Maksimenko, A.V., Smirknov, V.N., Berezin, I.V., Klibanov, A.M. et Martinek, K. (1978). The principles of enzyme stabilization. III. The effect of the length of intra-molecular cross-linkages on thermostability of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 552, 277-283
- Triantafyllou, A.O., Wehtje, E., Adlercreutz, P. et Mattiasson, B. (1997). How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media? *Biotechnology and Bioengineering*, 54, 67–76.
- Tsujii, K. (1998). *Surface Activity: Principles, Phenomena and Applications*, Academic Press.
- Turner, N.J. (2001). Enantioselective oxidation of C-O and C-N bonds using oxidases. *Chemical Reviews*, 111, 4073-4087
- Twardowski, Z.J., Nolph, K.D., McGary, T.D. et Moore, H.L. (1983). Nature of insulin binding to plastic bags. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 40, 579-582.
- Umbreit, J.N. et Strominger, J.L. (1973). Relation of Detergent HLB Number to Solubilization and Stabilization of D-Alanine Carboxypeptidase from *Bacillus subtilis* Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70, 2997-3001.
- Van Holde, K.E. et Miller, K.I. (1995). Hemocyanins. *Advances in Protein Chemistry*, 47, 1-81.
- Vianello, F., Dipaolo, M.L., Stevanato, R., Gasparini, R. et Rigo, A. (1993). Purification and Characterization of Amine Oxidase from Soybean Seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307, 35-39.
- Voet, D. et Voet, J.G. (2004) *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> edition, Wiley
- Voet, D., Voet, J.G. et Pratt, W.C. (2011) *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, 4th Edition: *Life at the Molecular Level*, Wiley.
- Wang, J. (2001). Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis*, 13, 983-988
- Webb et Edwin, C. (1992). Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and

- Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. San Diego, International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press. ISBN 0-12-227164-5.
- White, M.V. (1990). The role of histamine in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 86, 599-605
- Williams, D.M., Loukopoulos, D., Lee, G.R. et Cartwright, G.E. (1976). Role of copper in mitochondrial iron metabolism. *Blood*, 48, 77-85.
- Wimmerová, M. et Macholán, L. (1999). Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedling amine oxidase: A novel approach for enzyme immobilization. *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 695-702.
- Wong, C. M., Wong, K. H. et Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 927-938
- Wong, S.S. et Wong, L.J.C. (1992). Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 866-874
- Yoo, E-H. et Lee, S-Y. (2010). Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, 10, 4558-4576
- Yu, P.H., Wright, S., Fan, E.H., Lun, Z.R. et Gubisne-Harberle, D. (2003). Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1647, 193-199.
- Zardeneta, G. et Horowitz, P.M. (1994). Protein Refolding at High Concentrations Using Detergent/Phospholipid Mixtures. *Analytical Biochemistry*, 218, 392-398.
- Zhang, Y., Hu, Y. et Wilson, S.J. (1994). Elimination of the Acetaminophen Interference in an Implantable Glucose Sensor. *Analytical Chemistry*, 66, 1183-1188