UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DIAMINE OXYDASE VÉGÉTALE : MÉCANISME D'ACTION ET PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES

THÈSE PRÉSENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR ARMELLE TCHOUMI NEREE

MARS 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). 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

Cette thèse a été réalisée grâce à : *(i)* La bourse de «formation de doctorat» pour trois ans du Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS), *(ii)* Une bourse de dépannage et une autre de mobilité internationale de quatre mois du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA) Regroupement Stratégique Québécois subventionné par le FRQNT 'Fonds de Recherche du Quebec-Nature et Technologies', *(iii)* Une bourse de mobilité internationale de quatre mois du ministère de l'Éducation et de l'Enseignement supérieur du Québec (MEES), *(iv)* Aux différentes missions à l'international financées par le Ministère des Affaires étrangères et de la Coopération Internationale (MAECI) de l'Italie et par le Ministère des Relations Internationales et de la Francophonie (MRIF) du Québec et *(v)* Fonds de recherche de la Fondation Courtois attribués au laboratoire de mon directeur de thèse.

Dans le cadre de ce projet, je souhaite exprimer ma gratitude envers mon directeur de recherche, le professeur Mircea Alexandru Mateescu, de m'avoir acceptée dans son laboratoire et de m'avoir accordée un soutien sans faille durant mes études doctorales. Je tiens précisément à lui exprimer ma gratitude pour ses conseils avisés, son soutien inconditionnel et sa confiance. Par la même occasion, je profite pour remercier le défunt Professeur Emerite, Docteur Honoris causa Bruno Mondovi (paix à son âme), la Professeure Lucia Marcocci et la Dre Paola Pietrangeli de l'Université de Rome «Sapienza » en Italie de m'avoir accueillie et formée dans leur laboratoire à Rome. Les Dres Lucia Marcocci et Paola Pietrangeli ont été une bouffée d'énergie fraîche pour mon projet de thèse et mon épanouissement personnel à Rome. De plus, Je les remercie pour la patience qu'elles ont eu à mon égard pour la compréhension de la langue et l'adaptation au laboratoire.

Je remercie la professeure Cathérine Jumarie pour ses différentes contributions dans ce projet et je remercie également les professeurs associés du laboratoire d'accueil : la Dre Pompilia Ispas-Szabo et le Dr Tien Canh Le. Merci à Pompilia pour sa disponibilité, ses idées pour le Projet, son soutien, et son souci pour un laboratoire solidaire et dynamique. Merci à Canh pour le fait d'avoir suscité mon esprit critique et de toujours parler de la science à toutes les rencontres.

Je remercie les membres du Jury; la professeure Marta Cerruti de l'Université de McGill, le professeur Said Kourrich de l'UQAM et le médecin-professeur Prévost Jantchou de l'hôpital Sainte Justine (UdeM). Merci pour le temps que vous avez consacré (malgré la pandémie de COVID-19) à l'évaluation de ma thèse et pour les différents commentaires mentionnés afin d'améliorer mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues de laboratoire (passés et présents) pour leur aide et leur soutien. Un gros merci particulier pour Mariela Gomez, Marc André Labelle, Meriem Megoura, Kouadio Victorien Konan, Mireille Koudoufio, Nassim Benyerbah, Elena Rezaei, Paul Chomdom. Merci Meriem pour cette bouffée d'énergie arrivée au bon moment!

Un merci chaleureux à la professeure Joanne Paquin (Ex-directrice du programme), le professeur François Ouellet (Directeur actuel du programme), le Sous-comité d'admission et d'évaluation (SCAE) du programme de Biochimie, Mme Cécile Crost (Coordonnatrice du CRIPA), à tou(te)s les technicien(ne)s et les membres du service administratif du département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'UQAM; incluant Louise, Isabelle, Luc, Chantal, Sophie, Élisabeth, Pascale et Sonia.

Lors de mes différents séjours à Rome (Italie) j'ai fait la connaissance d'Anca, de Maurizio et des Sœurs de la Sainte Famille de Bordeaux (Antonetta, Antonieta, Wini, Stella Maris, Celeste, Pascaline, Tonina et Maria) qui m'ont ouvert les portes de leur «*casa*». De ce fait, j'aimerai les remercier pour leur hospitalité, leur attention et leur sérénité dans ma vie. La vie à Rome n'aurait pas été si belle si vous ne m'aviez pas

accueillie au sein de votre communauté et de vos cœurs «Mi sono sentita veramente a casa».

DÉDICACE

À la femme dans la recherche scientifique À la femme africaine dans la recherche À l'épouse dans la vie de recherche À la mère dans la recherche À la femme À la femme

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURESx			
LISTE DES TABLEAUXxiv			
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMESxv			
RÉSUMÉ			
ABSTRACTxviii			
INTRODUCTION			
CHAPITRE I REVUE DE LA LITTÉRATURE			
1.1 Histamine et maladies inflammatoires de l'intestin			
1.1.1Origine endogène et exogène de l'histamine31.1.2Récepteurs histaminiques81.1.3Rôle de l'histamine121.1.4Dysfonctions liées à l'histamine141.1.5Méthodes préventives et curatives des affections dûes à l'histamine22			
1.2 Amine oxydases			
1.2.1Classification des amine oxydases			
1.3 Modèle <i>in vitro</i> pour investiguer les applications de la diamine oxydase végétale (vDAO) : les cellules Caco-2			
1.3.1Présentation générale de l'intestin grêle391.3.2Épithélium intestinal401.3.3Modèle d'étude <i>in vitro</i> 41			
1.4 Projet de recherche 45			
1.4.1Problématique451.4.2Hypothèses de travail451.4.3Objectifs de recherche46			

CH (DA	APITR AO) IN	E II ARTICLE I: «STABILITY OF VEGETAL DIAMINE OXIDASE SIMULATED INTESTINAL MEDIA: PROTECTIVE ROLE OF	
ĊH	OLIC A	ACIDS»	50
2.1	Résu	mé	52
2.2	Abst	ract	52
2.3	Intro	duction	53
2.4	Mate	rials and Methods	56
	2.4.1	Chemicals and reagents	56
	2.4.2	DAO purification and characterization	56
	2.4.3	Incubation of DAO in the different simulated intestinal media	56
	2.4.4	Assay of DAO activity: measurement of H_2O_2 formation by DCHBS-	
	2 4 5	AAP-HRP method using putrescine as a substrate	57
	2.4.5	Assay of DAO activity : measurement of benzaldehyde formation using	50
	216	Denzylamine as a substrate	58
	2.4.0 2 4 7	Preparation of extracts from rat intestinal content (FIC)	59
	2.4.8	Particles size measurement	59
	2.4.9	Effect of simulated intestinal media on H ₂ O ₂ detection by DCHBS-	
		AAP-HRP method	59
	2.4.10	Production of H ₂ O ₂ by DAO incubated with pancreatin	60
2.5	Resu	Its and Discussion	60
CH	APITR	E III ARTICLE II: «VEGETAL DIAMINE OXIDASE ALLEVIATES	
HIS	TAMI	NE-INDUCED CONTRACTION OF COLONIC MUSCLES»	75
3.1	Résu	mé	77
3.2	Abst	ract	78
3.3	Intro	duction	79
3.4	Mate	rial and Methods	81
	3.4.1	Materials	81
	3.4.2	Purification of vegetal diamine oxidase	82
	3.4.3	Chemical deactivation of vDAO	82
	3.4.4	Histamine oxidative decomposition by vDAO	82
	3.4.5	Animal housing and treatments	82
	3.4.6	Preparation of intestine homogenates	83
	3.4.7	Assay of DAU activity	83
	3.4.8	<i>Ex vivo</i> effect of DAO and other agents on muscle contractility activated by histamine	85
		by mstamme	05

	3.4.9	Investigation of pyridoxal-5-phosphate (PLP) interaction with histamine
	3.4.10	<i>In vivo</i> analysis of rectally administered vDAO
	3.4.11	Statistics
3.5	Resu	lts
	3.5.1	Activity of endogenous iDAO is lower in the colon
	3.5.2	vDAO is a potent inhibitor of histamine-induced colon muscle
	3.5.3	contractions <i>ex vivo</i>
		effect on muscle contractions
	3.5.4	vDAO effect can be further increased by PLP
	5.5.5	mucosa
3.6	Disc	ussion
СН	APITR	E IV ARTICLE III: «VEGETAL DIAMINE OXIDASE AS
MC	DULA	TOR OF HISTAMINE-INDUCED CALCIUM RELEASE IN CACO-2
CE	LL LIN	IES»
4.1	Résu	105 mé
4.2	Abst	ract
4.3	Intro	duction107
4.4	Mate	rials and Methods109
	4.4.1	Materials
	4.4.2	Vegetal diamine oxidase purification
	4.4.3	Determination of vDAO activity
	4.4.4	Differentiation of Caco-2 cultured cells and treatment for measurement of Ca^{2+} flow 110
	4.4.5	Image acquisition and analysis
4.5	Resu	lts
	4.5.1	Internalization of fluorescent Fluo-4 probe by Caco-2 cells
	4.5.2	vDAO prevents histamine-induced stimulation of intracellular Ca ²⁺
	153	mobility
1.0	4.5.5	Effect of desionataume on instamme-induced Ca Signal
4.6	Conc	119
СН	APITR	E V DISCUSSION GENERALE121
5.1	Effet	s bénéfiques de la DAO124
5.2	Effet	s bénéfiques de la DAO sur la dysmotilité intestinale de souris126

5.3	DAO inhibe la motilité du Ca ²⁺ intracellulaire induite par l'histamine	128
CON	CLUSION ET PERSPECTIVES	132
BIBL	JOGRAPHIE	134

LISTE DES FIGURES

Figure

Page

1.1	Structure chimique de l'histamine	4	
1.2	Biosynthèse de l'histamine		
1.3	Cellules sécrétrices d'histamine	5	
1.4	Dégranulation de l'histamine par les mastocytes activés	6	
1.5	Organisation générale de la barrière intestinale	7	
1.6	Récepteur à sept domaines transmembranaires.	8	
1.7	Récepteurs histaminiques et principales voies de signalisation	9	
1.8	L'activation de H2 stimule la synthèse de l'acide gastrique	13	
1.9	Les différents profils de l'histamine ingérée au niveau intestinal	15	
1.10	Présentation générale des deux principaux types de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	17	
1.11	Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	18	
1.12	Présentation générale de la maladie de Crohn.	19	
1.13	Extraction de polypes.	20	
1.14	La colite ulcéreuse. Les différents sites d'inflammation en cas de la colite ulcéreuse.	21	
1.15	Structure secondaire de la N ¹ -acétylpolyamine oxydase	24	
1.16	Mécanisme d'action de l'acétylpolyamine oxydase	25	
1.17	Structure secondaire de la monoamine oxydase B	26	
1.18	Mécanisme d'action de la D-amino acide oxydase.	27	
1.19	Structure secondaire de la D-amino acide oxydase	27	
1.20	Mécanisme d'action des polyamines oxydases.	28	
1.21	Structure secondaire de la polyamine oxydase	29	

1.22	Mécanisme d'action des amines oxydases à cuivre	30	
1.23	Structure secondaire de l'amine oxydase de <i>Pisum sativum</i>		
1.24	Désamination oxydative de l'histamine et de la putrescine par la DAO		
1.25	Structure cristalline de la diamine oxydase humaine	32	
1.26	Structure secondaire de la lysine oxydase	33	
1.27	Structure secondaire de l'amine oxydase sérique	35	
1.28	Mécanisme d'action de la phényléthylamine oxydase	35	
1.29	Structure secondaire de la phényléthylamine oxydase	36	
1.30	Mécanisme de transamination des amines biogènes.	38	
1.31	Schéma général de l'épithélium intestinal (A) et d'un entérocyte (B)	40	
1.32	Différentiation des cellules Caco-2.	42	
1.33	Marqueurs de croissance et de différentiation des cellules Caco-2	43	
1.34	Effet de la DAO et de l'histamine sur la prolifération des Caco-2 de 21j	44	
1.35	Hypothése de recherche	48	
1.36	Présentation schématiques des différentes étapes du projet	49	
2.1	Stability of DAO in different simulated intestinal media	61	
2.2	Effect of different simulated intestinal fluids on the detection of H ₂ O ₂ by DCHBS-AAP-HPR method.	62	
2.3	Recovery of DAO activity after incubation in various simulated intestinal media	63	
2.4	Michaelis-Menten kinetics for the oxidation of benzylamine by DAO in different simulated intestinal media	64	
2.5	Effect of BSA on DAO stability	65	
2.6	Effect of CA and DCA on DAO activity	66	
2.7	Concentration-dependent effect of CA on DAO activity	67	
2.8	Effect of NaHCO3 on DAO activity.	68	
2.9	Effect of CA on DAO activity in the presence of protéases	69	
2.10	Production of H ₂ O ₂ during the incubation of pancreatin with DAO	70	
2.11	Effect of DPPC liposomes with and without CA on DAO activity	71	
2.12	Effect of CA on DAO activity in the presence of ethanol	72	
2.13	Stability of DAO in rat EIC	73	

xi

3.1	Oxidative deamination of histamine by copper-containing amine oxidases.		
3.2	Assay of DAO activity from various sources by spectrofluorimetry		
3.3	Time course of histamine-triggered distal colon muscle contraction in absence or in presence of vDAO <i>ex vivo</i>		
3.4	vDAO has no impact on L-NAME-provoked colon muscle contractions <i>ex vivo</i>	92	
3.5	Effect of commercial antihistamine agents on histamine-triggered distal colon muscle contraction <i>ex vivo</i>	93	
3.6	Effect of the H2O2 by-product of vDAO reaction on distal colon muscle contraction <i>ex vivo</i> .	94	
3.7	PLP enhances the antispasmodic effect of vDAO ex vivo	96	
3.8	UV-Vis absorption spectra of PLP with and without histamine	97	
3.9	In vitro analysis of vDAO activity as a function of PLP concentration	98	
3.10	Uncropped gels	98	
3.11	Evaluation of enema volume required to fill the distal colon	99	
3.12	Retention of active vDAO on colon mucosa after rectal administration	100	
4.1	Oxidative deamination of histamine by histaminase	108	
4.2	Caco-2 cells staining with Fluo-4 AM.	114	
4.3	Time-course of intracellular Ca ²⁺ release after 1.25 mM histamine stimulation of Caco-2 cells.	115	
4.4	Number of random fluorescent cells during fluorescence data acquisition on confocal microscopy.	115	
4.5	DAO activity in cell culture media	117	
4.6	Cumulative effect of histamine as Ca ²⁺ signaling molecule	117	
4.7	Histamine-induced Ca ²⁺ mobilisation on Caco-2 cells	118	
4.8	Effect of vDAO at various concentrations on histamine-induced Ca ²⁺ mobilization.	119	
4.9	Effect of desloratadine at various concentrations on histamine-induced Ca^{2+} mobilization differentiated Caco-2 cells (21 days).	120	
4.10	DAO and desloratadine did not induce Ca ²⁺ mobilization	121	
5.1	Impact du milieu intestinal sur l'activité de la DAO végétale	124	
5.2	Rôle de la DAO	128	

5.3	La DAO inhibe la contraction musculaire induite par l'histamine	130
5.4	Cascade de signalisation activée par la liaison de l'histamine à ses récepteurs.	131
5.5	Action hypothétique de l'histamine, de la diamine oxydase (DAO) et de la desloratadine sur le récepteur histaminique H1	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableau

Page

1.1	Les différents substrats de la polyamine oxydase et de la N ¹ -acétylpoly- amine oxydase	28
1.2	Les différents substrats de la diamine oxydase	38
2.1	Composition and characteristics of SIF (mM) used in this study	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AC	Adénylate cyclase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AO	Amine oxidase
AAH	Agents antihistaminiques
Caco-2	Cellules d'adénocarcinome du colon humain
CU	Colite ulcéreuse
Cu-AO	Copper containing -amine oxidase
DAO	Diamine oxydase
DAOi	Diamine oxydase intestinale
DAOv	Diamine oxydase végétale
DAOrp	Diamine oxydase de rein de porc
FAD-AO	Flavine adenine dinucleotide containing - amine oxidase
FaSSIF	Fluide simulé intestinal à l'état de jeûne
FeSSIF	Fluide intestinal simulé à l'état nourri
FDA	Food and Drug Administration
Н	Récepteur histaminique
HNMT	Histamine N-méthyltransférase
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
Н	Récepteur histaminique
HNMT	Histamine N-méthyltransférase
IBD	Intestinal bowel diseases
iDAO	Intestinal diamine oxidase
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes

MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MII	Maladies inflammatoires de l'intestin
MAO	Monoamine oxydase
PB/TF	Phosphate buffer
SIF	Fluide simulé intestinal
OCT	Transporteur de cations organiques
PAO	Polyamine oxydase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
DAG	1,2-Diacylglycérol
PBS	Tampon phosphate saline
pkDAO	Pig kidney diamine oxidase
PLC	Phospholipase C
PLP	Pyridoxal 5-phosphate
RAO	Rétine amine oxydase
RCPG	Récepteur couplé à la protéine G
SIF	Fluide intestinal simulé
TGI	Tractus gastro-intestinal
VAP-1	Vascular Adhesion Protein-1
vDAO	Vegetal diamine oxidase

RÉSUMÉ

Les amines oxydases regroupent la grande famille d'enzymes catalysant la désamination oxydative des amines biogènes en l'aldéhyde correspondant avec une consommation d'oxygène et une production équimolaire de peroxyde d'hydrogène et d'ammoniac. Selon le groupement prosthétique, on distingue deux types d'amine oxydases. Les amine oxydases à cuivre (Cu-AO, EC 1.4.3.6), qui constituent notre intérêt, sont des molécules homodimériques et comprennent pour chaque monomère un atome de cuivre et un cofacteur 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone (TPQ) localisés au niveau du site catalytique. La DAO est une enzyme ubiquitaire et dépendamment de l'affinité pour le substrat, on distingue plusieurs types de Cu-AO incluant la diamine oxydase (DAO). La caractérisation in vitro de la DAO d'origine végétale au cours de ce projet a montré que la DAO serait temporellement stable dans le SIF (pH 7, 37°C) à des concentrations de l'ordre du micromolaire. De plus, des comparaisons entre l'enzyme d'origine végétale à celle d'origine animale montre: (i) une activité 30 fois plus grande, (ii) une bonne acceptabilité réglémentaire et (iii) une affinité haute pour l'histamine pour la DAO végétale. L'histamine assure ses fonctions biologiques via quatre récepteurs tans-membranaires (H1-4). La contraction des muscles du côlon distal (simulant les processus pathophysiologiques associés à la dérégulation de la motilité intestinale en cas d'histaminose) de souris augmentait avec la concentration en histamine. Tout comme la desloratadine (antagoniste du récepteur H1), la DAO renverserait les effets spasmodiques de l'histamine, avec un effet amplificateur en présence de PLP 10 µM. En exploitant les récepteurs H1 exprimés sur les cellules Caco-2, nous avons trouvé judicieux de comparer la capacité de la DAO et de la desloratadine à inhiber la mobilisation du calcium induite par l'histamine et d'estimer la concentration de la DAO présentant des effets similaires à une dose de la desloratadine. Les travaux ex vivo sur la motilité intestinale et in vitro sur la mobilité du calcium ont permis d'établir un rapport molaire d'efficacité de 1 pour 4 entre la DAO et la desloratadine. Donc, ce projet apporte des avancements de connaissances sur le comportement de la DAO dans le tractus gastrointestinal et permet d'estimer la concentration de la DAO pouvant avoir des effets similaires à une dose de la desloratadine. Ceci, pour des travaux futurs visant la formulation de la DAO pour une administration orale et pour une livraison ciblée au niveau intestinal.

Mots clés : Amine oxydase à cuivre, Histamine, Histaminoses, Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

ABSTRACT

Amine oxidases are ubiquitous enzymes. They are present in various tissues and catalyze the oxidative deamination of biogenic amines to the corresponding aldehyde with consumption of oxygen and equimolar production of hydrogen peroxide and ammonia. According to the prosthetic group, there are two different amine oxidases. Copper amine oxidases (Cu-AO, EC 1.4.3.6) also called diamine oxydase, histaminase, sensitive amine oxydases and amiloride binding amine oxydases are homodimeric enzyme and include for each monomer a copper atom and a 2,4,5trihydroxyphenylalanine quinone cofactor (topaquinone, TPQ). Depending of the amines used as substrates, there are several types of Cu-AO including diamine oxidase (DAO). DAO is involve in the metabolism of primary amine and histamine, hence the name histaminase. During the study, the *in vitro* characterization of vegetal DAO (vDAO) have shown the stability of DAO dependently of the incubation time in SIF (pH 7, 37°C). In addition, vDAO present an activity 30 times higher for histamine than that of commercial DAO from pig kidney. Deleterious effects of histamine can be alleviated with antihistamine drugs targeting histamine receptors. However, many antihistamine agents come with various undesirable side effects. Using ex vivo and in vitro assays, we found that vDAO is more potent than commercial anti-histamine drugs at inhibiting histamine-induced contraction of murine distal colon muscles. We also identified pyridoxal 5'-phosphate (vitamin B6) as an effective enhancer of vDAO antispasmodic activity. Furthermore, we discovered that rectally administered vDAO can be retained on gut mucosa and remain active. Using Fluo-4 AM as Ca²⁺ tracker and confocal microscopy visualization, it was found vDAO down regulated histamineinduced Ca^{2+} mobility in intestinal Caco-2 cells. This effect was four time higher than that obtained with the synthetic desloratadine drug. This advancement of knowledge will help to formulate the DAO for an oral administration in order to reduce circulating exogenous histamine in subjects with histamine-related diseases.

Keywords : Copper amine oxidase, Histamine, Histaminosis, Inflammatory bowel diseases

INTRODUCTION

Le premier chapitre de cette thèse est une revue de la littérature et regroupe quatre sections. La prémière section présente l'histamine et ses différentes sources endogènes et exogènes. L'histamine assure de nombreuses fonctions via ses quatre récepteurs histaminiques H1 à H4; de ce fait, nous avons trouvé judicieux de présenter : *(i)* ces différents récepteurs couplés aux protéines G, *(ii)* les fonctions effectrices suite à l'activation des récepteurs H, *(iii)* les différents agonistes (incluant l'histamine) qui déclenchent un signal et *(iv)* les agents qui inhibent (antagonistes) ou renversent (agonistes inverses) le signal induit par un agoniste.

Un apport excessif de l'histamine (i) serait à l'origine de nombreuses pathologies telles que des allergies alimentaires et des intoxications liées à l'histamine; (ii) contribuerait au développement et au maintien de l'urticaire; (iii) favoriserait la dysmotilité du tractus gastro-intestinal; (iv) occasionnerait un choc anaphylactique et dans des situations graves, (v) conduirait à la mort. De plus, l'histamine est un acteur important dans le maintien et l'apparition des inflammations qui se manifestent dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Les stratégies thérapeutiques mises en place pour les dysfonctions liées à l'histamine consistent soit à:

• Inhiber la synthèse de l'histamine (inhiber l'action de l'histidine décarboxylase, une enzyme qui catalyse la conversion de l'histidine en histamine)

• Bloquer les récepteurs histaminiques afin que leur liaison avec l'histamine soit impossible

Favoriser la voie de biodégradation de l'histamine

La régulation de l'histamine est assurée par deux voies cataboliques : l'histamine Nméthyl transférase qui décompose l'histamine intracellulaire et la diamine oxydase avec certaines localisations dont la lumière intestinale, qui décompose l'histamine extracellulaire.

La diamine oxydase (DAO), présenté à la deuxième section, est une enzyme ubiquitaire. Elle est exprimée dans tous les règnes du vivant et appartient à la grande famille des amine oxydases dont le mécanisme d'action consiste à la désamination des amines biogènes. La particularité avec la diamine oxydase repose sur le fait qu'en plus des diamines présentes dans la lumière intestinale, elle a pour substrat l'histamine, impliquée dans les maladies entériques et les allergies alimentaires : d'où l'intérêt porté aux amine oxydases.

De façon plus détaillée, les deux grands groupes d'amine oxydases (amine oxydase à flavine adénine dinucléotide et les amine oxydases à cuivre) réparties selon le cofacteur impliqué et des exemples d'amine oxydases pour chaque groupe seront présentés.

De plus, une revue de littérature sur les cellules d'adénocarcinome colorectal humaine (Caco-2) va. Cette troisième section permet de comprendre pourquoi la lignée cellulaire Caco-2 a été sélectionnée comme modèle adéquat pour l'étude des effets bénéfiques de la DAO en situation d'histaminose ou d'entérite inflammatoire.

La quatrième section présente les hypothèses et les objectifs de recherche. Le projet encadre 3 principaux objectifs, présentés sous forme d'articles scientifiques et correspondants aux chapitres II, III et IV.

Le chapitre V constitue la discussion et l'avancement des connaissances qui en découlent de ce projet de thèse.

Les différentes annexes rapportées à la fin du document recensent en partie, des activités scientifiques ayant contribuées à la réalisation de ce projet.

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Ce chapitre présente : *(i)* les différentes origines de l'histamine et les dysfonctions qui y sont liées dans le tractus gastro-intestinal (TGI), *(ii)* l'une des principale voie de catabolisme de l'histamine exogène : la diamine oxydase (DAO), *(iii)* un modèle cellulaire pouvant mimer le milieu intestinal (les cellules Caco-2) et *(iv)* le projet de recherche. Le système digestif et plus précisément l'intestin joue un rôle de défense et de barrière sélective pour le bon fonctionnement du corps humain. Au cours de la réponse immunitaire, l'intestin recrute de nombreuses cellules de défenses incluant les cellules sécrétrices d'histamine.

1.1 Histamine et maladies inflammatoires de l'intestin

1.1.1 Origine endogène et exogène de l'histamine

L'histamine (2-(imidazol-4-yl) éthylamine) est une monoamine primaire contenant un noyau imidazole (Figure 1.1). Elle a été purifiée pour la première fois à partir d'ergot de champignon (Barger and Dale, 1910) et ce n'est qu'en 1927 (Best *et al.*, 1927). L'histamine aurait une origine endogène et exogène. L'histamine endogène est synthétisée par décarboxylation de l'histidine par l'histidine décarboxylase (HDC, EC 4.1.1.22) en présence du pyridoxal 5-phosphate (PLP) comme cofacteur (Figure 1.2).



Figure 1.1 : Structure chimique de l'histamine



Figure 1.2 : Biosynthèse de l'histamine.

L'histidine est décarboxylé en histamine par l'histidine décarboxylase couplée au pyridoxal phosphate (PLP) comme cofacteur (d'après Wu *et al.*, 2008).

Une fois formée, l'histamine est stockée dans des vésicules de granulocytes. Ces cellules sécrétoires, une fois activées en présence d'un antigène, sont reparties en deux grandes classes (Figure 1.3) :

i) les grands producteurs d'histamine, constitués des mastocytes, des basophiles, des cellules chromaffines et des neurones histaminergiques, qui produisent des quantités importantes d'histamine et

ii) les faibles producteurs d'histamine (cellules dendritiques, cellules T, macrophages et aux cellules épithéliales) qui sécrètent des quantités faibles d'histamine.



Figure 1.3 : Les cellules sécrétrices d'histamine.

Les grands producteurs d'histamine constitués des mastocytes, des basophiles, des cellules chromaffines (ECL) et des neurones histaminergiques sont des réservoirs d'une importante quantité d'histamine. Les cellules faibles productrices d'histamine (cellules dendritiques, cellules T, les macrophages et les cellules épithéliales), libèrent de faible quantité d'histamine (d'après Huang *et al.*, 2018).

La biosynthèse de l'histamine par les mastocytes s'expliquerait par le fait que la sensibilisation antigénique (premier contact avec l'antigène) concoure à la production des immunoglobulines E (Ig E) par les lymphocytes B. La liaison des IgE à leurs récepteurs spécifiques (Fc ϵ R1 et Fc γ R1) exprimés à la surface des mastocytes, activerait ces dernières: d'où l'expression de mastocytes activés. Lors d'un contact ultérieur avec cet allergène (antigène), les mastocytes activés vont favoriser la dégranulation des agents pro-inflammatoires, incluant l'histamine (Figure 1.4).



Figure 1.4 : Dégranulation de l'histamine par les mastocytes activés.

La première exposition à un allergène stimule les lymphocytes T à produire des IL-4 et des IL-13. Ces cytokines stimulent la synthèse des immunoglobulines E (IgE) par les lymphocytes B. Les IgE vont se lier à la surface des mastocytes et les activer. Lors d'un deuxième contact avec le même allergène, les mastocytes activés vont stimuler la dégranulation des agents proinflammatoires incluant l'histamine, responsable des symptômes liés à l'allergie (d'après Brownell, 2004).

En plus de son origine endogène, l'histamine se retrouve dans l'organisme suite à l'ingestion des aliments ayant subis un processus de fermentation. En présence d'un taux anormalement élevé d'histamine (histaminose), l'intégrité du tractus gastro-intestinal est habituellement altérée (Figure 1.5).

De plus, l'action des bactéries pro-inflammatoires commensales de l'intestin représente une source d'histamine endogène. D'autre part des bactéries présentes dans certains aliments fermentés constituent également une source non négligeable d'histamine exogène pour l'organisme.



Figure 1.5 : Organisation générale de la barrière intestinale.

Les cellules épithéliales forment une couche qui fonctionne comme une barrière physique facilitée par des connexions étroites entre chaque cellule. Un certain nombre de composants protéiques à jonction serrée scellent la voie paracellulaire et jouent le rôle de barrière. La couche de mucus est une barrière essentielle pour limiter le contact entre le microbiome (pouvant être constitué de bactéries pro-inflammatoires) et les cellules épithéliales. A- En conditions d'homéostasie, les cellules immunitaires (lymphocytes T CD⁴⁺) ignorent la présence des bactéries commensales et demeurent donc dans un état naïf. B- À la suite de l'infection par un pathogène gastro-intestinal, l'intégrité de la muqueuse intestinale peut être compromise, permettant la translocation des bactéries commensales vers d'autres organes, suivie par l'activation et la migration des cellules T spécifiques des bactéries commensales des organes lymphoïdes vers la muqueuse intestinale (d'après Bouladoux *et al.*, 2013).

1.1.2 Récepteurs histaminiques

1.1.2.1 Récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

L'histamine est un agoniste pour des récepteurs histaminique de type RCPG (récepteurs couplés à la protéine G). Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires organisés sous forme d'hélices reliées entre elles par trois boucles l'extérieur (E) et trois boucles à l'intérieur (I) de la cellule, encadrées d'un domaine N-terminal extracellulaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire (Figure 1.6).



Figure 1.6 : Récepteur à sept domaines transmembranaires. On dénombre sept domaines transmembranaires (TM 1 à TM 7), un domaine N terminal extracellulaire, un domaine C-terminal intracellulaire, 3 boucles extracellulaires (E1 à E3) et 3 boucles intracellulaires (II à I3) (d'après Trzaskowski *et al.*, 2012).

De plus, les RCPGs jouent un rôle clé dans la signalisation des molécules messagères et constituent une cible thérapeutique dans le domaine pharmacologique (Bjarnadóttir *et al.*, 2006; Latek *et al.*, 2012). Les quatre récepteurs histaminiques notés H1-4 (Tableau 1.1) se distinguent les uns des autres par leur fonction, leur structure, leur distribution et leur affinité pour l'histamine.

H1 est exprimé dans différentes cellules incluant les mastocytes; il joue un rôle dans la progression et la modulation des allergies médiées par l'histamine. En outre, ces récepteurs sont sollicités dans les réactions d'hypersensibilité impliquant la voie de la phosphatidylcholine phospholipase C (PLC). Cependant, les récepteurs H2, H3 et H4 activés sollicitent la voie de l'adénylate cyclase (AC) (Figure 1.7).



Figure 1.7 : Les récepteurs histaminiques et leurs principales voies de signalisation. L'activation de H1 par l'histamine déclenche la cascade de signalisation impliquant le l'activation de la phospholipase C (PLC) et de la protéine kinase C (PKC) et l'augmentation du flux de calcium intracellulaire. L'activation de H2, H3 et H4 induit le recrutement de messagers secondaires dont adénylate cyclase (AC) et la protéine kinase A (PKA). Ces quatre récepteurs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (d'après Shahid *et al.*, 2009).

1.1.2.2 Récepteur histaminique H1

Les récepteurs histaminiques H1 sont exprimés par différents tissus et cellules. Ces protéines sont exprimées majoritairement : *(i)* à la surface de certaines cellules immunitaires (mastocytes, éosinophiles, basophiles, neutrophiles, cellules dendritiques, les cellules de Langerhans (macrophages) et les cellules T) (Albrecht and Dittrich, 2015), *(ii)* par certaines cellules endothéliales et *(iii)* par les muscles lisses du système gastro-intestinal (TGI), plus précisément ceux de l'intestin. La présence de récepteurs

H1 sur les cellules endothéliales vasculaires serait responsable de l'hyperperméabilité vasculaire induite par l'histamine. Cette hyperperméabilité favoriserait l'intravasation des micro-organismes dans la circulation générale (Figure 1.5) et l'apparition de certaines maladies.

Les récepteurs H1 couplés à la protéine Gaq/11, constitué de 487 acides aminés avec une masse moléculaire de 56 kDa. Ils sont impliqués dans plusieurs processus biologiques incluant : la formation du cGMP, de la phospholipase A2, l'activation de nombreux médiateurs incluant la phospholipase C (PLC), la mobilité du Ca²⁺ intracellulaire, la contraction des muscles lisses et la mobilité gastrointestinales. La PLC activée convertit le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et 1,2-diacylglycérol (DAG) conduisant à une augmentation du Ca²⁺ cytosolique (Shahid et al., 2009). Les effets qui résultent de l'activation des récepteurs histaminiques sont la contraction des muscles lisses (péristaltisme, bronchoconstriction), la réponse inflammatoire, les allergies alimentaires, le choc anaphylactique (Masini et al., 2007) et l'hyperperméabilité paracellulaire (Figure 1.5). Quelques antagonistes de H1 les plus souvent cités sont : desloratadine, loratadine, Mepvramine. chlorpheniramine, trans-tripolidine, temelastine, promethazine, diphenhydramine, tripelennamine et chlorpromazine. Excluant l'histamine, les agonistes de H1 sont : diméthylhistaprodifen, méthylhistaprodifen, histamine trifluorométhyl toluidine et 2-(3-trifluoro-méthyl-phényl)histamine.

1.1.2.3 Récepteur histaminique H2

Le H2 couplé à la protéine Gas est exprimé majoritairement dans les cellules pariétales gastriques, dans les muscles lisses et dans certaines cellules immunitaires (les cellules B, les cellules dendritiques et les cellules T). Il est constitué d'environ 359 acides aminées pour une masse moléculaire de 40 kDa. L'activation de H2 induirait la production de AMPc, suivie de la sécrétion du mucus, d'acide gastrique et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, H2 serait impliqué dans

l'activation des cellules immunitaires. Cette activation est matérialisée par la production des cytokines, la réduction de dégranulation des basophiles, la prolifération des cellules T et le recrutement des anticorps. Par cette voie (impliquant H2), l'histamine stimule l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et l'accumulation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Les antagonistes H2 les plus courants sont ciétidine, ranitidine, famotidine, zolantidine, mifentidine et titotidine. Excluant l'histamine, les agonistes de H2 sont : arpromidine, impromidine, sopromidine, amthamine et 4-méthylhistamine.

1.1.2.4 Récepteur histaminique H3

Le H3 est exclusivement exprimé par les neurones. L'activation de H3 couplé à la protéine Gai/o régule l'homéostasie, le cycle éveil/sommeil et l'inflammation. De plus, cette voie inhibe la production de l'AMPc et stimule la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et l'accumulation du Ca²⁺ intracellulaire. H3 est constitué de 445 acides aminés avec une masse moléculaire de 70 kDa. Les antagonistes de H3 sont généralement administrés pour traiter l'obésité, l'ischémie cardiaque, les désordres cognitifs et l'insomnie (Ashina *et al.*, 2015; Benly, 2015). Les antagonistes H3 les plus courants sont : thioperamide, impentamine, iodophenpropit, GR174737, clobenpropit et ciproxifan. Excluant l'histamine, les agonistes de H3 sont : imetit, immepip et R- α -méthylhistamine.

1.1.2.5 Récepteur histaminique H4

Le H4 est exprimé *(i)* au niveau membranaire de plusieurs cellules immunitaires (basophiles, mastocytes) et cellules cancéreuses, *(ii)* sur des tissus et organes tels que le tissue synovial et les poumons et *(iii)* sur le système nerveux central. H4 est constitué de 390 acides aminés. L'activation de H4 couplé à la protéine G α /io réduirait la production de l'AMPc qui conduit à l'activation de la MAPK. De plus, l'activation de H4 stimulerait la migration des éosinophiles et la maturation des mastocytes qui

relâchent des agents pro-inflammatoires tels que les cytokines, les chimiokines et l'histamine. Excluant l'histamine, les agonistes de H1 sont : JNJ 10191584 et thioperamide. Les agonistes H4 sont : Imetit, immepip, clobenpropit (agoniste partiel) et 4-méthylhistamine.

1.1.3 Rôle de l'histamine

L'histamine assure ses différentes fonctions via ses quatre récepteurs histaminiques. Elle a des effets pléiotropiques dans différents systèmes (cardiovasculaire, respiratoire, digestif, nerveux central et immunitaire).

Dans le système circulatoire, l'histamine modulerait la pression sanguine et induirait la tachycardie et l'arythmie. En outre, elle régulariserait la vasodilatation et la bronchoconstriction. Dans le système nerveux central, l'histamine jouerait le rôle de neurotransmetteur. Dans le domaine de la cancérologie, l'histamine serait impliquée dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse des cellules adénocarcinome gastriques et intestinales.

1.1.3.1 Role de l'histamine dans l'estomac

La présence de l'histamine et son effet dans la stimulation des sécrétions gastriques de mammifères ont été découverts en 1920 (Popielski, 1920). Dans l'estomac, l'histamine proviendrait des cellules chromaffines gastriques (ECL : *Enterochromaffin-like*). Les cellules ECL sont des cellules sécrétrices d'hormones peptidiques et d'histamine. Elles se présentent sous forme de structure multiforme et sont localisées au fond du gland, tandis que les cellules pariétales prédominent dans la région médiane (Sacks *et al.*, 1932). De plus, la gastrine stimulerait la sécrétion de l'histamine par les cellules ECL (Waldum *et al.*, 1991) (Figure 1.8).



Figure 1.8 : L'activation de H2 par l'histamine stimule la synthèse de l'acide gastrique. La gastrine secrétée par les cellules G du pylore, stimule le relargage du calcium dans les cellules pariétales gastriques et la sécrétion de l'histamine par les cellules chromaffines (ECL). L'activation de H2 par l'histamine induit la synthèse la cAMP et la sécrétion de l'acide chlorhydrique (HCl) par les cellules pariétales (d'après <u>www.ferronfred.eu</u>).

La reconnaissance et la liaison de l'histamine à H2 active l'adénylate cyclase qui produit l'AMP cyclique (AMPc). La voie de signalisation de l'AMPc conduit à la production d'acide gastrique (Figure 1.8). Le blocage de H2 par des agents antihistaminiques tels que la ranitidine et la cimétidine (section 1.1.2.3) serait l'une des principales thérapies contre les désordres gastriques liés à l'histamine.

1.1.3.2 Rôle de l'histamine dans l'intestin

L'histamine produite dans l'estomac (Håkanson *et al.*, 1986) ou ingérée à la suite de l'alimentation (Afilal *et al.*, 2006) est acheminée vers la lumière intestinale. De plus, l'action des bactéries commensales (Thomas, 2016) des transporteurs de cations organiques (qui favorise le passage de l'histamine en provenance de la circulation générale) et des agents relargués par des cellules sécrétoires serait également à l'origine de la présence de l'histamine dans la lumière intestinale (Nolte *et al.*, 1990). La présence de l'histamine en excès dans le tractus gastrointestinal (TGI) serait liée à l'apparition ou au maintien de nombreuses dysfonctions entériques telles que les

allergies, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le syndrôme de l'intestin irritable.

1.1.4 Dysfonctions liées à l'histamine

1.1.4.1 Allergies alimentaires ou histaminoses

L'histamine dégranulée par les mastocytes est un pseudo-allergène, qui régule le recrutement, la maturation, l'activation et la migration des cellules immunitaires vers le site d'inflammation créant ainsi une allergie chronique. Le déséquilibre entre l'histamine présente dans la lumière intestinale suite à l'ingestion d'aliments contaminés (Figure 1.9 cas 2) et/ou à l'incapacité des enzymes cataboliques à décomposer l'histamine (Figure 1.9 cas 3), comparé à un sujet sain (Figure 1.9 cas 1) conduisent à une intolérance et à une intoxication à l'histamine encore appelée histaminose.

Les intoxications alimentaires couramment rencontrées sont celles de la scromboidose, causée par l'ingestion de certaines espèces de poissons de la famille des *Scombridae* (thon et maquereau) et pouvant contenir des concentrations élevées d'histamine suite à une mauvaise conservation durant le transport ou le stockage.

Ce trouble se manifeste par des dysfonctions intestinales majeures incluant des pseudoallergies alimentaires, des intolérances et des intoxications à l'histamine pour lesquelles à date, il n'y a pas de traitements disponibles. De plus, l'histamine étant un agent pro-inflammatoire, il rend plus difficile la rémission chez des patients souffrant des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.



Figure 1.9 : Les différents profils de l'histamine ingérée au niveau intestinal. Cas 1: sujet sain. L'aliment ingéré contient une concentration inférieure de 10 mg/Kg d'histamine; il existe un équilibre entre l'histamine circulante et celle dégradée. Le cas 2: une intoxication alimentaire dûe à l'ingestion d'aliments riches en histamine génère un déséquilibre entre l'histamine circulante et les enzymes cataboliques. On assiste donc à une intoxication dûe à l'histamine. Le cas 3 : les enzymes cataboliques sont déficientes ou leurs activités métaboliques sont réduites ce qui génère un déséquilibre entre l'histamine circulante et celle dégradée. On assiste donc à une intolérance à l'histamine (d'après Kovacova-Hanuskova *et al.*, 2015).

1.1.4.2 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Au cours de la réponse immunitaire, l'histamine relâchée est un médiateur et un acteur clé dans le processus de l'inflammation (Benly, 2015). Le cercle vicieux (présence d'histamine - activation des mastocytes suite à l'histamine (pseudo-allergène) – dégranulation de l'histamine par les mastocytes activés) entretient la réponse inflammatoire d'où l'inflammation chronique. Lorsque l'inflammation chronique se vit au niveau de la muqueuse intestinale, on parle de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Actis *et al.*, 2019).

Les MICI sont des maladies inflammatoires chroniques du système digestif caractérisées par l'inflammation du tractus gastrointestinal (Abraham et al., 2009) et une hyperpermeabilité de l'intestin (Turpin et al., 2020) qui évoluent par poussées (ou crises) et avec des phases de rémission. La prévalence est sans cesse croissante pouvant atteindre 1 200 sur 100 000 habitants en Amérique du nord. Au Canada, environ 270 000 personnes vivaient avec une MICI en 2018, soit une prévalence de 0,67 %. De plus, 10 200 nouveaux cas seraient recensés chaque année (Rocchi et al., 2012). Les MICI peuvent être diagnostiquées à tout âge; toutefois des personnes dans la vingtaine ou la trentaine constitueraient la population la plus touchée par la maladie. Quant à la population plus jeune, environ 5 900 enfants canadiens de moins de 18 ans en sont atteints. En plus de l'impact sanitaire, cette maladie aurait également un impact économique important. En 2012, la maladie a engendré des dépenses estimées à plus de 2.8 milliards de dollars (près de 12 000 \$ par patient atteint) distribuées suivant des coûts directs et indirects. Les coûts médicaux directs évalués en 2018 ont été estimés à plus de 1.2 milliard de dollars par année (Kuenzig et al., 2019), ces frais ont été organisés suivant les :

- Coûts des médicaments (\$521 millions),
- Hospitalisations (\$345 millions) et
- Visites chez le médecin (\$132 millions).

Les coûts indirects représentent les dépenses pour la société et pour les patients. Ils totalisent 1.6 milliard de dollars avec une prédominance pour des pertes de productivité à long terme pouvant atteindre \$979 millions.

Les MICI se caractérisent principalement par des crises de douleurs abdominales, des diarrhées (qui peuvent durer plusieurs semaines voire plusieurs mois), des flatulences, des ballonnements et de la fatigue. Bien que ces maladies présentent des similitudes, on rencontre des disparités. En fonction du segment de l'intestin enflammé et de l'intensité de l'inflammation, les MICI sont classées en deux principales maladies: la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Figure 1.10 et Figure 1.11).



Maladie de Crohn

Colite ulcéreuse

Figure 1.10 : Présentation générale des deux principaux types de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

La maladie de Crohn: l'inflammation aiguë (couleur rouge) sur tout le tube digestif. La colite ulcéreuse: l'inflammation du côlon ascendant (d'après le site web <u>www.Medisite.fr</u>).

1.1.4.2.1 Maladie de Crohn (MC)

Découverte par le groupe de recherche du Dr. Burrill B. Crohn à l'hôpital du Mount Sinaï à New York en 1932 (Brotherton *et al.*, 2013), la MC est une maladie plus fréquente dans les pays industrialisés où l'Amérique du Nord constitue la partie du globe la plus touchée par cette maladie. Au Canada et plus précisément au Québec l'incidence de la maladie est autour de 17.4 et 10.1 sur 100 000 habitants pour la MC et la colite ulcéreuse (CU), respectivement; comparativement aux données rapportées (Bernstein *et al.*, 2006) dont l'incidence sur tout le territoire canadien était de 8.32 et 4.34 pour la MC et la CU, respectivement. Ces données montrent que les MICI croissent de façon exponentielle en fonction des années.

Contrairement à la CU qui est localisée principalement au niveau du côlon et du rectum (Figure 1.10), la MC se manifeste (dans la majorité des cas) par une inflammation sur plusieurs sections du tube digestif : l'œsophage, l'estomac et l'anus (Figure 1.12).


Figure 1.11 : Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Comparaison des segments d'intestin de sujets sains (gauche), souffrant de la maladie de Crohn (MC, milieu) et de la colite ulcéreuse (UC, droite). A: Un rétrécissement de la lumière intestinale dans le cas de MC et l'apparition d'ulcères dans le cas de la CU en comparaison au côlon sain. B: les résultats d'endoscopie des trois situations du côlon (sain, MC et CU). C: la perte d'intégrité de la muqueuse intestinale dans la MC et la perte d'épaisseur de la muqueuse dans la CU en comparaison au côlon sain (d'après Frei *et al.*, 2011 et d'après www.hopkinsmedicine.org).

En plus de l'inflammation, on observe une perte de la fonction protectrice de la muqueuse (aspect également rencontré dans le cas de la CU), l'apparition de fistule (qui traduirait une inflammation profonde des couches de la muqueuse intestinale) et de polypes (Figure 1.13).

La MC est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation anormale au niveau de l'intestin (Figure 1.12). Elle se développe de façon sournoise durant les premières années de la maladie. De plus, les manifestations cliniques pourraient varier

d'un patient à un autre. La majorité des sujets atteints de la MC présente l'intestin enflammé tandis que seul 20 % des patients auraient l'inflammation confinée au niveau du côlon (Hendrickson, *et al.*, 2002).



Figure 1.12 : Présentation générale de la maladie de Crohn.

L'inflammation est récurrente sur toutes les parties constituantes du tube digestif. Un grossissement de l'appendice montre l'ulcération de la muqueuse et un épaississement de la paroi chez les patients de la maladie de Crohn comparé aux sujets normaux (d'après <u>www.ramsaygds.fr)</u>.

La lumière intestinale est un milieu dynamique incluant le processus d'inflammation. Le système immunitaire jouerait un rôle clé dans l'équilibre entre les différents acteurs de l'inflammation et pourrait induire par la même occasion une réponse immunitaire afin de maintenir l'intégrité de la muqueuse intestinale. De plus le microbiote intestinal (constitué de plus de 500 espèces de bactéries commensales vivant en symbiose avec le milieu intestinal de l'hôte) régulerait également l'intégrité de la muqueuse intestinale (Zhang *et al.*, 2015; Chelakkot *et al.*, 2018).



Figure 1.13 : Extraction de polypes. Intervention chirurgicale matérialisant l'extraction d'un polype dans une situation de MICI (d'après <u>www.medicfoto.ru</u>).

En situations pathologiques, l'augmentation de la perméabilité intestinale est associée à un risque accru de passage d'antigènes dans le milieu vasculaire, traduit un dysfonctionnement de la réponse inflammatoire au niveau intestinal et donc la MC.

La MC est présente majoritairement dans la population adulte mais elle a également été diagnostiquée chez des enfants, des adolescents et des jeunes adultes. Tout comme la CU, la prévalence de la MC croit avec les années dans le monde (au Canada environ 248 sur 100 00 habitants vivraient avec cette maladie) et de ce fait cette maladie aurait de nombreuses répercussions économiques puisqu'elle diminue la productivité économique et la vie sociale des malades. En plus des manifestations intestinales citées plus haut (diarrhées et douleurs abdominales), il y aurait également des manifestations extra-intestinales. Il s'agit entre autres de l'arthrite, de la dermatite, des troubles de la vision, de l'ostéoporose, de la déficience en vitamine B12 et de la cirrhose du foie.

1.1.4.2.2 Colite ulcéreuse (CU)

La CU se manifeste par une inflammation des couches superficielles du côlon ascendant. Elle est plus répandue dans les pays du nord incluant le Canada avec une prévalence chez les hommes supérieure à celle chez les femmes. On retrouve également les colites indéterminées actuellement appelées colites non classées, ce sont des cas rares qui sont des formes frontières entre la MC et la CU. En fonction du segment du côlon enflammé, on distingue quatre sous-types de CU : la pancolite, la rectosigmoïdite, la recto-colite distale, la rectite (Figure 1.14) et la rectocolite extensive. La pancolite est matérialisée par une inflammation de tout le côlon (ascendant, transversal et descendant) et du rectum. La rectosigmoïdite, quant à elle est caractérisée par l'inflammation de la partie terminale du côlon ascendant et du rectum. En ce qui concerne la recto-colite distale, toute la section distale du gros intestin est enflammé et finalement, la rectite est matérialisée par l'inflammation de la partie terminale du rectum).



Figure 1.14 : La colite ulcéreuse.

Les différents sites d'inflammation en cas de la colite ulcéreuse (d'après www.hepatoweb.com).

Les méthodes de dépistage de la maladie sont principalement basées sur l'imagerie (iléo colonoscopie et l'endoscopie) et des tests sérologiques qui permettent d'évaluer des marqueurs de l'inflammation et qui permettent de distinguer la CU de la MC.

À ce jour, aucune action préventive n'a été mise sur pied. Les méthodes curatives actuelles consisteraient à enlever (par intervention chirurgicale) les parties de l'intestin enflammées et les polypes (Figure 1.13) afin de stopper l'évolution de la maladie. De plus l'administration de corticostéroïdes, d'acide 5-aminosalicilique (5-ASA ou mésalazine), d'immunosuppresseurs ou d'immunomodulateurs (Humira, Remicade) soulagerait momentanément les patients.

Bien que l'origine de la maladie reste encore non élucidée, de nombreux chercheurs ont établi un lien entre l'évolution de la maladie avec le style de vie (le régime alimentaire, la composition du microbiote), l'environnement et l'héritage génétique. Dans ce même sens, l'histamine, un agent pro-inflammatoire favoriserait le maintien d'un cercle vicieux autour de la maladie.

1.1.4.3 Syndrôme de l'intestin irritable

Le SCI est une condition multifactorielle complexe causée par une dérégulation de communication entre le cerveau et l'intestin. Il est caractérisé par l'apparition d'anomalies motrices et sensorielles intestinales. Le SCI se traduit par divers symptômes fonctionnels gastro-intestinaux incluant des douleurs abdominales récurrentes, des changements dans les habitudes intestinales, de la diarrhée ou de la constipation, des ballonnements et une urgence de la défécation. On classifie le syndrome du côlon irritable en fonction de symptômes selon lesquels la constipation ou bien la diarrhée prédomine, ou encore s'il y a alternance entre diarrhée et constipation, suivie de douleurs abdominales récurrentes (soulagées par la défécation). De plus, la présence de mastocytes activés sérait impliquée dans le developpement et l'entretient du SCI (Lee *et al.*,2016).

Face à l'échec général de la médecine à trouver des traitements thérapeutiques efficaces de nombreux patients se tournent vers la médecine douce et complémentaire afin de trouver un soulagement face aux inconvénients directs et indirects du SCI (Birtwhistle, 2009).

1.1.5 Méthodes préventives et curatives des affections dûes à l'histamine

1.1.5.1 Aspects préventifs

Présentement, aucune thérapie préventives pour les affections dûes à l'histamine. Les services sanitaires préconisent une alimentation saine et proscrivent la consommation de certains aliments fermentés pouvant contenir des taux élévés d'histamine. De plus

dans le marché on note l'apparition de suppléments alimentaires à base de la diamine oxydase de rein de porc (DAOSIN) qui pourrait présenter une certaine action préventive.

1.1.5.2 Aspects curatifs

Concernant l'aspect curatif, on retrouve actuellement sur le marché de nombreux agents antihistaminiques dont le mécanisme consiste à inhiber l'action de l'histamine. Il s'agit des antagonistes et/ou des agonistes inverses des récepteurs histaminiques (Zhou and Huang, 2020). Ces agents antihistaminiques sont identiques à ceux présentés à la section 1.1.2.

En plus des agents antihistaminiques, on retrouve également des inhibiteurs de l'histidine décarboxylase ainsi que des suppléments alimentaires à base de la diamine oxydase extraite de rein de porc.

1.2 Amine oxydases

1.2.1 Classification des amine oxydases

Les amine oxydases (EC 1.4.3._) sont des enzymes ubiquitaires impliquées dans le métabolisme des amines exogènes et endogènes. Elles sont exprimées dans les microorganismes (les champignons, les levures, les bactéries à Gram-positifs et les bactéries à Gram-négatifs), les plantes et les mammifères. Les AO catalysent la déamination oxydative d'un grand nombre d'amines biogènes pour former l'aldéhyde correspondant, du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniaque (Mondovi *et al.*, 1982). Selon le cofacteur, on distingue deux grandes classes d'amines oxydases : les amine oxydases à flavine adénine dinucléotide (FAD-AO) et les amine oxydases à cuivre (Cu-AO).

1.2.2 Amine oxydases à FAD (FAD-AO)

Les FAD-AO (EC 1.4.3.4) ont généralement pour substrat des monoamines et polyamines. Dans le règne végétal on les rencontre chez les plantes monocotylédones et rarement chez les dicotylédones. Les FAD-AO sont caractérisées par la présence au niveau de leur site de liaison d'un motif *Gly-X-Gly-X-X-Gly* (Wierenga *et al.*, 1983; Tavladoraki *et al.*, 1998). Toutefois, on distingue plusieurs types de FAD-AO.

1.2.2.1 N¹-acétylpolyamine oxydase

La N¹-acétylpolyamine oxydase (EC 1.5.3.13) présente une structure conformationnelle constituée principalement d'hélices alpha (Gawandi and Fitzpatrick, 2007). D'après le serveur de *Protein Data Base* (PDB), la N¹-acétylpolyamine oxydase (acétyl PAO, PDB : 5LGB) est une enzyme monomérique, non glycosylé d'environ 504 acides aminés avec une masse moléculaire de 55.4 kDa, 36% d'hélice α et 18 % de feuillet β (Figure1.15).



Figure 1.15 : Structure sécondaire de la N¹-acétylpolyamine oxydase de souris. Structure cristalline de la N¹-acétylpolyamine oxydase de souris, obtenue par diffraction au Rayon-X de la N¹-acétylpolyamine oxydase complexé avec MDL72527 avec une resolution de 1.8A. (PDB : 5LGB) .

Le gène de cette enzyme à FAD est localisé généralement sur le chromosome X chez les mammifères (Battaglia, 2013). L'enzyme a une affinité élevée pour les amines

acétylées (Figure 1.16). On la rencontre dans le péroxysome et elle est : *(i)* surexprimée dans le foie et l'estomac; *(ii)* sous-exprimée dans le cœur, le thymus, l'intestin grêle, les muscles, le pancréas, l'utérus et les seins; *(iii)* et très sous-exprimée dans le cerveau, la peau et les testicules de souris. C'est une enzyme monomérique ayant deux isoformes.

 $\begin{array}{cccc} N^{1}\mbox{-}Acétyl spermine & + & O_{2} & + & H_{2}O & \longrightarrow & Spermidine & + & H_{2}O_{2} & + & 3\mbox{-}Acétamidopropanal (A) \\ \hline Acétyl \mbox{-}Pate & - & Putrescine & + & H_{2}O_{2} & + & 3\mbox{-}Acétamidopropanal (B) \\ \hline \end{array}$

1.2.2.2 Monoamine oxydases (MAO)

Les MAO sont localisées dans la membrane externe des mitochondries et catalysent la désamination oxydative des amines biogènes et xénobiotiques au niveau du système nerveux central et périphérique. Contrairement aux autres flavoamine oxydases, la MAO établit des liaisons covalentes avec la FAD. Elle est connue par son rôle dans le ciblage des médicaments antidépresseurs et neuroprotecteurs. Le gène de la MAO est exprimé sur le chromosome humain X. Elle possède deux isoformes issues de l'épissage alternatif à savoir : A et B, notées MAO A et MAO B, respectivement. Les deux isoformes ont approximativement 70% de similitude pour la séquence primaire. MAO A et MAO B sont coexprimées dans la majorité des tissus humains à l'exception :

- du placenta, où l'expression de MAO A est prédominante
- des plaquettes sanguines et des lymphocytes qui expriment majoritairement la MAO B.

Le site de liaison de la MAO B représente une «cage» aromatique formée par deux résidus de tyrosine à la position 398 et 435, respectivement. Le site de liaison permet de distinguer la MAO B de la MAO A et de sélectionner des inhibiteurs spécifiques

Figure 1.16 : Mécanisme d'action de l'acétylpolyamine oxydase.

Désamination oxydative de (A) l'acétylspermine et de (B) l'acétylspermidine par l'acétylamine oxydase avec formation de l'aldéhyde correspondant (spermidine ou putrescine), du peroxyde d'hydrogène et de la 3-acetamidopropanal (d'après Gawandi *et al.*, 2007).

pour chaque isoforme la déprenyl et la clorgyline pour la MAO B et A, respectivement (Knoll, 1989). (Knoll 1972 et johnston 1968).

Les substrats spécifiques de la MAO A sont des amines biogènes telles que la sérotonine, la norépinéphrine et l'épinéphrine; tandis que la MAO B a une plus grande affinité pour la benzylamine (Lewinsohn *et al.*, 1978) et phenyléthylamine (Grimsby *et al.*, 1997). De plus, la MAO B décompose les amines xénobiotiques telles que la 1-méhyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (qui est oxydée en une espèce neurotoxique impliquée dans le développement de la maladie de Parkinson). La dopamine, la tyramine et la tryptamine sont des substrats communs aux deux isoformes.



Figure 1.17 : Structure secondaire de la monoamine oxydase B humaine. La monoamine oxydase B est constituée de deux monomères représentés en bleu et rouge (PDB :1GOS).

La MAO A est constituée de 411 acides aminés avec un poids moléculaire de 46.5 kDa, tandis que la MAO B, rencontrée dans la membrane externe mitochondriale chez l'humain et mentionnée à titre d'exemple (PDB : 1GOS), est une enzyme (EC 1.4.3.4) dimérique, symétrique (Figure 1.17) et non glycosylée, constituée d'environ 35 % d'hélice α , 18 % de feuillet β , 520 résidus avec une masse moléculaire de 59.5 kDa approximativement. La modification post traductionnelle serait caractérisée par l'acétylation du résidu de sérine à la position 2.

1.2.2.3 D-amino acide oxydase (D-AAO)

Le gene de la D-AAO (EC 1.4.3.3) est localisé sur le chromosome 14 chez les mammifères et est exprimé majoritairement dans les reins de porc. Cette amine oxydase est localisée dans la membrane externe mitochondriale, le peroxysome, la membrane externe du péroxysome et dans le cytosol. Elle jouerait un rôle dans la dimérisation des protéines. De plus, la D-AAO catalyse la désamination des acides aminés (proline, D-sérine et D-alanine) en oxo carboxylate correspondant (Figure 1.18). tout comme la MAO B, la D-AAO (PDB : 3WGT) est un dimère (Figure 1.19) non glycosylé constiitué de 347 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 39.3 kDa et une prédominance pour la conformation hélice α (soit 30% hélice α et 28 % feuillet β).

Figure 1.18 : Mécanisme d'action de la D-amino acide oxydase. Désamination oxydative du D- α -acide aminé par la D-amino acide oxydase avec formation de l'oxocarboxylate, du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniac.

Des études antérieures ont montré que la D-AAO présente dans les reins de porc (rp) serait convertie en une autre amine oxydase R-stéréosélective (D-AAOrp) et son rôle consisterait à déracémiser les acides aminés racémiques indiqués à l'exemple de la méthylbenzylamine.



Figure 1.19 : Stucture secondaire de la D-amino acide oxydase. La D-amino acide oxydase est une enzyme homodimérique, chaque monomère se distingue par la couleur. La structure cristalline a été obtenue au rayon X (PDB : 3WGT)

1.2.2.4 Polyamine oxydases (PAO)

L'intérêt pour le métabolisme des polyamines s'est accru au milieu XX Siècle grâce à son effet antitumoral. En effet, l'accumulation d'analogues de polyamine induirait la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire par apoptose en stimulant le catabolisme des polyamines par la PAO avec la production concomitante du H_2O_2 toxique.

Les PAO sont généralement des homodimères non symétrique (PBD : 1H81), contenant une molécule de FAD par monomère. Elles oxydent l'amine secondaire des polyamines telles que la spermine, la spermidine (Figure 1.20), la N¹-acetylspermine, la N¹-acetylspermidine (Tableau 1.1) et dans certaines situations la nor-spermine.

Spermidine +
$$O_2$$
 + H_2O
 $\xrightarrow{Polyamine}$ Aminobutanal + H_2O_2 + Propane-1,3-diamine
 $\xrightarrow{oxydase}$

Figure 1.20 : Mécanisme d'action des polyamines oxydases.

Désamination oxydative de la spermidine et formation de l'aminobutanal avec une production concormitante du péroxyde d'hydrogène et du propane-1,3-diamine.

Tableau 1.1 : Les différents substrats de la polyamine oxydase et de la N¹-acétylpolyamine oxydase.

La c	constante	de N	Aichaelis	(Km)	obtenue	suite	à la	désamin	ation	oxydative	de	différe	nts
subs	strats par l	la poly	yamine oz	xydase	(PAO) p	H 6.5	et la	N ¹ -acétyl	polya	mine oxyda	ase	(N ¹ -acé	tyl
PAC	D), à 30 °C	C dan	s 50 mM	KH ₂ PO	O4/KOH,	pH 7.	6 (d'	après Li e	et al.,	2006).			

	K _M (μM)			
Substrats	PAO (pH 6.5)	N ¹ -acétylPAO (pH 7.6)		
N ¹ -Acetyl-SPM	62	1.78 ± 0.10		
N ¹ -Acetyl-SPD	274	36.8 ± 1.1		
SPM	38	716 ± 33		
SPD	40	0		
BESPM		150 ± 10		
BENSPM		157 ± 7		

SPM, spermine; SPD, spermidine; BESPM, N¹,N¹²-bisethylspermine

Exprimée chez les *Brassicaceae* et les *Poaceae*, on retrouve la PAO dans la paroi cellulaire, l'espace extracellulaire et l'apoplasme. L'absence de groupement chargé

dans son site catalytique serait responsable de la reconnaissance de substrats polyamines de grande taille. C'est une enzyme (EC 1.5.3.17) N-glycosylée (un site de glycosylation à la position 105 : N-acétyl-D-glucosamine - N4-(N-acètylamino) glucosyl-asparagine) avec une masse moléculaire autour de 56.3 KDa pour environ 472 acides aminés. La PAO a une conformation majoritairement d'hélice α (30% d'hélice α et 28% de feuillet β) Elle régulerait la concentration des polyamines intracellulaires. La structure primaire et tertiaire de la PAO de maïs furent les premières à être caractérisées par diffraction de rayon X (Figure 1.21).



Figure 1.21 : Structure secondaire de la polyamine oxydase. La structure crystalline de la polyamine oxydase a l'état réduite. Les deuxmonomère qui constituent l'enzyme se distinguent par la différence de couleur (PBD : 1H81).

1.2.3 Amine oxydases à cuivre (Cu-AO)

Différemment des FAD-AO qui peuvent catalyser l'oxydation des amines primaires, secondaires ou tertiaires (Binda *et al.*, 2002), les CuAO catalysent habituellement l'oxydation de la fonction amine primaire des polyamines et de l'histamine d'où l'appellation d'histaminase. En plus du cuivre, les Cu-DAO présentent au niveau du site catalytique un autre cofacteur : la 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone (TPQ) (Mondovi *et al.*, 1994;) issue de la modification de la tyrosine et pouvant lier des inhibiteurs tels que la sémicarbazide et l'amiloride, d'où l'appellation de AO sensible à la sémicarbazide (SSAO) ou de AO liant l'amiloride. Contrairement aux FAD-AO)

les Cu-AO sont glycosylées (à l'exception des Cu-AO d'origine bactérienne) et possèdent un signal peptidique. De plus les FAD-AO sont majoritairement des alpha protéines (prédominance de la conformation d'hélices α) or les Cu-AO sont des beta protéines (prédominance pour les conformations des feuillets β). Les Cu-AO sont des homodimères composés d'environ 700 résidus et présents dans tous les règnes du vivant (microbien, végétal et animal). La Cu-AO (EC 1.4.3.6) catalyse la déamination oxydative des amines primaires en aldéhyde correspondant avec la production concomitante du peroxyde d'hydrogène et de l' ammoniac (Figure 1.22).

Figure 1.22 : Mécanisme d'action des amines oxydases à cuivre. Désamination oxydative de l'amine primaire et formation de l'acétaldehyde correspondant avec une production de péroxyde d'hydrogène et d'ammoniac.

1.2.3.1 *Pea seedling amine oxidase* (PsAO)

PsAO est une amine oxydase homodimérique (PDB : 1KSI, Figure 1.23) extraite des plantules de petits pois verts. Elle est localisée dans la paroi cellulaire. La maturation de l'enzyme (EC 1.4.3.6) est caractérisée par la N-glycosylation des résidus d'asparagine (N4-(N-acetylamino) glucosyl-L-asparagine). La PsAO comprend 642 acides aminés (147.7kDa) avec 5 résidus de lysine par monomère et quatre sites potentiels de glycosylation (Asn131–Leu–Ser, Asn334–Gly–Thr, Asn364–Glu–Ser et Asn558–Arg–Thr) (Guss *et al.*, 2009). La modification du résidu de tyrosine de la séquence conservée en 2',4',5'-topaquinone (TPQ) (Wertz and Klinman, 2011).

La conformation bioactive de la PsAO est constituée majoritairement de feuillet β (12 % hélice α et 42 % feuillet β). Elle joue de nombreux rôles biologiques incluant la différentiation et la croissance cellulaire, et la synthèse de certains facteurs de croissance. Elle permet la régulation des amines primaires telles que la putrescine et l'histamine. La réaction catalytique requière la TPQ comme cofacteur et la présence

d'un atome de cuivre à chaque monomère. L'atome de cuivre est aussi impliqué dans la biogenèse de la topaquinone fonctionnelle et dans la maturation de l'enzyme.



Figure 1.23 : Stucture secondaire de l'amine oxydase de *Pisum sativum*. La structure cristaline de l'amine oxydase de Pisum sativum provient des pea seedlings avec une resolution de 2.2A (PDB : 1KSI).

1.2.3.2 Human diamine oxidase (hDAO)

Les mammifères à l'exemple de l'humain ont quatre gènes (AOC1-4) qui codent pour la Cu-AO :

- La AOC 1 (ou ABP1 : *Amiloride Binding Protein 1*) code pour la diamine oxydase (DAO) qui décompose l'histamine (Figure 1.24).
- L'AOC 2 code pour la rétine amine oxydase (RAO), tandis que
- L'AOC 3 code pour l'amine oxydase membranaire connue sous l'appellation de VAP-1 (Vascular Adhesion Protein-1) et
- L'AOC4 code pour la forme soluble de VAP-1, non rattachée à la membrane extracellulaire.

Histamine +
$$O_2$$
 + H_2O
Diamine
oxydase
Putrescine + O_2 + H_2O
 Δ' - Pyrroline + H_2O_2 + NH_3 (B)

Figure 1.24 : Désamination oxydative de l'histamine et de la putrescine par la DAO. (A) L'histamine et (B) la putrescine sont oxydées en imidazole acétaldéhyde et pyrroline, respectivement, avec production équimolaire du H_2O_2 et du NH₃. Les VAP-1 et RAO présentent 65% d'homologie séquentielle tandis que la DAO présente seulement ~38% d'identité avec VAP-1 ou RAO (Schwelberger, 2006).

Chez l'humain, la VAP-1 soluble proviendrait de la VAP-1 attachée à la membrane et clivée par des protéases. De plus VAP-1 serait sur-régulée dans les sites d'inflammation. La DAO a été initialement identifiée comme une enzyme qui décompose l'histamine exogène sur de differents tissus (foie et poumon) d'où l'appellation d'histaminase.

La hDAO est un homodimère (PDB : 3HI7, Figure 1.25) dont chaque sous unité comprend un ion de cuivre, deux ions de calcium et une molécule de TPQ (issue de la modification de la modification post-traductionnelle). De plus, la DAO est constituée d'environ 731 acides aminés (170.6 kDa) et présente quatre sites de glycosylation (N-acétyl-D-glucosamine - N4-(N-acétylamino)glucosyl-L-asparagine) localisés aux positions 110, 168, 538 et 745. Cette AO à majorité feuillet β (16 % Hélice α 38 % Feuillet β) assure le catabolisme des polyamine primaire et de l'histamine. Elle est également connue sous l'appellation de l'*amiloride binding AO* ou *semicarbazidesensitive AO* due au rôle inhibiteur de l'amiloride et de la sémicarbazide sur cette dernière.



Figure 1.25 : Structure cristalline de la diamine oxydase humaine. Les deux monomères se distinguent par la couleur. La diamine oxydase humaine a été exprimée chez *Drosophila melanogaster* (PDB 3HI7).

1.2.3.3 Protéine-lysine 6-oxydase

Extraite de levure (*Pichia pastoris*) la protéine-lysine 6-oxydase (PDB : 1N9E, Figure 1.26) est une enzyme ubiquitaire, appartenant à la famille des lysyl oxydases (EC 1.4.3.13). Elle est synthétisée sous forme d'une pré-protéine de 50 kDa contenant 3 domaines :

- le signal peptidique constitué des 21 prémiers résidus d'acides aminés
- le domaine pro-peptidique (du 22^{ème} au162^{ème} acides aminés) et
- le domaine catalytique C-terminal (du 162^{ème} au 417^{ème} acide aminé), de

32 kDa, est activé après clivage protéolytique.

La protéine-lysine 6-oxydase est un homodimère avec une conformation secondaire constituée majoritairement de feuillet β (13% d'hélice α et 37% de feuillets β). Le mécanisme d'action de la protéine-lysine 6-oxydase consiste en l'oxydation des résidus de peptidyl lysine et d'hydroxylysine dans le collagène et les résidus de lysine dans l'élastine pour produire du peptidyl α -aminoadipique- δ -semialdéhydes (Sethi *et al.*, 2012).



Figure 1.26 : Structure secondaire de la lysine oxydase. La structure cristalline de la lysine oxydase de Pichia pastoris présente deux monomères représentée par différente couleur (PDB : 1N9E).

Les amine oxydases sont impliquées dans des modifications post traductionnelles des protéines. L'oxydation des acides aminés avec des groupes amines libres (la lysine, l'arginine) des protéines constituant les villosités intestinales peut conduire à la rétention (liaison covalente) des amine oxydases à la lumière intestinale (Wang et al., 1996).

La protéine-lysine 6-oxydase est essentielle au cours de la morphogenèse :

- Développement musculaire, des voies respiratoires distales et proximales et à la formation d'alvéoles dans les poumons
- Affecte de la différenciation des ostéoblastes en formant des réticulations dans la matrice de collagène environnante
- Impliqué dans la réparation des tissus conjonctifs des systèmes cardiovasculaire, respiratoire, squelettique et d'autres organes.
- Induire une réticulation entre les lysines des histones du noyau (Kagan and Li, 2003).
- Agent chimiotactique puissant pour les monocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires

1.2.3.4 Amine oxydase sérique (SAO)

La SAO extraite de sérum de boeuf est un homodimère (PDB : 1TU5, Figure 1.27) dont chaque sous-unité contient deux ions de calcium, un ion de cuivre et une molécule de TPQ (issue de la modification post-traductionnelle).

Les deux monomères sont structuralement équivalents (excluant des différences mineures observées au niveau de leur site actif respectif). Toute fois le site catalytique de l'enzyme diffère de celui des autres Cu-AO d'où la spécificité du substrat. Constituée de 762 résidus (dont les 16 premiers constituent le signal peptidique et le reste la protéine proprement dite), de 168 kDa, de 13 % Hélice α et de 37 % Feuillet β , la SAO oxyde l'amine primaire des amines biogènes aliphatiques. (Seiler, 1995; Schwelberger, 2007).



Figure 1.27 : Structure secondaire de l'amine oxydase à cuivre du plasma de bovin. Les deux monomères de l'amine oxydase sérique bovine se distingue par les couleurs (PDB : 1TU5).

1.2.3.5 Phényléthylamine oxydase

La phényléthylamine oxydase extraite de *Arthrobacter globiformis* (PDB : 1UI7) est une enzyme à cuivre (EC 1.4.3.21) constituée de : *(i)* 638 acides aminés (140 kDa), *(ii)* feuillets β principalement (41% feuillets β versus 11% hélice α), *(iii)* deux sous unités non glycosylées et *(iv)* de la TPQ provenant de la modification post-traductionnelle du résidu de tyrosine (Ruggiero *et al.*, 1997). Le mécanisme d'action consiste à la désamination oxydative de la 2-phényléthylamine (Figure 1.28).

2-phényléthylamine + O_2 + H_2O \longrightarrow 2-phénylacétaldéhyde + H_2O_2 + NH_3

Figure 1.28 : Mécanisme d'action de la phényléthylamine oxydase. Désamination oxydative de la 2-phényléthylamine par la phényléthylamine oxydase.



Figure 1.29 : Structure secondaire de la phényléthylamine oxydase La structure cristalline de la phényléthylamine oxydase d'*Arthrobacter globiformis* exprimée dans *Escherichia coli* (PBD : 1UI7).

1.2.3.6 Tyramine oxydase

La tyramine oxydase (EC 1.4.3.9) extraite de *E. coli* strain K12 (plus précisément du périplasme) est une protéine homodimérique, non glycosylée (PDB : 2W0Q) qui catabolise avec une haute affinité la phénylalanine et la phényléthylamine. Chaque sous unité comprend un ion de cuivre, un ion de manganèse, deux ions de calcium et une molécule de TPQ. La séquence peptidique est constituée d'un signal peptidique (de 1 à 30 résidus d'acide aminés) et de la protéine proprement dite (de 31 à 757 acide aminés, 169 kDa). Constituée de 12 % d'hélice α et de 42 % de feuillet β , la tyramine oxydase est inhibée par la 2-hydrazinopyridine (Hare, 1928).

1.2.3.7 Méthylamine oxydase

La méthylamine oxydase isolée du péroxysome de la levure (*Hansenula polymorpha*) est constituée de 692 résidus (PDB : 1A2V). C'est un homodimère (12 % Hélice α et 42 % Feuillet β) dont chaque sous unité a un PM de 77.5 KDa, une molécule de TPQ, un ion de cuivre (ou de zinc) et un ion de manganèse. On y retrouve également un site de glycosylation à la position 243 (Dooley *et al.*, 1990).

1.2.4 Mécanisme d'action de la Cu-AO d'origine végétale

L'oxydation des amines biogènes par la DAO est médiée par la TPQ. L'implication directe du cuivre n'a pas été démontré; toutefois, il se pourrait que le cuivre joue un rôle dans l'orientation de la TPQ vers le site catalytique et faciliterait la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène.

La TPQ dériverait de la post-traduction d'un résidu de tyrosine conservé. De plus, la TPQ stimulerait la conversion des polyamines (avec une fonction amine primaire) en aldéhyde correspondant via un mécanisme de type 'ping-pong' caractérisé principalement par un processus de transamination qui se déroule en deux demi réactions consécutives (Figure 1.30).

(1) La première est une réaction de désamination oxydative conduisant à :

- L'oxydation du substrat aminé en aldéhyde correspondant
- La réduction du Cu²⁺ et du TPQ en Cu⁺ et en aminoquinol (TPQ réduit)

(2) La seconde est une réoxydation de l'enzyme réduite en présence d' O_2 avec à :

- La conversion de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)
- La libération de NH₃
- L'oxydation du TPQ et du cuivre (retour à leur forme oxydée respective)

Dans le règne végétal, la DAO est exprimée dans les céréales (maïs), les légumineuses (L*entica arietinum, Cicer arietinum, Pisum sativum*, et *Lathyrus sativus*) et dans certaines herbacées (*Arabidopsis thaliana*). L'affinité de La DAO pour le substrat diffère en fonction de la source d'extraction de l'enzyme (mono- et dicotylédones) et de la nature du substrat (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Les différents substrats de la diamine oxydase.

Activité de la DAO de différentes sources végétales en présence de substrat aminé (d'après Pietrangeli *et al.*, 2007).

Vitesse de la réaction (% de nutrescine consommée)

	vitesse de la reaction (vo de partesente consommee)								
Substrat	Euphorbia characias	Glycine max	Lathyrus sativus	Lens esculenta	Pisum sativum	Vicia faba			
1,3-Diaminopropane	0	0	0	0	0	2			
Putrescine	100	100	100	100	100	100			
Cadavérine	100	183	81	91	111	90			
1,6-Diaminohexane	56		21	31	44				
Agmatine	43	52	19	15	56	64			
Histamine	0	4	_	0	30	9			
Spermidine	0	81	31	40	56	52			
Spermine	0	15	18	20	8	8			



X = O R = groupement aryle ou alkyle Cu = cuivre

Figure 1.30 : Mécanisme de transamination des amines biogènes.

La molécule de TPQ de la diamine oxydase se lie à l'amine biogène pour former une base de Schiff. La réduction de la base de Schiff en présence d'eau conduit à la formation de l'aldéhyde correspondant et le TPQ réduit est oxydé en présence de l'oxygène, prêt à lier de nouveau à un substrat aminé (d'après Largeron, 2017).

1.3 Modèle *in vitro* pour investiguer les applications de la diamine oxydase végétale (vDAO) : les cellules Caco-2

L'administration orale constitue la voie de prédilection pour la livraison de la diamine oxydase végétale au niveau intestinal. L'environnement intestinal présente une structure et une organisation cellulaire lui permettant d'assurer des fonctions de barrière et d'absorption. De ce fait, la perte d'intégrité de l'intestin suite à un processus d'inflammation aigüe pourrait entrainer le développement de nombreuses pathologies. Dans cette section, il est question de présenter un modèle cellulaire adéquat pour les études *in vitro* de la diamine oxydase administrable par voie orale.

1.3.1 Présentation générale de l'intestin grêle

La muqueuse intestinale est constituée de quatre couches tissulaires jouant chacune un rôle spécifique dans l'intégrité de l'intestin. De la lumière intestinale à la circulation générale, on distingue la muqueuse, la sous muqueuse, musculeuse et la séreuse. La muqueuse est constituée de villosités formant des replis d'un millimètre de hauteur environ. Les villosités, quant à elles, sont tapissées par l'épithélium intestinal (Figure 1.31 B) essentiellement constitué de cellules cylindriques : les entérocytes (Figure 1.31 B). Ces cellules polarisées présentent un pôle apical orienté vers la lumière intestinale et d'un pôle basal orienté vers la circulation générale. Le pôle apical est constitué de nombreuses microvillosités qui sont de minuscules replis de la membrane plasmique, dont la morphologie dépend d'un réseau de microfilaments d'actine formant ainsi la bordure en brosse (Figure 1.31 B).



Figure 1.31 : Schéma général de l'épithélium intestinal (A) et d'un entérocyte (B) (d'après Lorrot *et al.*, 2006).

1.3.2 Épithélium intestinal

L'épithélium intestinal (Figure 1.31 A) est généralement sous forme d'un prisme régulier et est constitué d'une monocouche cellulaire d'une épaisseur de 40 à 70 μ m, renouvelable tous les 3 à 6 jours (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013). Il joue le rôle d'une barrière protectrice et sélective face aux nutriments. On y retrouve en grande partie des entérocytes (liés entre eux par des jonctions serrées) les cellules caliciformes (sécrétrices de mucus et localisées à la lumière intestinale) et les cellules entéro-endocrines. Les cellules entéro-endocrines dérivent de cellules souches situées à la base des cryptes de Lieberkühn. Les cellules entéro-endocrines prolifèrent et se différencient tout en migrant dans le sens ascendant le long de l'axe crypte-villosité.

la différentiation cellulaire, l'entérocyte acquiert des (*i*) caractéristiques morphologiques et structurales d'une cellule absorbante avec l'apparition d'une bordure en brosse orientée vers le lumen intestinal et d'une structure polarisée (pole apical et pole basal); (*ii*) caractéristiques fonctionnelles dont les enzymes digestives (sucrases) utilisées comme des marqueurs de différentiation cellulaire.

Une croissance similaire à cette bordure en brosse a également été observée dans l'étude *in vitro* des cellules Caco-2 avec des marqueurs de différentiation tels que les dissacharidases (Van Beers *et al.*, 1995), les dipeptidases et la phosphatase alcaline (Howell *et al.*, 1992). La différenciation des cellules Caco-2 sur des filtres d'insert de polycarbonate conduit à la formation d'un tapis cellulaire en monocouche, avec des cellules liées entre elles par des jonctions serrées. De ce fait, la perte d'intégrité des cellules Caco-2 en cas de toxicité marquée par une hyperperméabilité paracellulaire et une absence de la fonction de certains marqueurs enzymatiques pourrait être transposées chez l'humain lors du dépistage de l'intégrité de l'intestin.

1.3.3 Modèle d'étude in vitro

Depuis plus de 30 ans la lignée Caco-2 provenant d'un homme caucasien de 72 ans atteint de l'adénocarcinome colorectal (Fogh *et al.*, 1977) a été sélectionnée comme modèle cellulaire pour les études *in vitro* au niveau intestinal. Les cellules en culture se différencient pour former une monocouche d'entérocytes polarisés. Ces entérocytes ressemblent à ceux de l'intestin grêle puisqu'elles présentent des microvillosités ainsi que plusieurs protéines de transport, à savoir les systèmes de transport de sucres (Bissonnette *et al.*, 1996), d'acides aminés, des acides gras et cholestérols (Hiebl *et al.*, 2020).

De plus, le Centre Européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM) a trouvé fort intéressant de standardiser les cellules Caco-2 pour des études d'absorption, de métabolisme et de cytotoxicité des xénobiotiques (Delie and Rubas, 1997; Carriere *et al.*, 2001; Sambuy *et al.*, 2005). Ainsi, ce modèle a été amélioré, optimisé et proposé comme une lignée cellulaire de choix, présentant un phénotype entérocytaire utile pour l'étude des fonctions intestinales (Prieto, 2002).

L'article *Good Caco-2 cell culture practices* (Natoli *et al.*, 2012), présente les Caco-2 comme une lignée de cellules épithéliales promptes à se différencier et à présenter un phénotype entérocytaire.

En général, la polarisation et la différenciation des cellules Caco-2 en entérocytes (Figure 1.32 A) se traduirait par une stabilisation de la résistance électrique Transépithéliale (TEER) autour de 15 à 21 jours post-ensemencement (Johannessen *et al.*, 2013) (Figure 1.32 B) un milieu de culture modifié de Dulbecco supplementé avec 15% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non essentiels et 2 mM de L-glutamine. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C en présence de 5% de dioxyde de carbone et d'une humidité relative de 95%. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.



Figure 1.32 : Différentiation des cellules Caco-2.

(A) Cellules observées via un microscope à contraste de phase (grossissement 40X). (B) corrélation de la différentiation cellulaire avec les valeurs de TEER (d'après Johannessen *et al.*, 2013).

Tout comme les entérocytes, on retrouve également des marqueurs enzymatiques à différents stades de développement et de différentiation des cellules Caco-2. La détection des activités de ces marqueurs tels que la sucrase, l'ornithine décarboxylase

et la diamine oxydase (Figure 1.33) a été répertoriée par l'équipe de D'Agostino (D'Agostino *et al.*, 1989).C'est ainsi que durant la croissance exponentielle à trois jours, on observe une activité faible de la DAO dans les cellules et dans le milieu cellulaire exposé aux cellules pendant 2 jours consécutifs (Figure 1.33).



Figure 1.33 : Marqueurs de croissance et de différentiation des cellules Caco-2 (d'après D'Agostino *et al.*, 1989).

Les Caco-2 représenteraient le modèle *in vitro* par excellence des cellules intestinales pour des études physiologiques de l'intestin et pour des études *in vitro* de toxicologie (Sambuy *et al.*, 2005). Toutefois, des problèmes de reproductibilité et de variabilité intrinsèque rendent difficile la comparaison de résultants entre différents laboratoires, à cause des différentes conditions liées à la culture, telles que le type du sérum, les

différents sérums ajoutés au milieu de culture, le nombre de passages, et la source des clones (Zucco *et al.*, 2005).

Dans l'étude pour la caractérisation de l'action de la DAO au niveau intestinal, il est capital de choisir un modèle cellulaire représentatif d'un épithélium intestinal humain : d'où le choix du modèle cellulaire Caco-2 qui a été utilisé tout récemment comme modèle cellulaire dans l'évaluation de la DAO associée ou non `la catalase contre l'effet toxique de l'histamine (Figure 1.34) (Jumarie *et al.*, 2017).



Figure 1.34 : Effet de la DAO et de l'histamine sur la prolifération des Caco-2 de 21 jours. Les cellules ont été exposées à l'histamine en présence ou non de la DAO 0.77 mg/mL ou de la DAO 0.77 mg/mL + catalase 0.77 mg/mL, le tout pré-incubé pendant 10 min ou 2 heures à 37 °C (d'après Jumarie *et al.*, 2017).

1.4 Projet de recherche

1.4.1 Problématique

L'excès d'histamine alimentaire générant un déséquilibre peut être reconduit dans la circulation générale par des transporteurs de cations organiques (OCT). Ainsi, l'augmentation du taux d'histamine aux différents niveaux serait impliquée de façon directe ou indirecte dans l'apparition des phénomènes de type pseudo-allergies, ou encore le développement et le maintien des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). De plus une perte d'activité de la DAO intestinale serait associée au développement des MICI.

De plus, cet excès d'histamine pourrait produire le même effet qu'un allergène (provoquant la libération de l'histamine par la dégranulation au niveau des mastocytes), pourrait être nocif et dans certaines situations pourrait conduire à la mort.

1.4.2 Hypothèses de travail

Des travaux antérieurs (Wang *et al.*, 1996) ont montré la capacité de l'amine oxydase sérique de reconnaître la polylysine et des lysines des protéines. Ainsi, en tenant compte du fait que le tractus gastro-intestinal (TGI) est garni de composés protéiques possédant des fonctions E-aminoalkyl de la lysine (semblables à la cadaverine), nous avons émis l'hypothèse que la DAO oxyderait des fonctions aminohexyl et conduirait à la formation de groupements aldéhydes. À leur tour, ces fonctions aldéhydes pourraient lier de façon covalente la fonction amine libre des lysines de la DAO. De cette liaison hypothétique de la DAO aux fonctions aminos libres de la lysine des protéines au niveau de la muqueuse intestinale résulterait une immobilisation de la DAO pendant approximativement 72h (temps nécessaire pour que la muqueuse intestinale.

La DAO endogène ou administrée par voie orale libère en présence des amines biogènes (histamine, tyramine) du peroxyde d'hydrogène (pro-oxydant et proinflammatoire). C'est la raison pour laquelle, notre concept consiste à ajouter de la catalase à de la DAO administré par voie orale (Calinescu *et al.*, 2012).

Face à cette problématique, nous proposons la diamine oxydase (DAO)/histaminase végétale associée à la catalase comme un agent thérapeutique bi-enzymatique efficace pour le traitement des allergies alimentaires. L'enzyme thérapeutique DAO extraite des légumineuses et administrable par voie orale pourrait, grâce à son activité de désamination oxydative (jusqu'à 30 fois supérieure à celle commerciale d'origine animale) renforcer l'activité de la DAO intestinale chez des sujets en condition d'entérite inflammatoire.

Comparativement aux agents antihistaminiques commercialisés qui bloquent les récepteurs histaminiques, l'emploi de la DAO administrable par voie orale, pourrait réduire les complications liées aux histaminoses en décomposant l'histamine exogène, le principal acteur impliqué dans les allergies et les entérites inflammatoires.

Le projet dans son ensemble vise l'administration orale de la DAO. Des travaux antérieurs (Calinescu *et al.*, 2012) ont montré que la formulation de la DAO avec le carboxyméthyl amidon protégeait l'enzyme de l'acidité gastrique et favorisait sa livraison dans l'intestin. Une fois dans l'intestin, la Dao serait sujette à des contraintes physicochimiques (pH, osmolarités, protéines, acides abiliaires, sucs pancréatiques) et à des forces mécaniques (motilité) d'où l'hypothèse que la DAO aurait une interaction avec les composantes du milieu intestinal. De plus, considerant que 70% des mastocytes intestinaux interagissent avec les nerfs afférents du système nerveux entérique et que l'histamine induit la contraction des muscles lisses, nous avions émis l'hypothèse que la DAO végétale régulerait la motilité intestinale en situation d'histaminose.

1.4.3 Objectifs de recherche

En se basant sur nos hypothèses, l'objectif global de ce travail consistait à investiguer les applications *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* de la DAO d'origine végétale dans des

situations d'histaminoses induites au laboratoire. Pour cela, il était primordial de travailler avec un matériau végétal relativement pur et stable dans des fluides simulant le milieu intestinal (Figure 1.35), ce qui constituait notre premier objectif spécifique (Chapitre II).

Chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la dysmotilité intestinale conduit à de nombreux inconforts tels que la constipation ou des diarrhées sanguinolentes. Ces dérégulations sont souvent à l'origine d'abandon d'emploi et d'isolement social du malade. Dans ce contexte, des études ultérieures ont mis en évidence le rôle inducteur et aggravant de l'histamine dans la dysmotilité intestinale.

Le chapitre III de ce projet a pour objectifs: (*i*) de confirmer *in vitro* la contractibilité du colon de souris après un traitement à l'histamine; (*ii*) d'évaluer le rôle antispasmodique de la DAO sur la contraction d'un colon de souris, exacerbée par l'histamine; (*iii*) d'investiguer l'effet amplificateur de la vitamine B6 sur l'activité de la DAO végétale en présence d'histamine et (*iv*) d'évaluer par la microscopie à fluorescence la capacité de rétention *in vivo* de la DAO sur les parois du colon de souris.

Le chapitre IV porte sur des études *in vitro* et a pour objectifs: *(i)* de confirmer le rôle de l'histamine comme agoniste des récepteurs histaminiques (exprimés sur des cellules Caco-2) et son implication dans la voie de signalisation du calcium; *(ii)* d'évaluer l'effet antihistaminique de la DAO végétale en comparaison avec celle de la desloratadine (antagoniste de H1) et *(iii)* de trouver un rapport d'efficacité de la DAO végétale par rapport à l'action de la desloratadine. En d'autres termes ce chapitre nous permettra de déterminer la concentration de la DAO correspondant à une dose thérapeutique de la desloratadine.

Pour atteindre ces différents objectifs, des approches électrophorétiques, spectroscopiques et physiologiques ont été réalisées et l'avancement du projet en fonctions des objectifs spécifiques est présenté à la Figure 1.36.





Schéma hypothétique du rôle de la diamine oxydase végétale administrable par voie orale dans le milieu intestinal simulé enrichi avec de l'alcool, des sécrétions pancréatiques (des protéases, du bicarbonate de sodium), des lipides et de l'acide cholique (d'après Neree *et al.*, 2018).

Les différents objectifs sont présentés sous formes d'articles publiés ou publiables. De plus, pour atteindre les objectifs ennumérés, l'avancement expérimental a été réalisé selon le schéma du projet présenté à la Figure 1.36.



Figure 1.36 : Présentation schématiques des différentes étapes du projet.

DAO :diamine oxydase; ConA : concanavalin A; PBS : phosphate buffer saline ou tampon phosphate saline; Hist : histamine; Deslo : desloratadine; CA : acide cholique; PB : tampon phosphate; RPM :rotation par minute.

CHAPITRE II

ARTICLE I

STABILITY OF VEGETAL DIAMINE OXIDASE (DAO) IN SIMULATED INTESTINAL MEDIA: PROTECTIVE ROLE OF CHOLIC ACIDS

Armelle Tchoumi Neree¹, Paola Pietrangeli², Pompilia Ispas Szabo¹, Mircea Alexandru Mateescu¹, Lucia Marcocci²

 ¹ Department of Chemistry, Research Chair on Enteric Dysfunctions "Allerdys" and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.
 ² Department of Biochemical Sciences "A. Rossi Fanelli", Sapienza University of Rome, Italy

Running title : DAO stability in simulated intestinal fluids Cet article a été publié dans *J. Agric. Food Chem.* 2018, 48 : 12657–12665 DOI : 10.1021/acs.jafc.8b04005

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Armelle Tchoumi Neree:

Conception du projet Réalisation de toute l'expérimentation Rédaction de la première version du manuscript Analyse des figures

Paola Pietrangeli:

Expérimentation et conception du projet Rédaction de la première version du manuscrit Analyse des figures

Pompilia Ispas Szabo:

Analyse des figures

Correction de la version finale du manuscrit

Mircea Alexandru Mateescu:

Conception et supervision du projet

Analyse des figures

Rédaction et correction de la version finale du manuscrit Recherche des fonds pour le projet

Lucia Marcocci:

Conception du projet Analyse des figures Rédaction et correction de la version finale du manuscrit

1.5 Résumé

Les amines amines biogènes alimentaires, en particulier l'histamine, sont impliquées dans divers dysfonctionnements entériques et vasculaires. Il y a plusieurs années, l'administration orale de diamine oxydase contenant du cuivre (DAO), également appelée histaminase, capable d'éliminer par désamination oxydative les amines biogènes, a été suggérée comme complément alimentaire pour contrôler les allergies alimentaires et les dysfonctionnements entériques. Ce rapport vise à générer une image globale du comportement des formes posologiques de DAO administrées par voie orale dans le tractus intestinal. La stabilité catalytique du DAO de semis de *Lathyrus sativus* dans divers milieux intestinaux simulés avec un pH différent et contenant différentes associations d'acides choliques, de protéases pancréatiques, de bicarbonate, de lipides ou d'alcool a été étudiée. Les acides choliques et les lipides protégeaient l'enzyme dans les fluides intestinaux simulés. Cependant, ils n'étaient pas en mesure de protéger contre l'effet inhibiteur de l'éthanol à 24-36% (ν/ν). Ces observations peuvent être pertinentes pour l'administration orale d'enzymes comme compléments alimentaires ou comme agents bioactifs thérapeutiques.

Mots-clés : Diamine oxydase, DAO végétal, histamine, histaminase, acides choliques, stabilité des protéines, fluides intestinaux simulés, compléments alimentaires, formulation de médicament par voie orale, éthanol, bicarbonate de sodium, MICI, dysfonctionnements entériques, allergie alimentaire

1.6 Abstract

Food biogenic amines, in particular histamine, are often responsible of various enteric and vascular dysfunctions. Several years ago, the oral administration of coppercontaining diamine oxidase (DAO), also called histaminase, able to oxidatively deaminate biogenic amines, has been suggested as food supplement to control food allergy and enteric dysfunctions. This report is aimed to generate a global image on the behavior of orally administrated DAO dosage forms in the intestinal tract. The catalytic stability of DAO from Lathyrus sativus seedlings in various simulated intestinal media with different pH and containing different association of cholic acids, pancreatic proteases, bicarbonate, lipids or alcohol was investigated. Cholic acids and lipids protected the enzyme in the simulated intestinal fluids. However, they were not able to protect against the inhibitory effect of ethanol 24-36 % (ν/ν). These observations may be relevant for oral administration of enzymes as food supplements or as therapeutic bioactive agents.

Keywords : Diamine oxidase, vegetal DAO, histamine, histaminase, cholic acids, protein stability, simulated intestinal fluids, food supplements, oral drug formulation, ethanol, sodium bicarbonate, IBD, enteric dysfunctions, food allergy

Abbreviations : AAP, aminoantipyrine; BSA, bovine serum albumin; CA, cholic acid; DAO, diamine oxidase; DCA, deoxycholic acid; DCHBS, 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonic acid; DPPC, dipalmitoyl phosphatidylcholine; EIC, extract of intestinal content; FaSSIF, fasted state simulated intestinal fluid; FeSSIF, fed state simulated intestinal fluid; HRP, horseradish peroxidase; IBD, inflammatory bowel disease; PB, phosphate buffer; SIF, simulated intestinal fluid.

1.7 Introduction

Histamine, beta-phenylethylamine, tyramine, tryptamine, putrescine, cadaverine, spermine, spermidine are biogenic amines considered responsible of various enteric and vascular dysfunctions. They are of endogenous origin or taken exogenously from wines, beer, milk, aged cheeses, cured sausage, ham, scombroid fishes, sardines, herrings, anchovies, pickles, sauerkraut and some fruits as a consequence of fermentation process or improper storage (Bodmer *et al.*, 1999; Landete *et al.*, 2005; Lavizzari *et al.*, 2007).
Generated endogenously from histidine by histidine decarboxylase in mast cells, basophils, lymphocytes T and dendritic cells or absorbed from food at the level of the intestinal lumen to the systemic blood flow via the organic cationic transporter (OCT), histamine has various functions. It acts as neurotransmitter, regulator of vascular tonus, controller of gastric acidity, enhancer of intestinal motility and also as modulator of the immune response under allergic or inflammatory conditions (Jones and Kearns, 2011). In particular, it is the etiological agent of food allergies, food intolerance and food histaminosis (condition characterized by symptoms similar to those induced by allergenic factors, for which there is no current treatment) (Sattler *et al.*, 1988; Maintz and Novak, 2007). As pro-inflammatory agent, histamine has also an important damaging role in inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis (Smolinska *et al.*, 2014).

More than ten years ago, the oral administration of copper-containing diamine oxidase (DAO), a catabolic enzyme for various biogenic amines, has been suggested as useful to lower the level of food-contained biogenic amines (Mondovi *et al.*, 2013; Manzotti *et al.*, 2016). In particular, DAO from pig kidney was indicated as an efficient enzyme to catabolize histamine (this is why it is also called histaminase) and it is already used as food supplement in food allergy and enteric dysfunctions (Manzotti *et al.*, 2016). However, it would be of interest to have an active orally administrated enzyme of vegetal origin, considering its higher specific activity (Befani *et al.*, 1995; Pietrangeli *et al.*, 2007), better regulatory acceptability and safety, in addition to some cultural precepts which may limit consumption of pig ingredients in food supplements. DAO from Leguminosae appeared as one of the most recommendable form exhibiting a high chemical stability, an elevated catalytic turnover and good binding affinity for histamine (Pietrangeli *et al.*, 2007). It is the most abundant soluble protein detected in the extracellular compartments(Laurenzi *et al.*, 2001) and it can be obtained at a good degree of purity with few simple and inexpensive chromatographic runs.

To exert histamine degradation within the intestinal lumen, the orally administered DAO should be also formulated in order to be protected during the passage through the gastric environment and to remain active after its release into the intestinal fluids. Formulation of DAO in monolithic tablets containing a pH-responsive excipient such as the carboxymethyl starch (CMS) has been reported to protect DAO by inactivation at pH values proper of the gastric environment and to be slowly liberated at pH values of the intestine. In fact, CMS exhibits carboxylic groups which at very low pH values are protonated and compacted, preventing the access of gastric fluid inside the tablets and exerting thus a marked protection on the bioactive DAO enzyme. At neutral pH, the carboxylic groups of CMS are, instead, deprotonated and ionized as sodium carboxylate, allowing the release of the enzyme from the tablets (Calinescu et al., 2012). Once released in the intestine, various agents, in addition to proteolytic enzymes, may drastically damage DAO. For instance, considerable quantities of sodium bicarbonate are liberated with the pancreatic secretions. Thus, DAO may be inactivated due to higher intestinal pH value of this secretion. DAO activity may be affected also by the intestinal pH values which differ along the segments of the intestinal tract but also by the presence of food components, i.e. lipids or alcohol.

With the aim to have a global image on the behavior of orally administrated vegetal DAO in the intestinal tract after its release from pharmaceutical formulation, a study on the stability of DAO, purified from Lathyrus sativus seedlings, in various simulated intestinal media is here reported. In particular, we tested the catalytic activity of different DAO concentrations in simulated intestinal media with different pH and containing cholic acids, pancreatic bicarbonate and proteases or exogenous food and drinks derived items, such as lipids or alcohol, alone or in combination.

1.8 Materials and Methods

1.8.1 Chemicals and reagents

1,4-Diaminobutane dihydrochloride (putrescine), benzylamine, hydrogen peroxide (H₂O₂), 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonic acid (DCHBS), aminoantipyrine (AAP), cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA), dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), bovine serum albumin (BSA), horse radish peroxidase (HRP), bovine liver catalase, trypsin, porcine pancreas extract (pancreatin), sodium phosphate monobasic dihydrate (NaH₂PO₄) and sodium phosphate dibasic dihydrate (Na₂HPO₄), acetic acid and sodium bicarbonate (NaHCO₃) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

1.8.2 DAO purification and characterization

DAO (EC 1.4.3.22) from *Lathyrus sativus* seedlings was prepared as previously reported (Blemur *et al.*, 2016), by homogenizing the seedlings in 50 mM phosphate buffer (pH 5.5) containing 200 mM NaCl. DAO samples, lyophilized and stored at - 80 °C, contained 0.46 ± 0.09 mg protein/mg solid, with 20.0 ± 3.2 U/mg solid. Protein concentrations were determined by Bio-Rad assay with BSA as standard. DAO catalytic activity was assayed by the rate of generation of H₂O₂ during the oxidation of putrescine in 0.1 M phosphate buffer pH 7 (PBS, pH 7) by the DCHBS - AAP - HRP method (Pietrangeli *et al.*, 2012).

1.8.3 Incubation of DAO in the different simulated intestinal media

DAO solutions, prepared at the indicated concentrations in the different media simulating intestinal fluids containing various components (proteolytic enzymes, alcohol, lipids, CA, DCA, alone or in combination), were incubated at 37 °C in a thermostated water bath. At pre-established intervals aliquots were withdrawn and immediately used to evaluate DAO catalytic activity. Phosphate buffer (PB), simulated

intestinal fluid (SIF), fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF) and fed state simulated intestinal fluid (FeSSIF) were prepared as reported in Tableau 2.1 (Dressman *et al.*, 1998; Pietrangeli *et al.*, 2012; Timothy and René, 2017). In the experiments performed to assess the effect of NaHCO₃ on DAO activity, the enzyme solutions were incubated at 37 °C in a cell incubator under a 5% $CO_2 - 95\%$ humidified air atmosphere to maintain the pH at a constant value.

1					2
Composition	PB	SIF	FaSSIF	FaSSIF	FeSSIF
	pH 7	pH 6.8	pH 6.8	рН 6.5	рН 5.5
NaH ₂ PO ₄	39.0	-	-	28.6	-
Na ₂ HPO ₄	61.0	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	50.0	28.7	-	-
NaOH	-	13.2	-	8.7	101.0
NaCl	-	-	-	105.9	202.0
KC1	-	-	220.0	-	-
Acetic Acid	-	-	-	-	144.0
pН	7.0	6.8	6.8	6.5	5.5
Conductivity (mS)	8.3	6.0	32.3	12.8	33.1

Tableau 2.1: Composition and characteristics of SIF (mM) used in this study

1.8.4 Assay of DAO activity: measurement of H₂O₂ formation by DCHBS-AAP-HRP method using putrescine as a substrate

DAO activity was measured by detecting the formation of H_2O_2 during the oxidation of putrescine, in a coupled reaction with horseradish peroxidase. Although histamine is the more relevant substrate of vegetal DAO from a physiological point of view, putrescine was used as it is the most efficient substrate for vegetal DAO (Pietrangeli *et al.*, 2007) (for *Lathyrus* : putrescine Kcat 262 s⁻¹, Km 2.7x10⁻⁴ M; histamine Kcat 10.3 s⁻¹,Km 7.9x10⁻⁴ M). Consequently, the method is fast and sensitive.

Specifically, DAO samples were diluted in indicated media in a spectrophotometric cell to a final concentration of 0.6×10^{-3} mg solid/mL, AAP (0.1 mM final concentration), DCHBS (1 mM final concentration), HRP (3.6 U/mL) and putrescine (3 mM final concentration), as substrate, were then added and the rate of formation of

a pink adduct, generated from the reaction of DCHBS with AAP (oxidized by H_2O_2 in the presence of HRP), was followed at 25 °C and at 515 nm. The rate of H_2O_2 formation was calculated assuming an extinction coefficient of 2.6×10^4 M⁻¹cm⁻¹ (Pietrangeli *et al.*, 2012) and DAO activity expressed in enzymatic units (U). One unit corresponded to 1 µmole of H_2O_2 generated/min.

1.8.5 Assay of DAO activity : measurement of benzaldehyde formation using benzylamine as a substrate

DAO activity was also measured by following at 250 nm directly the formation of benzaldehyde when benzylamine was used as a substrate. As benzylamine is not an efficient substrate of DAO (Pietrangeli *et al.*, 2007) (for *Lathyrus* : Kcat 3.7 s⁻¹; Km 2.9×10^{-4} M), this method is less sensitive then that using putrescine and horseradish peroxidase; however, as a direct method to measure the catalytic activity of DAO, it is less inclined to interferences. Specifically, DAO samples were diluted in indicated media in a quartz spectrophotometric cell to the final reported concentrations. Benzylamine was then added (up to 3 mM final concentration) and the rate of formation of benzaldehyde was followed at 25 °C and at 250 nm. The concentration of benzaldehyde was calculated by assuming a molar extinction coefficient of 12 500 M^{-1} cm⁻¹ (Bellelli *et al.*, 2000). A rate of 1 µmole of benzaldehyde formed/min corresponded to 1 U of DAO activity.

1.8.6 Preparation of lyposomes

Liposomes were prepared as reported (Michelson *et al.*, 1980). Briefly, a volume from a chloroform solution containing 3 mM DPPC alone or 0.75 mM DPPC and 3 mM CA was evaporated under vacuum to form a thin film on the surface of a glass container connected to a rotary evaporator. The same volume of FaSSIF pH 6.5 buffer was then added and the film resuspended at 50 °C by a slow rotation. The obtained suspension was sonicated three times at interval of 30 sec at 37 °C with a probe-type sonicator, stored at 4 °C and used in the next three days.

The day of the experiment, FaSSIF pH 6.5 suspensions containing liposomes, DAO, trypsin or pancreatin in the indicated concentrations were prepared and incubated at 37 °C in a water bath under agitation. At various intervals, aliquots were withdrawn and DAO activity measured by the DCHBS-AAP-HRP method as described above.

1.8.7 Preparation of extracts from rat intestinal content (EIC)

The intestinal content (feces) collected from the whole colon of sacrified Sprangue-Dawley rats, fed with standard diet, was dispersed in SIF pH 6.8 to a final concentration of 150 mg/mL and centrifuged at 15000g for 15 min; the supernatant was then collected and stored at 20 °C until used. The suspensions containing the extracts of intestinal content and DAO were then prepared and incubated at 37 °C. At various intervals aliquots were withdrawn and the catalytic activity of DAO was measured by the DCHBS - AAP - HRP method.

1.8.8 Particles size measurement

Size measurement by dynamic light scattering was used to measure the particle size average of DAO in presence of 4 M and 6 M ethanol after 0 and 24 h of incubation at 37 °C under agitation. The samples were prepared in filtered PB pH 7 (0.20 \Box m diameter filter). For each sample, size was determined in duplicate from light diffusion at 25 °C with a 90 degree scattering angle. One hundred scans of three measurements with delay of 60 s between measurements were obtained, using a Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, United Kingdom) instrument able to detect particles of diameter from 0.3 nm to 5 μ m.

1.8.9 Effect of simulated intestinal media on H₂O₂ detection by DCHBS-AAP-HRP method

Solutions of H_2O_2 at final concentrations up to 15 μ M were prepared in different media by diluting a commercial solution of H_2O_2 . DCHBS (1 mM final concentration), AAP

(0.1 mM final concentration), HRP (3.6 U/mL final concentration) were then added and incubated for 15 min at 25 °C. For each sample, absorbances at 515 nm and at 750 nm were read. The differences were calculated and subtracted by the value calculated in the sample not containing H_2O_2 .

1.8.10 Production of H₂O₂ by DAO incubated with pancreatin

DAO (0.15 mg/mL) was incubated for 24 h at 37 °C in SIF pH 6.8 containing pancreatin 1%. Aliquots were withdrawn, supplemented or not with 2000 U/mL bovine liver catalase and incubated for 15 min at 37 °C. Samples were then diluted to a final concentration of 0.6×10^{-3} mg/mL into a solution containing AAP, DCHBS, HRP at the concentrations indicated above and incubated for 15 min at 25 °C. Absorbance at 515 nm of the adduct generated from the reaction of DCHBS with AAP (oxidized by H₂O₂ in the presence of HRP) was read, and after subtraction of the background absorbance (at 750 nm), it was corrected with the value obtained in the absence of DAO; the content of H₂O₂ was calculated using 2.6×10^4 M⁻¹cm⁻¹ as the extinction coefficient.

1.9 Results and Discussion

To evaluate the enzymatic efficiency of DAO delivered in the intestinal environment, we analyzed its stability in terms of catalytic activity when incubated in the simulated intestinal fluids. PB pH 7 was considered the reference buffer and it was used to characterize the enzyme after the purification. As reported in Figure 2.1, the composition, conductivity and pH of the different fluids simulating the conditions in the intestinal sections affected the catalytic activity of DAO. For DAO concentrations ranging from 0.6×10^{-3} to 0.6×10^{-1} mg/mL, the optimal enzyme activity, evaluated as the rate of formation of H₂O₂ from the oxidation of 3 mM putrescine, was observed in buffers at neutral pH and low conductivity such as PB pH 7 and SIF pH 6.8. It decreased to about 50% in FaSSIF pH 6.8 or in FaSSIF pH 6.5 (both buffers having a high

conductivity) and it dropped to about 15% in FeSSIF pH 5.5, indicating that conditions of high conductivity and acidity are detrimental for the enzyme activity.



Figure 2.1: Stability of DAO in different simulated intestinal media.

DAO at final concentration of : A) $0.6x10^{-1}$ mg solid/mL; B) $0.6x10^{-2}$ mg solid/mL; C) $0.6x10^{-3}$ mg solid/mL was incubated at 37 °C in PB pH 7, SIF pH 6.8, FaSSIF pH 6.8, FaSSIF pH 6.5, FeSSIF pH 5.5 (from darkest to lightest shade). At the indicated times, aliquots were withdrawn, diluted in the respective incubation buffer and DAO activity assayed by the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values of DAO activity refer to the enzymatic activity in the incubation media. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).

Interference of the buffers on the assay system could be excluded because in all used media similar absorbance values were recorded in the analyzed range of H_2O_2 concentrations (Figure 2.2). It is worth to mention that the loss of DAO activity in FaSSIF pH 6.8, in FaSSIF pH 6.5 or in FeSSIF pH 5.5 was reversible. In fact, DAO activity was fully recovered when the samples were diluted in PB pH 7 even after 48 h of incubation in the inhibiting simulated intestinal fluids (Figure 2.3). These data suggest that although the enzyme during its transit through the human intestine might be less active at low pH (proximal small intestine, caecum/right colon) (Nugent *et al.*, 2001), the enzyme activity can be rescued when DAO gradually reaches tracts at higher pH (distal small intestine, left colon/rectum) (Nugent *et al.*, 2001).



Figure 2.2: Effect of different simulated intestinal fluids on the detection of H_2O_2 by DCHBS-AAP-HPR method.

Solutions of H₂O₂ were prepared at the indicated final concentrations in PB pH 7 (\bullet - \bullet), SIF pH 6.8 (x-x), FaSSIF pH 6.8 (\bullet - \bullet), FaSSIF 6.5 (\blacktriangle - \bigstar), FeSSIF pH 5.5 (\blacksquare - \blacksquare). DCHBS, AAP, HRP were then added and absorbance recorded and corrected as reported in Material and Methods. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).



Figure 2.3: Recovery of DAO activity after incubation in various simulated intestinal media. DAO (final concentration of 0.6 mg solid/mL was incubated for 48h at 37 °C in FaSSIF pH 6.8, FaSSIF pH 6.5 and FeSSIF pH 5.5 (from darkest to lightest shade). Then samples aliquots were withdrawn, diluted in the respective incubation media or in PB pH 7 and DAO activities measured by the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values refer to DAO activity in the incubation media. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).

The effect of various buffers on DAO activity, assayed in terms of the oxidative reaction of putrescine, was also found by following the oxidative deamination of benzylamine as shown by the Michaelis-Menten v= f[S] curves, obtained by measuring the benzaldehyde formation rate at different benzylamine concentrations (Figure 2.4).

In each type of simulated intestinal fluids, the activity of DAO was almost constant over time when incubated at concentrations of 0.6×10^{-1} mg/mL (Figure 2.1A). However, when incubated at low concentrations as 0.6×10^{-2} or 0.6×10^{-3} mg/mL, the enzyme was inactivated in a time-dependent manner (Figure 2.1B-C) with a higher inactivation observed at lower enzyme concentration. Under these conditions, the loss of activity with the time may be related to a conformational destabilization of the enzyme due to a weakening of the protein-protein interactions. Many studies showed that protein-protein interactions are related to their concentrations. It was hypothesized that also in case of DAO, already dimerized, higher concentrations facilitate the maintaining of adequate conformational structure improving the activity in various media (Marianayagam *et al.*, 2004).



Figure 2.4: Michaelis-Menten kinetics for the oxidation of benzylamine by DAO in different simulated intestinal media.

DAO (0.18 mg solid/mL final concentration) was added to PB pH 7 (\bullet - \bullet), SIF pH 6.8 (x-x), FAS SIF pH 6.8 (\bullet - \bullet), FAS SIF 6.5 (\blacktriangle - \bigstar), FES SIF pH 5.5 (\blacksquare - \blacksquare) at 25 °C in the presence of benzylamine and the formation of benzaldehyde measured. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).

To better understand the effect of protein concentration on the time-dependent loss of DAO activity, the stability of the enzyme (0.6×10^{-3} mg/mL) was also analyzed when incubated in PB pH 7 in presence of a reference protein such as BSA. While the deactivation in time was relatively fast for DAO in the absence of an added protein, its activity did not decrease in time in the presence of BSA at concentration of 0.5 nM and higher (Figure 2.5). DAO activity almost doubled, with respect to the initial value, after 2 h of incubation with BSA concentrations higher than 0.5 μ M. The protective effect afforded by high concentrations of DAO itself or by another protein may be an important factor for possible association of DAO with bioactive agents, including catalase, superoxide dismutase or probiotics, in formulations for oral administration as food supplements in monolithic tablets. In particular, catalase was proposed to be added to DAO formulations (Mondovi *et al.*, 2013; Mateescu *et al.*, 2017) also to remove

 H_2O_2 (a pro-oxidant able to cause tissue and cell toxicity) generated by DAO as one of the reaction products during the oxidase deaminations of its substrates, such as putrescine, histamine, cadaverine. In fact, probiotics, frequently administered as food integrators, are major sources of histamine; moreover, it seems that Lathyrus sativus preparations may contain superoxide dismutase which also liberates H_2O_2 . For these reasons the association of DAO and catalase to formulations of probiotics might be beneficial.



Control BSA 0.5 nm BSA 5 nM BSA 50 nM BSA 500 nM BSA 5000 nM

Figure 2.5: Effect of BSA on DAO stability.

DAO (final concentrations of 0.6×10^{-3} mg solid/mL) was incubated at 37 °C in PB pH 7 in the absence (Control) or in the presence of 0.5, 5, 50, 500, 5000 nM BSA (from darkest to lightest shade). At the indicated times, aliquots were withdrawn and DAO activity assayed by the DCHBS-AAP-HRP method. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).

For a better knowledge of the fate of orally administered DAO, we have also investigated the effect of endogenous components of the intestinal fluids (i.e. CA, pancreatic bicarbonate or enzymes) as well as of some food ingredients (i.e. lipids, alcohol).

Bile acids are important components of the gallbladder secretion with a key role during the intestinal digestion of lipids, as emulsifiers. The effects on DAO activity of CA or DCA, two major bile acids differing each other by minor differences in polarity, were investigated. It was found that both acids at 3 mM did not impact the activity of 0.6×10^{-1} mg/mL DAO incubated in FaSSIF pH 6.5 for 48 h but they protected DAO incubated at lower concentrations (0.6×10^{-3} mg/mL and 0.6×10^{-2} mg/mL) from the time-dependent loss of the enzymatic activity (Figure. 2.6).





the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values of DAO activity refer to the enzymatic activity in the incubation media. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).

DCA afforded moderately higher protection than CA. Similar protection was found by the combined treatment with CA and DCA, each at a concentration of 3 mM (data not shown). The bile acids also protected DAO when the enzyme was incubated in SIF pH 6.8 and in FaSSIF pH 6.8 (data not shown). The protective effect of CA on DAO activity was concentration-dependent (Figure. 2.7), similarly to the effect of DCA (data not shown).



Figure 2.7: Concentration-dependent effect of CA on DAO activity. DAO (final concentration of 0.6x10-3 mg solid/mL) was incubated at 37 °C in SIF pH 6.8 without (Control) or with 0.03, 0.30, 0.50, 1.00 mM CA (from darkest to lightest shade). At the indicated times, aliquots were withdrawn and DAO activity assayed by the AAP-DCHBS-HRP method. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).

Orally administered bioactive enzymes may be destabilized by the interaction with the pancreatic fluid containing, among others, sodium bicarbonate (NaHCO₃) (released in a large quantity of about 2-3 L/day at concentration between 140-150 mM) (Ishiguro *et al.*, 2012), hydrolytic enzymes and proteases (trypsin, chymotrypsin). It was then of interest to follow the effect of NaHCO₃, trypsin and pancreatin on DAO activity and to investigate the role of bile acids.

Practically, the activity of DAO ($0.6x10^{-3}$ mg/mL) in PB pH 7 containing 100 mM NaHCO₃ (final pH 7.90 +/- 0.05) was markedly lower than in PB pH 7 and it was almost completely lost after 2 h of incubation at 37 °C. CA at concentrations higher. than 0.5 mM afforded an immediate protection (up to 70% at 50 mM) and it allowed, in a concentration-dependent manner, the recovery of the time dependent-loss of DAO activity from 15 to 100% (Figure 2.8).



Figure 2.8: Effect of NaHCO₃ on DAO activity.

DAO (0.6×10^{-3} mg solid/mL) was incubated at 37 °C in PB pH 7 or in PB pH 7 containing NaHCO₃ 100 mM pH 7.95 under a CO2 atmosphere without (Control) or with 0.1, 0.5, 5.0, 50 mM CA (from darkest to lightest shade). At the indicated times, aliquots were withdrawn and DAO activity assayed by DCHBS-AAP-HRP method. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).

Although CA increased the stability of DAO in presence of NaHCO₃, it was not able to protect DAO from the time-dependent inactivation by trypsin 1% or pancreatin 1% when DAO was incubated at a final concentration of 0.15 mg/mL in SIF pH 6.8 or in FaSSIF pH 6.8 buffer (Figure 2.9). It is worth to note that DAO maintained 50% of its initial activity after incubation with both trypsin or pancreatin for 5 h, the estimated interval for food to transit in the small intestine and reach the colon (Read *et al.*, 1982).

During the evaluation of the effect of pancreatic proteases on DAO activity, a pink color was noticed in samples incubated with pancreatin 1% for 24 h in SIF pH 6.8 after they were added with AAP, DCHBS, HRP, but not DAO substrate. This phenomenon was not observed when catalase (2000 U/mL) was added to the samples before the addition of AAP, DCHBS and HRP, suggesting that H₂O₂ was generated during the incubation of DAO with pancreatin (Figure 2.10). It cannot be excluded that the pancreatin solution contained some proteins whose accessible lysine residues may act as substrates of DAO. This hypothesis would be in line with previous observations that bovine serum amine oxidase is able to oxidize polylysine, lysozyme and ribonuclease A (Wang *et al.*, 1996).



Figure 2.9: Effect of CA on DAO activity in the presence of proteases.

DAO (final concentration 0.15 mg solid/mL) was incubated at 37 °C in SIF pH 6.8 alone (Control); in the presence of 3 mM CA; in the presence of 1% pancreatin; in the presence of 3 mM CA and 1% pancreatin; in the presence of 1% trypsin; in the presence of 3 mM CA and 1% trypsin (from darkest to lightest shade). At the indicated times, aliquots were withdrawn, diluted in the incubation buffer and the activity measured by the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values of DAO activity refer to the enzymatic activity in the incubation media. (Mean +/- SD, n=3 different experiments).



1% pancreatin
1% pancreatin + catalase

Figure 2.10: Production of H_2O_2 during the incubation of pancreatin with DAO. DAO (0.15 mg of solid/mL final concentration) was incubated at 37 °C in SIF pH 6.8 containing 1% pancreatin. After 24 h of the incubation samples were diluted in SIF at pH 6.8 to a final concentration of 0.6×10^{-3} mg of solid/mL, then added with AAP, DCHBS, HRP and H_2O_2 concentration measured. Samples not incubated with bovine liver catalase (dark shade); samples incubated for 15 min with bovine liver catalase (2000 units/mL) (light shade) before dilution and addition of AAP, DCHBS and HRP. Reported values refer to DAO activity in the incubation media (means +/- SD, n=3 different experiments).

Also investigated was the influence of some food ingredients, such as certain lipids and alcohol, on DAO activity. It was found that DPPC (in form of liposomes) at concentrations of 0.75 and 3 mM protected DAO (0.6x10⁻² mg/mL) from the time-dependent inactivation in FaSSIF pH 6.5. Similar effect was found when liposomes containing CA (DPPC :CA, 0.75:3 mol/mol) were used (Figure 2.11), suggesting that DAO was stabilized by a physical interaction with liposomes. However, liposomes did not protect DAO from the proteolytic effect of trypsin 1% or pancreatin 1% (data not shown).



Figure 2.11: Effect of DPPC liposomes with and without CA on DAO activity. DAO (0.6×10^{-2} mg of solid/mL) was incubated at 37 °C in FaSSIF at pH 6.5 alone (control) or with 0.75 mM DPPC liposomes, 3 mM DPPC liposomes, and DPPC/CA liposomes (0.75:3, mol/mol) (from the darkest to lightest shade). At the indicated times, aliquots were withdrawn and diluted in the respective incubation media and the DAO activity was assayed by the DCHBS–AAP–HRP method. Reported values of DAO activity refer to the enzymatic activity in the incubation media (means ±SD; n = 3 different experiments).

Alcohol is absorbed mainly in small intestine and once absorbed, it may damage various enzyme systems, including the enzymes metabolizing histamine, such as endogenous DAO; thus, histamine blood level may be increased under alcohol consumption (Zimatkin and Anichtchik, 1999) with harmful consequences for the human health. It was then of interest to evaluate the impact of ethanol on the activity of vegetal DAO. Alcohol at concentration 6 M (corresponding to 36% v/v, as found in various distilled spirits such as brandies, whiskies, gins), totally inhibited DAO activity in less than 2 h. It appeared that the effect of alcohol was concentration dependent. About 50% of activity was lost after 5h of incubation with 4 M ethanol (corresponding to 24% v/v, as found in various liquors). No DAO inhibition occurred in the presence of 3 M ethanol (18% v/v) (Figure 2.12). The Zetasizer data showed an ethanol-concentration, but not time-dependent-induced aggregation (which was fast) of DAO

by the alcohol (Figure 2.12, insert). 3 mM CA failed to protect 0.6×10^{-1} mg/mL DAO, irrespective of the alcohol concentration.

In order to evaluate the stability of DAO in a more comprehensive intestinal fluid, we also studied the catalytic activity of DAO exposed to rat EIC. As shown in Figure 2.13, DAO (0.15 mg/mL final concentration) retained its activity in the presence of EIC (25 mg/mL final concentration) in SIF pH 6.8 for at least 4 h; about 50% of its initial activity was found after 0.5 h of incubation in the presence of higher EIC concentration. (100 mg/mL final concentration) but then it was stable, maintaining the remaining 50% activity for the following 4 h.



Figure 2.12: Effect of CA on DAO activity in the presence of ethanol.

DAO ($0.6 \times 10-1$ mg of solid/mL) was incubated at 37 °C in PB at pH 7 alone (control) (\circ) or the presence of 3 M ethanol (\bullet), 4 M ethanol (\blacktriangle), 6 M ethanol (\blacksquare), 4M ethanol and 3 mM CA (\diamond), and 6 M ethanol and 3mM CA (\times). At various intervals, aliquots were withdrawn and DAO activity was measured at 25 °C by adding 3 mM benzylamine. Reported values of DAO activity refers to the enzymatic activity in the incubation media (means ± SD; n = 3 different experiments). (Inset) Aggregate size of DAO ($0.6 \times 10-1$ mg of solid/mL) incubated in PB at pH 7 at 37 °C for 0 (dark shade) and 24 h (light shade) with ethanol (mean ± SD; n = 2 different experiments).



Figure 2.13: Stability of DAO in rat EIC. DAO (0.15 mg of solid/mL) was incubated at 37 °C in SIF at pH 6.8 alone (control) (•) or with 25 mg/mL (\blacktriangle) or 100 mg/mL (\blacksquare) rat EIC. At the indicated intervals, samples were diluted in SIF at pH 6.8 and DAO activity was assayed by the DCHBS-AAP-HRP method. Reported values of DAO activity refer to the enzymatic activity in the incubation media (mean ± SD; n = 3 different experiments).

Overall, the novel data here reported indicated that DAO at concentrations as low as 0.6×10^{-3} mg/mL (corresponding to a nM range) has a good chance to be still catalytically active in the intestinal environment. In terms of vegetal DAO enzyme, the amounts suggested by this report (0.6×10^{-3} to 0.6×10^{-1} mg/mL) correspond (considering the approximate volume of intestinal lumen of 150 mL(Schiller *et al.*, 2005) to an initial total quantity of possible supplemented vegetal DAO from 0.09 to 9 mg. Even in the presence of pancreatic proteases or NaHCO₃, vegetal DAO at these concentrations may retain a good catalytic activity for the time necessary to transit through the upper intestine. The results also showed a protective role on DAO catalytic stability of CA, of lipids and of proteins at certain concentrations allowing protein-protein interactions. These data may be useful for further formulation of vegetal DAO as food supplement for prevention of food allergy and treatment of enteric dysfunction.

Acknowledgement

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. This report is a partial fullfilement of the Ph.D. project of ATN; thanks are due for the fellowships received from FRQS and from CRIPA/FRQNT-mobility.

CHAPITRE III

ARTICLE II

VEGETAL DIAMINE OXIDASE ALLEVIATES HISTAMINE-INDUCED CONTRACTION OF COLONIC MUSCLES

Armelle Tchoumi Neree^{1,3,#,} Rodolphe Soret^{2,3,#,} Lucia Marcocci⁴, Paola Pietrangeli⁴ Nicolas Pilon^{2,3}, Mircea Alexandru Mateescu^{1,3*}

 ¹ Department of Chemistry, Research Chair on Enteric Dysfunctions "Allerdys", University of Quebec at Montreal, Montreal, QC H3C 3P8, Canada.
 ² Department of Biological Sciences, Molecular Genetics of development Laboratory, University of Quebec at Montreal, Montreal, QC H2X 3Y7, Canada
 ³ Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines - Fondation Courtois (CERMO-FC), University of Quebec at Montreal, Montreal, QC H2X 3Y7, Canada
 ⁴ Department of Biochemical Sciences "A. Rossi Fanelli", Sapienza University of Rome, Rome 00185, Italy
 [#] Contributed equally.
 Cet article a été publié dans Scientific Reports 2020, 10: 21563-21576

DOI: 10.1038/s41598-020-78134-3

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Armelle Tchoumi Neree:

Expérimentation; conception des figures; rédaction de la première version du manuscrit, Contribution égale avec Mr. Rodolphe Soret

Rodolphe Soret:

Expérimentation; conception des figures; rédaction de la première version du manuscrit; Contribution égale avec Mme Armelle Tchoumi

Lucia Marcocci et Paola Pietrangeli:

Purification du matériel biologique; Correction des différentes versions du manuscrit

Nicolas Pilon:

Conception du projet; Correction du manuscrit

Mircea Alexandru Mateescu:

Apport des fonds pour le projet, Conception du projet, Correction du manuscrit

1.10 Résumé

L'excès d'histamine dans la lumière intestinale génère de nombreuses dysfonctions entériques à l'exemple de la dysmotilité intestinale (diarrhée et constipation). Les effets délétères de l'histamine peuvent être atténués avec des agents antihistaminiques ciblant les récepteurs histaminiques. Cependant, ces agents antihistaminiques entrainent de divers effets secondaires indésirables. De cette problématique nous suggérons une enzyme à cuivre administrable par voie orale, la diamine oxydase végétale (DAO, également appelée histaminase), capable de décomposer l'histamine par désamination oxydative, pour traiter l'histaminose alimentaire et les pseudo-allergies liées à l'histamine. La muqueuse intestinale de mammifères contient une DAO endogène qui présente une activité inférieure à celle d'origine végétale (vDAO). De plus, dans plusieurs conditions pathologiques incluant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le syndrome de l'intestin irritable, cette enzyme endogène (DAO intestinale) peut être perdue ou désactivée. L'administration orale de la vDAO pourrait être bénéfique pour les personnes souffrant d'histaminose. Dans le cadre de ce projet, il s'agissait d'évaluer l'action antispasmodique de la vDAO suite à la contractibilité de l'intestin induite par l'histamine. En utilisant des tests in vitro et ex vivo, nous avons constaté que la vDAO serait plus efficace que les agents antihistaminiques commerciaux utilisés pour inhiber la contraction du colon distal induite par l'histamine. Nous avons également identifié le pyridoxal 5'-phosphate (PLP, vitamine B6) comme un amplificateur de l'action antispasmodique de la vDAO. Nous avons aussi découvert que la vDAO administrée par lavement rectal pouvait être retenue in vivo sur les muqueuses intestinales et rester active. Ces observations constituent une avancée dans le traitement des histaminoses et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Mots clés : Diamine oxydase, dysmotilité, contraction du muscle lisse intestinal, agents antihistaminiques

1.11 Abstract

Excess of histamine in gut lumen generates a pronounced gastrointestinal discomfort, which may include diarrhea and peristalsis dysfunctions. Deleterious effects of histamine can be alleviated with antihistamine drugs targeting histamine receptors. However, many antihistamine agents come with various undesirable side effects. Vegetal diamine oxidase (vDAO) might be a relevant alternative owing to its histaminase activity. Mammalian intestinal mucosa contains an endogenous DAO, yet possessing lower activity compared to that of vDAO preparation. Moreover, in several pathological conditions such as inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome, this endogenous DAO enzyme can be lost or inactivated. Here, we tested the therapeutic potential of vDAO by focusing on the well-known effect of histamine on gut motility. Using *in vitro* and *ex vivo* assays, we found that vDAO is more potent than commercial anti-histamine drugs at inhibiting histamine-induced contraction of murine distal colon muscles. We also identified pyridoxal 5'-phosphate (the biologically active form of vitamin B6) as an effective enhancer of vDAO antispasmodic activity. Furthermore, we discovered that rectally administered vDAO can be retained on gut mucosa and remain active. These observations make administration of vDAO in the gut lumen a valid alternative treatment for histamineinduced intestinal dysfunctions.

Key words : Antihistamine drugs, diamine oxidase, dysmotility, smooth muscle contraction

Abbreviations : 4-aminoantipyrine, AAP; desloratadine, deslo; diamine oxidase, DAO; 3,5-dichloro-2-hydroxybenzoic acid, DCHBS; histamine, Hist; histamine receptor, HR; histidine decarboxylase, HDC; homovanillic acid, HVA; horse radish peroxidase, HRP; inflammatory bowel diseases, IBD; intestinal diamine oxidase, iDAO; pig kidney diamine oxidase, pkDAO; pyridoxal 5'-phosphate, PLP; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE; vegetal diamine oxidase, vDAO.

1.12 Introduction

Histamine is a friend and foe biogenic amine widely distributed and involved in major biological processes (e.g., neurotransmission, activity of smooth muscles and immune responses) through the activation of one or more of the four specific histamine receptors (Jutel *et al.*, 2001; Breunig *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 2014). Histamine of endogenous or exogenous (food) origin may trigger drastic allergic phenomena. It can act as vasodilator/hypotensive agent (Lockwood *et al.*, 2005), may dangerously increase vascular permeability (Egawa *et al.*, 2013; Ashina *et al.*, 2015), induce cardiorenal damages and arrhythmia (He *et al.*, 2012; Noguchi *et al.*, 2020) and trigger death by anaphylaxis (Makabe-Kobayashi *et al.*, 2002).

Histamine, like other biogenic amines, is present at high level in fermented foods (cheese, sauerkraut, sausages), scromboid fish products (sardines, anchovies) and vegetables such as spinach and tomato (Bodmer *et al.*, 1999; Colombo *et al.*, 2018; Madejska *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2018). Food histamine is not an allergen per se but, when present at high concentrations, it is the causative agent of food histaminosis (Sattler *et al.*, 1988; Amon *et al.*, 1999; Reese, 2018), related pseudo-allergies (Götz, 1996; Maintz and Novak, 2007) and inflammatory conditions (Kawakami *et al.*, 2019). The second main exogenous source of histamine is represented by histamine-producing enterobacteria contained in the commensal microbiota (Barcik *et al.*, 2016; Pugin *et al.*, 2017).

The four histamine receptors (H1R-H4R) are present on the surface of various immune cells (e.g., thrombocytes, neutrophils, eosinophils, mast cells, macrophages, lymphocytes T and B) as well as on endothelial, epithelial and muscular cells. In the bowel, histamine signaling is notably involved in the recruitment of immune cells (O'Mahony *et al.*, 2011; Cricco *et al.*, 2012) and stimulation of smooth muscle contractility (Fargeas *et al.*, 1989; Murch *et al.*, 2006; Tidmarsh *et al.*, 1932), the latter

being mediated at least in part by induction of calcium release from the endoplasmic reticulum into the cytosol (Sun *et al.*, 2016).

In situ concentration of histamine is controlled by the activity of catabolic enzymes such as histamine-N-methyl transferase and some copper/topaquinone-containing amine oxidases (Cu-AOs) (Kuefner *et al.*, 2004). The Cu-AOs, which are present in epithelial cells of various organs (e.g. intestine, kidney and placenta) are able to catalyze the oxidative deamination of the amino group of endogenous biogenic amines (e.g., putrescine, cadaverine, spermidine, spermine and histamine) to the corresponding aldehyde, consuming oxygen with the concomitant release of stoichiometric amounts of ammonia and hydrogen peroxide. In particular, histamine is metabolized (Figure 3.1).

Histamine +
$$O_2$$
 + 2H₂O $\xrightarrow{\text{Histaminase (DAO)}}$ $\xrightarrow{\text{Imidazole}}$ acetaldehyde + H₂O₂ + NH₃

Figure 3.1: Oxidative deamination of histamine by copper-containing amine oxidases.

In gut lumen, histamine is mainly catabolized by intestinal diamine oxidase (iDAO). However, iDAO levels are often decreased by certain drugs, alcohol intake and intestinal dysfunctions (e.g., inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome), with the result that amounts of histamine largely exceed the capacity of iDAO to decompose it (Neree *et al.*, 2018; Maintz *et al.*, 2007).

Excess of histamine in gut lumen may trigger diarrhea, abdominal pain or constipation by increasing neurosecretory functions and muscle contractility (Barbara *et al.*, 2004; Schnedl *et al.*, 2019). Antihistamine agents targeting histamine receptors may help to alleviate histamine-induced enteric dysfunctions. Yet, such histamine receptor antagonists may also cause side effects such as rash, dry mouth, urinary retention, drowsiness and delirium (Mann *et al.*, 2000; Springuel *et al.*, 2002). As alternative to these synthetic antihistamine agents, we and others have previously proposed to treat histamine-related dysfunctions with vegetal diamine oxidase (vDAO) extracted from white or green pea (Masini *et al.*, 2007; Masini *et al.*, 2004; Masini *et al.*, 2002 Mondovi *et al.*, 2013). DAO of vegetal origin is believed to have a better acceptability and to be safer in terms of secondary effects, while exhibiting higher specific activity than commercially available DAO of animal origin (i.e., pig kidney DAO; pkDAO) (Comas-Basté *et al.*, 2019).

Using colon muscle contractility as proxy, the main objective of the current study was to validate the idea of using vDAO purified from Lathyrus sativus as therapeutic agent against gastrointestinal histamine excess. Based on prior reports showing an activating physical association between pkDAO and the vitamin B6 derivative pyridoxal 5'-phosphate (PLP) (Mondovi *et al.*, 1967; Buffoni *et al.*, 2003), we also investigated the potential role of PLP as an enhancer of vDAO effect. In addition, we explored the possibility of rectal administration of vDAO by enema.

1.13 Material and Methods

1.13.1 Materials

Aminoantipyrine (AAP), ammonia assay kit, bovine serum albumin (BSA), broad range SDS-PAGE molecular weight standards, concanavalin-A coupled with fluorophore fluorescein isothiocyanate (Con-A-FITC), desloratadine, 3,5-dichloro-2hydroxybenzoic acid (DCHBS), histamine, hydrogen peroxide (H₂O₂), homovanillic acid (HVA), paraformaldehyde, horseradish peroxidase (HRP) type II, HRP type X, pig kidney diamine oxidase (pkDAO), protease inhibitor cocktail, putrescine, pyridoxal 5'-phosphate (PLP), semicarbazide and N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Bradford reagent, acrylamide/bis-acrylamide solution (29:1) and Precision plus Protein Kaleidoscope Standards were from Bio-Rad Laboratory (Mississauga, Ontario, Canada). All current chemicals were Reagent Grade and were used without further purification.

1.13.2 Purification of vegetal diamine oxidase

The vDAO enzyme was prepared from *Lathyrus sativus* seedlings as per our prior work (Blemur *et al.*, 2016), by homogenizing *Lathyrus sativus* seedlings in 50 mM phosphate buffer (pH 5.5) containing 200 mM NaCl. Purified vDAO solutions were lyophilized and characterized as previously reported (Jumarie *et al.*, 2017). vDAO samples containing 0.64 ± 0.095 mg protein/mg solid (19.0 ± 7.92 U DAO/mg solid) were used for further experiments.

1.13.3 Chemical deactivation of vDAO

A 5 mg solid/mL vDAO solution was incubated with 10 mM semicarbazide in Krebs– Henseleit buffer (KH), pH 7 at 37 °C for 6 h. Then, the solution was dialysed overnight in 4L of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4 and stored frozen until experiments.

1.13.4 Histamine oxidative decomposition by vDAO

Histamine (50 μ M) was incubated at 37 °C in KH buffer in presence of various concentrations of vDAO. Control samples contained vDAO alone. At various intervals, 40 μ L aliquots were withdrawn, added to 2 mL HCl 0.1 M and treated with ophthaldialdehyde under the conditions previously reported (Jumarie *et al.*, 2017). For each sample the fluorescence was read at $\lambda_{em} = 450$ nm upon $\lambda_{ex} = 360$ nm on a PerkinElmer LS50B spectrometer and the histamine concentration was evaluated by referring to an established standard curve after subtraction of the fluorescence related to the control containing vDAO alone at the corresponding concentration.

1.13.5 Animal housing and treatments

Experiments on mice were conducted following Canadian Council of Animal Care (CCAC) guidelines for the care and manipulation of animals used in medical research, with approval from the Institutional Animal Protection Committee [Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) reference number #650]. Animals

used in this study were FVB/N female mice of 3–4 months of age provided by Charles River (Quebec, Canada). These mice were housed at UQAM's animal facility under a 12 h/12 h (light/dark) cycle and they were not starved before euthanasia (ad libitum access to water and standard chow pellets). Euthanasia was performed via CO₂ inhalation, following anesthesia with isoflurane. Bowel tissues were then dissected for different experiments as described below.

1.13.6 Preparation of intestine homogenates

Intestine from FVB/N mice were split in segments corresponding to duodenum, jejunum, ileum, caecum, proximal colon, mid colon and distal colon. Each fraction was homogenized in 10 volumes of cold Krebs–Henseleit buffer (KH) containing (in mM): 117 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25.0 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, and 11.0 glucose at pH 7, supplemented with 1% protease inhibitor cocktail with an ultrasonic liquid processor (Sonics vibra-cell, Sonics & Materials inc., Newtown, CT, USA) for 5 min (pulses of 15 s every 5 s) at 30 amplitude. The samples were dialysed at 4 °C in PBS 50 mM, pH 7.4, overnight and then centrifuged at 1000 g for 15 min. The supernatants were collected and store on ice until analysis of iDAO activity by fluorimetric assay. The protein concentrations were determined by Bradford method (Bradford *et al.*, 1976) with bovine serum albumin as standard.

1.13.7 Assay of DAO activity

a) Fluorimetric assay in terms of H_2O_2 generation. DAO catalytic activity was assayed spectrofluorimetrically by evaluating the generation of H_2O_2 upon the oxidative deamination of putrescine as previously reported (Keston and Brandt, 1965) with slight modifications. Briefly, samples at a final concentration of 0.015 mg protein/mL of intestinal homogenates, pkDAO or vDAO were added to KH buffer (final volume 150 μ L) containing 8.37 mM HVA, 1 U/mg protein of HRP type X, 1 mM putrescine with or without 1 mM semicarbazide (for inhibition tests of copper–amine oxidases with topaquinone in the active site) and incubated at 37 °C for 30 min. A volume of 2.5 mL of NaOH 0.1 M was then added and the developed reaction was measured at 25 °C in a PerkinElmer LS45 fluorimeter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), using 315 nm (excitation) and 425 nm (emission) wavelengths. Samples incubated without the putrescine substrate were considered as blank. For each sample, the fluorescence value of the blank was subtracted from the measured value prior to report to a standard curve prepared from commercial H₂O₂. One enzyme unit was the amount of enzyme producing 1 μ mole H₂O₂/min.

b) Spectrophotometric assay in term of H_2O_2 generation. Activity of vDAO in presence of PLP or not was also evaluated at 340 nm in terms of rate of NH₃ formation during the oxidation of 3 mM putrescine in KH buffer at 37 °C, using an NH₃ assay kit as per our prior work (Calinescu *et al.*, 2012). One enzyme unit was the amount of enzyme producing 1 µmole NH₃/min.

c) Zymography assay. The zymographic assay of vDAO activity was performed as previously reported (Le *et al.*, 2018) with slight modifications. vDAO samples (1 mg protein/mL) with or without PLP (at various concentrations) were diluted 1:1 with non-reducing SDS loading buffer containing 0.085 mM Tris–HCl at pH 6.8, 10% glycerol and 2% SDS. An amount of 5 µg of vDAO protein was loaded on a 10% SDS-PAGE resolving gel prepared from acrylamide/bisacrylamide solution containing entrapped HRP type II at a final concentration of 10 U/mL. Samples were run at 120 V for 1.5 h. The activity of vDAO was detected by treating the gel with a preheated (5 min at 37 °C) solution containing 30 mM putrescine, 1.25 mM AAP and 1.25 mM DCHBS for 30 min at 25 °C. The intensities of the active vDAO bands were quantified using the ImageJ software and normalized by subtracting the background signal from the gel (band-free area). To reveal the quantity of loaded protein, the zymography gel was destained by incubation with a methanol solution 50% v/v for 5 min and stained again with a Coomassie blue solution containing (40:10:50, v/v/v) methanol–acetic acid–water and 0.5% Coomassie Brilliant Blue G-250.

1.13.8 *Ex vivo* effect of DAO and other agents on muscle contractility activated by histamine

Segments of mouse distal colon (2 cm from the anus) were cleaned of their luminal contents with oxygenated KH buffer (95% O2 and 5% CO2), and attached in the longitudinal direction in an organ bath (Harvard apparatus) filled with KH buffer at 37 °C. The isolated colon fragment was initially stretched with a preload of 1-2 g of tension. After 1 h of equilibration, the investigated agents (alone or in combination): histamine (10, 50 and 100 μ M), desloratadine (10, 20 and 40 μ M), PLP (1, 10, 50 and 100 μ M), vDAO or pkDAO (0.625, 1.25, 2.5, and 5 mg solid/mL), H₂O₂ (0.1, 0.5, 1, 5, 10, and 1000 μ M) and/or L-NAME (0.5 μ M) were added to the organ bath and contractibility was measured up to 5 times. The contractile response of longitudinal muscle was continuously recorded with a myograph (model F-60, Narco-Biosystems, Houston, TX, U.S.), coupled to a Windows 7 computer equipped with the BIOPAC student Lab 4.0.2 (BIOPAC Systems Inc., Lorraine, QC, Canada). Contractile strength in g/s was calculated as the difference from baseline of the area under the curve (AUC), and data are expressed in ΔAUC (corresponding to the difference between the AUC measured 2 min after addition of tested bioactive agents minus the AUC measured 2 min before the treatment).

1.13.9 Investigation of pyridoxal-5-phosphate (PLP) interaction with histamine

To better understand the decrease of contractility, the behaviour of PLP (10–200 μ M) in presence of histamine (50 μ M or 25 mM final concentration) in KH buffer (pH 7 at 25 °C) was followed *in vitro* by UV–VIS spectrophotometry from 220 to 600 nm. Solutions of 50 μ M histamine (final concentration), with various concentrations of PLP up to 100 μ M with and without vDAO (1.25 mg/mL) were also prepared in the same buffer and used in *ex vivo* colon contractility assays as described above.

1.13.10In vivo analysis of rectally administered vDAO

vDAO was administered to anesthetized mice, using colonic enemas. To this end, the head of a 20-gauge cannula (Fine Science Tools, Vancouver, Canada) was introduced in the mouse rectum with vaseline and a volume of 100 µL vDAO was administered. This volume was determined in preliminary experiments in 1-month-old mice (n=3)with methylene blue (10% diluted in PBS, pH 7) enemas. It was found that 100 μ L was sufficient to fill the distal colon. Consequently, 100 µL of vDAO (1.25 mg solid/mL) or PBS (control) were injected by enema and, after 15 min, animals were euthanized by CO₂ inhalation. For vDAO activity assays, the distal colon was then dissected, repeatedly washed in PBS (cycles of 3, 6 and 9 washes), homogenized and assayed for enzymatic activity as described above. For vDAO localization assays, the distal colon was dissected, rinsed with PBS and fixed in paraformaldehyde (4% in PBS, pH 7) for 24 h. The tissue was then opened longitudinally and mucosa side was incubated for 30 min with 35 µg/mL Con-A-FITC (Concanavalin-A coupled with fluorescein isothiocyanate). Stained tissues were finally washed in PBS and mounted on microscope slides for imaging with a Nikon Eclipse Ti inverted fluorescence microscope (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, U.S.A.). Image acquisition was performed with a Scion Model CFW 1612C camera (Scion corporation, Frederick, MD, U.S.A.), using the Scion Image software.

1.13.11Statistics

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

1.14 Results

1.14.1 Activity of endogenous iDAO is lower in the colon

The mammalian intestine is known to contain endogenous iDAO (Biegański *et al.*, 1983; Mizuguchi *et al.*, 1994), but with unclear distribution along the gastrointestinal tract. With the idea of selecting a region with low iDAO activity that we could use for *ex vivo* contractility assays, we first evaluated iDAO activity in different bowel segments of adult female mice. To this end, ability of iDAO to generate H_2O_2 upon oxidative deamination of putrescine was determined in extracts of duodenum, jejunum, ileum, cecum, proximal colon, mid colon and distal colon. This analysis revealed unequal distribution of iDAO activity along the gastrointestinal tract, with lowest activity in cecum and colon. Particularly, the distal colon displayed approximatively 4–10 times less of iDAO activity compared to the duodenum, ileum and jejunum, respectively (Figure 3.2A).

Importantly, incubation with semicarbazide (a Cu-AO-specific inhibitor that covalently binds topaquinone in the active site) (Buffoni and Ignesti, 2003) markedly reduced the enzymatic activity by about 60–95% (Figure 3.2A), thereby confirming that the measured intestinal enzyme activity was due to a Cu-AO and not to another putrescine degrading enzyme. Using the same approach, we also evaluated the specific activity of partially purified vDAO and found it to be approximatively 30 times higher than that of commercial pkDAO (Figure 3.2B). Based on these results we reasoned that the distal colon would best fit our needs. Moreover, these analyses confirmed the potency of vDAO over commercial pkDAO and iDAO.

1.14.2 vDAO is a potent inhibitor of histamine-induced colon muscle contractions *ex vivo*

To evaluate vDAO's impact on histamine-induced smooth muscle contractions, strips of distal colon muscles were prepared and attached to a force transducer in an organ bath. Using this *ex vivo* system, we first performed a dose–response assay with histamine only (at concentrations between 10 and 100 μ M) which revealed that a concentration of 50 μ M was sufficient to generate a robust spasmodic response (Figure 3.3A-B). Using this concentration of histamine to induce muscle contractions, we then evaluated the effect of increasing concentrations of vDAO. At a low concentration of vDAO (0.625 mg solid/mL, about 2.5 μ M), no significant response was observed in comparison to histamine only. But, at higher concentrations of 1.25, 2.5 and 5 mg solid/mL (about 5, 10 and 20 μ M) vDAO, we observed a significant decrease of muscle contractions that appeared to reach a plateau at highest doses (Figure 3.3C-D).



Figure 3.2: Assay of DAO activity from various sources by spectrofluorimetry. Specific activity expressed in units (U)/mg protein of DAO from (A) homogenates of various intestinal segments of mice and from (B) vegetal (Lathyrus sativus) and animal (pig kidney) sources in the absence (black) or presence (white) of semicarbazide (mean \pm SD; n = 3; ** P < 0.01, *** P < 0.001; one-way ANOVA multiple comparisons).

These results are in line with the kinetics of histamine elimination by vDAO seen *in vitro*, where oxidative deamination of histamine was similarly quicker with 1.25 and 2.5 mg solid/mL of vDAO than with 0.625 mg solid/mL of vDAO (Figure 3.3E). The apparent lack of *ex vivo* effect at lowest vDAO concentration is thus likely due to a limited capacity of vDAO to eliminate histamine before this small molecule (111 Da) can freely penetrate the muscles and presumably become somehow protected from the action of the much larger vDAO enzyme homodimer (150 000 Da, Padiglia *et al.*, 1991). It is also noteworthy that semicarbazide-inactivated vDAO had no impact on histamine-induced muscle contractions (Figure 3.3F), ruling out the possibility that our vDAO preparation might have contained another substance with anti-histamine activity. Moreover, the muscle relaxing activity of vDAO seems to be specific for histamine-induced contractions as vDAO had no impact on L-NAME-provoked (Soret *et al.*, 2020) muscle contractions (Figure 3.4).

Using the same experimental system, we then decided to compare vDAO's impact to that of the well-known H1 receptor antagonist desloratadine. Starting with a concentration of 10 μ M, desloratadine inhibited histamine-induced contractility in a concentration-dependent manner, with an almost complete inhibition at the highest tested concentration of 40 μ M desloratadine (Figure 3. 5A-B). Yet, when compared to the inhibitory effect of vDAO, desloratadine appeared about four times less efficient based on the fact that results with 1.25 and 2.5 mg solid/mL of vDAO (about 5 and 10 μ M, respectively) (Figure 3.3D) were similar to results with 20 and 40 μ M of desloratadine. Commercially available pkDAO had no effect under these experimental conditions, even when used at concentrations as high as 5 mg solid/mL (Figure 3.5C-D). Collectively, these data suggest that vDAO is especially efficient at inhibiting histamine-induced colonic muscle contractions.


Figure 3.3: Time course of histamine-triggered distal colon muscle contraction in absence or in presence of vDAO *ex vivo*.

Upper panels are representative contractility curves induced by 50 μ M histamine (A) alone or (C) in presence of vDAO 1.25 mg/mL. Middle panels are quantitative analyses of contractility (expressed in g/s) corresponding to the difference in the area under the curve (Δ AUC) after and before addition of various concentrations of (B) histamine or (D) vDAO and 50 μ M histamine. Lower panels are control experiments showing that oxidative deamination of histamine is slower at lowest concentration of vDAO (E), and that the vDAO preparation has no impact on histamine-induced contractions when inactivated with the specific Cu-AO inhibitor (topaquinone-binding) semicarbazide (F) (n = 3–4; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; one-way ANOVA multiple comparisons).



Figure 3.4: vDAO has no impact on L-NAME-provoked colon muscle contractions *ex vivo*. Quantitative analyses of contractility (expressed in g/s) corresponding to the difference in the area under the curve (ΔAUC) after and before addition of L-NAME alone or in combination to vDAO.

1.14.3 H₂O₂ released during vDAO-mediated histamine deamination has no effect on muscle contractions

One concern for using vDAO as antispasmodic agent is that accumulation of the H₂O₂ by-product could eventually lead smooth muscles to contract again. To evaluate this possibility, the amount of H₂O₂ released by vDAO during *ex vivo* inhibition of histamine-induced contraction was measured fluorimetrically *in vitro* using a standard curve of H₂O₂ (Figure 3.4A, inset). We found that the oxidative deamination of 50 μ M histamine at the highest tested concentration of 5 mg solid/mL vDAO produced 3.3 μ M H₂O₂ (Figure 3.4A). At this concentration, and even higher (up to 10 μ M), H₂O₂ had no effect on smooth muscle contractions. A major increase in muscle contractions was detected only when we increased H₂O₂ concentration to 1 mM (about 300 times higher than the concentration produced by 5 mg solid/ml vDAO) (Figure 3.6B).



Figure 3.5: Effect of commercial antihistamine agents on histamine-triggered distal colon muscle contraction.

The effect of desloratadine (Deslo) antihistamine drug on the *ex vivo* histamine-induced contractile response (Hist 50 μ M, left side) and the related quantitative analysis (right side) in the presence of (A, B) desloratadine or of (C, D) pig kidney (pk) DAO at various concentrations (n = 3; ** P < 0.01, *** P < 0.001; one-way ANOVA multiple comparisons).



Figure 3.6: Effect of the H₂O₂ by-product of vDAO reaction on distal colon muscle contraction *ex vivo*.

(A) Determination of H_2O_2 released *in vitro* by 5 mg solid/mL vDAO in presence of 50 μ M histamine, using a H_2O_2 standard curve (inset in A). (B) *Ex vivo* effects of varying concentrations of H_2O_2 on muscle contraction (n = 3; *** P < 0.001; one-way ANOVA multiple comparisons).

1.14.4 vDAO effect can be further increased by PLP

Still using the same *ex vivo* system, we next tested the potential of PLP as vDAO modulator. PLP alone did not have an overt effect on basal (Figure 3.7A, B) or on histamine-induced (Figure 3.7C, D) contraction, regardless of PLP concentration used (up to 100 μ M). We observed a small relatively uniform decrease in histamine-induced contraction with 1 to 50 μ M of PLP (Figure 3.7D) yet without reaching statistical significance, most likely because of small sample size. However, adding 10 μ M of PLP to 1.25 mg/mL of vDAO was sufficient to elicit robust, statistically significant inhibition of histamine-induced contractile response in comparison to vDAO alone (Figure 3.7E, F).

To more formally exclude the possibility that PLP might exert its effect by complexing histamine (Kierska *et al.*, 1975), we compared the UV/VIS spectra of PLP \pm histamine under the same experimental conditions used for *ex vivo* contractility assays (2 min of incubation at 37 °C in KH buffer in the organ bath). At the same concentrations used in these assays (and slightly higher; up to 200 μ M), we found no differences between

the PLP spectral pattern in the presence (Figure 3.8A) or in absence (Figure 3.8B) of 50 μ M histamine. Robust PLP-histamine complexation appears to only occur in the millimolar range (Kierska *et al.*, 1975), as we observed when we increased histamine concentration at 25 mM (about 500 times the concentration used in *ex vivo* assays). In these circumstances, we found that the peak of maximal absorbency for PLP (200 μ M) is shifted from 390 to 410 nm (Figure 3.8C).

To further validate the enhancer role of PLP on vDAO, we measured vDAO activity in presence and absence of PLP using different *in vitro* approaches. Zymographic assays of 5 µg vDAO protein/well with increasing concentration of PLP ranging from 0.1 to 5 mM/well and staining with putrescine, DCHBS and AAP revealed an increase of vDAO activity as a function of PLP concentration. This increase appeared close to linear in presence of PLP concentrations ranging from 0.5 mM to 4 mM (Figure 3.9A, B and Figure 3.10). Coomassie blue staining confirmed that equal amounts of vDAO were loaded on gel (Figure 3.9C and Figure 3.10). Similar results were obtained when DAO activity was measured by evaluating the rate of ammonia production from putrescine oxidation (Figure 3.9D). All these data suggest that the PLP-mediated increase of vDAO antispasmodic activity detected in our *ex vivo* contractility assays might be due to an interaction between PLP and vDAO rather than between PLP and histamine.

1.14.5 Rectally-administered vDAO binds and remains active on colon mucosa

With the idea of eventually using vDAO in the gut lumen to alleviate histamineinduced intestinal damage in humans, we evaluated whether vDAO can bind and remain active for a certain period of time on the intestinal mucosa *in vivo*. To this end, 100 μ L of 1.25 mg solid/mL vDAO (in PBS, pH 7.0) was administered to adult female mice via rectal enemas. This enema volume was first established as being sufficient to fill the distal colon with methylene blue enema (Figure 3.11).



Figure 3.7: PLP enhances the antispasmodic effect of vDAO *ex vivo*. Representative contractility curves (left panels) and corresponding quantitative analyses (right panels) for (A, B) PLP alone, or in presence of (C, D) Histamine and of (E, F) Histamine and vDAO (n=3; ** P < 0.01, *** P < 0.001; one-way ANOVA multiple comparisons).



Figure 3.8: UV-Vis absorption spectra of PLP with and without histamine. Absorption spectra of (A) 50 μ M histamine (Hist) and PLP at concentrations used in *ex vivo* assays, (B) histamine-free PLP (as negative control) and (C) higher histamine (25 mM) and PLP (200 μ M) concentrations (as positive control).

Mice that received vDAO or PBS only (control) enemas were sacrificed 15 min after enema administration and their distal colon (2 cm from the rectum) was analyzed for vDAO activity and mucosal retention, after extensive washing. Based on amounts of H_2O_2 released upon exposure to 50 μ M histamine, the rectally-administered vDAO remained active for at least 45 min after injection (Figure 3.12A). Binding of vDAO to the colon mucosa was confirmed by fluorescent staining of distal colon samples with FITC-conjugated concanavalin A, which is known to bind the carbohydrate moiety of Cu-AOs (Ishizaki and Yasunobu, 1980) (Figure 3.12B). Of note, retention of active vDAO on the colon mucosa also appeared stable, remaining the same regardless of the number of washing steps.



Figure 3.9: *In vitro* analysis of vDAO activity as a function of PLP concentration. (A) Representative zymography gel and (B) corresponding densitometry analysis of vDAO activity at different concentrations of PLP. (C) Coomassie staining of zymography gel indicating equal loading and appropriate molecular weight of vDAO monomer (75 kDa) according to Broad range SDS-PAGE molecular weight standards (std). (D) Ammonia concentration released during the vDAO activity in presence of various concentrations of PLP (values are mean \pm SD; n = 3).



Figure 3.10: Uncropped gels of figure 6.9A-B



Methylene blue

Figure 3.11: Evaluation of enema volume required to fill the distal colon. A volume of 100 μ L of methylene blue was rectally-administered *in vivo* to FVB female mice, which were then sacrificed to evaluate methylene blue distribution in the distal colon (representative of n=3 evaluations).

Compared to unwashed freshly-dissected tissues for which measured vDAO activity was set at 100%, vDAO activity remained constant at 80% after 3, 6 and 9 successive washes (Figure 3.12C). Altogether, these observations instill confidence for considering vDAO as therapeutic agent in the gut lumen.

1.15 Discussion

Excess of histamine in the bowel can generate various gastrointestinal dysfunctions including motility problems. The current study strengthens the idea of using vDAO purified from *Lathyrus sativus* as therapeutic agent against such histamine-induced problems, and most especially in combination with the PLP enhancer. In addition, our data further suggest that the rectum could be a relevant and efficient route of administration.

Our *in vivo* and *ex vivo* data fit well with several previous studies. Our finding of unequal distribution of iDAO along the murine intestinal tract with lowest activity in the colon (Figure 3.2A) is in agreement with studies reporting low amine oxidase

activity in rat distal colon (Luk *et al.*, 1980) Sensitivity to semicarbazide (Figure 3. 2A) also confirmed that murine iDAO is a Cu-AO with topaquinone in the active site like pkDAO (Buffoni *et al.*, 1994a; Buffoni *et al.*, 1994b; McGrath *et al.*, 2009).



Figure 3.12: Retention of active vDAO on colon mucosa after rectal administration. (A) Analysis of vDAO-mediated release of H_2O_2 from colon mucosa of mice that previously received vDAO by enema. (B) Analysis of vDAO retention by staining with FITC-labeled Concanavalin A. (C) Retained vDAO remains active after repeated washes (mean \pm SD; n = 3–5; * P < 0.05, ** P < 0.01; one-way ANOVA multiple comparisons).

problems, and most especially in combination with the PLP enhancer. In addition, our data further suggest that the rectum could be a relevant and efficient route of administration.

Our *in vivo* and *ex vivo* data fit well with several previous studies. Our finding of unequal distribution of iDAO along the murine intestinal tract with lowest activity in the colon (Figure 3.2A) is in agreement with studies reporting low amine oxidase activity in rat distal colon (Luk *et al.*, 1980) Sensitivity to semicarbazide (Figure 3.2A) also confirmed that murine iDAO is a Cu-AO with topaquinone in the active site like pkDAO (Buffoni *et al.*, 1994a; Buffoni *et al.*, 1994b; McGrath *et al.*, 2009).

Based on our own *in vivo* observations and the existing literature, we thus selected the distal colon for our *ex vivo* assays of modulation of histamine-induced contractions. Histamine is well known to have a spasmodic effect on bowel smooth muscles, even at low concentration (1 μ M) (Huang *et al.*, 2011). This contractility effect is mediated, at least in part, through H1 histamine receptors expressed in bowel smooth muscles (Murthy, 2006). Therefore, although we used a relatively high concentration of histamine (50 μ M), the ability of desloratadine (an H1 antagonist) to robustly inhibit histamine-induced contraction of colon smooth muscles was nonetheless expected. What was more surprising is the discovery that vDAO has a markedly lower IC50 value as antihistamine agent (i.e., concentration required to reduce histamine response by 50%) than desloratadine (5 μ M for vDAO vs 20 μ M for desloratadine).

We were further delighted to discover that addition of PLP could potentiate the vDAO effect, both *ex vivo* and *in vitro*. We turned to PLP in part because of early studies suggesting PLP could serve as prosthetic group for pkDAO (Mondovi *et al.*, 1967; Buffoni *et al.*, 2003), although this concept was subsequently challenged following the identification of topaquinone as prosthetic group for many Cu-AOs (Klinman *et al.*, 2003). Yet, the idea to use PLP (the biologically active form of vitamin B6) together with vDAO was also motivated by several studies reporting a link between vitamin B6 levels and bowel inflammation, although the mechanism underlying this relationship

is unclear as both high and low levels of vitamin B6 were reported to have beneficial effects (Selhub *et al.*, 2013; Iwakawa *et al.*, 2019). In the end, our data strongly suggest that exogenous PLP might have a dual therapeutic effect when used in conjunction with exogenous vDAO, most likely influencing both vDAO activity and endogenous PLP-dependent metabolic enzymes relevant for bowel inflammation and/or motility (Ueland *et al.*, 2017). Indeed, while *in vitro* data clearly show that PLP can directly enhance vDAO activity in a dose-dependent manner (Figure 3.9), this gain in activity is very modest at the lowest tested PLP concentration (100 μ M) which is 10 times the concentration (10 μ M) that we used with vDAO to elicit strong inhibition of histamine-induced contraction in *ex vivo* assays (Figure 3.7E-F). This difference in magnitude, combined to the small decrease of histamine-induced contraction in presence of PLP alone (Figure 3.7C-D), strongly suggests that PLP might activate some metabolic pathways in colon smooth muscles, independently of vDAO. One relevant pathway might be the transsulfuration pathway for which the by-product of cysteine degradation H₂S is a smooth muscle relaxant (Aitken *et al.*, 2011; Dominy *et al.*, 2004),

while another one might be the degradation pathway of the pro-contractile sphingosine-1-phosphate (Pulkoski-Gross *et al.*, 2015; Al-jarallah *et al.*, 2017). We cannot also exclude the possibility that PLP might have another beneficial effect through formation of an inactive cyclic compound with histamine (Sasiak *et al.*, 1975; Saslak *et al.*, 1977). However, we note that this appears to be a relatively rare event in the micromolar range (involving only 7% of PLP at equimolar concentrations of 10 μ M) (Kierska *et al.*, 1975) and most likely the reason why it was not detected in our experimental conditions using histamine at 50 μ M and PLP at 10–200 μ M (Figure 3.8A).

The ability of the colon mucosa to retain rectally administered vDAO in an active conformation is especially meaningful. The retention of vDAO might be explained by oxidative deamination of lysine ε -amino residues on proteins from the surface of the mucosa. This hypothesis is supported by a previous study suggesting a role for serum Cu-AO in post-translational modifications of proteins (Wang *et al.*, 1996) through

recognition and oxidation of ε -amino side-chain of lysine (owing to structural similarity with lysine's degradation product and natural Cu-AO target cadaverine). Cu-AOs including vDAO are thus supposedly able to oxidise the ε -amino side-chains of lysine which, once oxidised to an aldehyde, might then bind the own ε -amino groups of Cu-AO's lysyl groups (a mechanism alike that of Schiff binding) as described for the aminohexyl (AH) chains on AH-Sepharose chromatographic material (Befani *et al.*, 1998). Importantly, retention of active vDAO on gut mucosa (Figure 3.7A–C) suggests that a single oral (Neree *et al.*, 2018; Calinescu *et al.*, 2012; Mondovi *et al.*, 2013) or rectal (this work) administration would not be eliminated through intestinal transit (24 h) and might thus be efficient for a long time until renewal of the gut mucosa every 2–5 days (Barker *et al.*, 2014; Darwich *et al.*, 2016). The results of this study thus provide a strong impetus for clinical studies in humans.

Acknowledgments

This project was supported by the NSERC (Natural Sciences and Engineering, Research Council) of Canada) MAM and NP and by Fondation Courtois (Québec, Canada). ATN was a holder of a doctoral scholarship from FRQS (Fonds de la Recherche du Québec-Santé), Québec, Canada, and of a Mobility Fellowship from CRIPA/FRQNT. The project was also supported by a join collaborative project from the Ministère des Relations Internationales et de la Francophonie (MRIF) Québec, Canada and Ministry of Foreign Affairs and International Cooperation (MAECI) of Italy.

This work is part of the fulfilment of requirements for the Ph.D Program in biochemistry of Armelle Tchoumi Neree.

Conflicts of Interest

The authors declare no competing of interests

CHAPITRE IV

ARTICLE III

VEGETAL DIAMINE OXIDASE AS MODULATOR OF HISTAMINE-INDUCED CALCIUM RELEASE IN CACO-2 CELL LINES

Armelle Tchoumi Neree^{1,2}, Catherine Jumarie³, Lucia Marcocci⁴, Paola Pietrangeli⁴, Mircea Alexandru Mateescu^{1,2}

¹ Department of Chemistry, Research Chair on Enteric Dysfunctions "Allerdys", University of Quebec at Montreal, Montreal, QC H3C 3P8, Canada.

² Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines - Fondation Courtois (CERMO-FC), University of Quebec at Montreal, Montreal, QC H2X 3Y7, Canada

³ Department of Biological Sciences, TOXEN Center, University of Quebec at Montreal, Montreal, QC H2X 3Y7, Canada

⁴.Department of Biochemical Sciences "A. Rossi Fanelli", Sapienza University of Rome, Rome 00185, Italy

Manuscrit en préparation pour soumission à la revue BBRC

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Armelle Tchoumi Neree :

Expérimentation et conception du projet;

Organisation des figures;

Rédaction de la première version du manuscrit;

Catherine Jumarie:

Conception du projet;

Correction des différentes versions du manuscrit

Lucia Marcocci et Paola Pietrangeli:

Purification de la diamine oxydase (DAO);

Correction des différentes versions du manuscrit

Mircea Alexandru Mateescu:

Conception du projet;

Correction du manuscrit;

Apport des fonds pour le projet,

1.16 Résumé

La diamine oxydase catalyse la déamination oxydative de l'histamine en imidazole acétaldéhyde avec la production concomitante du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniac en présence d'oxygène. Un taux anormalement élevé d'histamine dans la lumière intestinale est associé aux histaminoses et allergies alimentaires. De plus la reconnaissance et la liaison de l'histamine aux récepteurs histaminique H1 (majoritairement exprimés à la lumière intestinale) induit la mobilité du Ca2+ intracellulaire via la voie de signalisation de la 3,7-phosphate inositol diphosphate (PIP2). De nombreux agents antihistaminiques commerciaux à l'exemple de la desloratadine, compétissent avec l'histamine pour le récepteur H1 et permettent de réduire les effets pathologiques associés à l'histamine. Toutefois, ces agents antihistaminiques présentent de nombreux effets secondaires et dans certaines situations, peuvent conduire à l'anxiété. De ce fait, au lieu de bloquer les récepteurs histaminiques (mode d'action de la desloratadine) nous proposons dans le cadre de ce projet, l'usage de la diamine oxydase végétale (DAOv) extraite de Lathyrus sativus. Des études in vitro avec des cellules intestinales Caco-2, préalablement traitées avec du Fluo-4 AM ont été réalisées. La mobilité du Ca²⁺ intracellulaire dans des cellules Caco-2 traitées avec l'histamine, l'antagoniste H1 sélectionné ou la DAOv a été suivie par microscopie confocale. Les données obtenues confirment le rôle de l'histamine dans l'augmentation du Ca²⁺ cytosolique de façon concentration dépendante. De plus à une concentration fixe de l'histamine, les traitements avec la DAOv et la desloratadine inhiberaient la mobilité du Ca²⁺ intracellulaire induite par l'histamine. Un ratio d'efficacité molaire approximatif de 1:4 de DAO:desloratadine, pourrait être attribué afin de comparer la concentration de la DAO ayant un effet similaire à celle de la desloratadine.

Mots-clés : Agents antihistaminiques, Ca²⁺, diamine oxydase, DAO, histamine, récepteurs histaminiques

1.17 Abstract

Several vegetal and animal diamine oxidases (DAO) catalyze the oxidative deamination of histamine to imidazole acetaldehyde with concomitant production of hydrogen peroxide and ammonia with consumption of oxygen. High histamine levels in the blood are currently associated with allergic phenomena and trigger Ca²⁺ mobility via H1 receptors. Some commercial antihistamine agents as desloratadine, bind to H1 receptors and relieve the damaging effects of histamine intoxication. However, these antihistamine drugs may induce side effects as dry mouth, dizziness, nausea and some neurological disorders. This report is aimed to investigate in which extend DAO may control the Ca²⁺ mobility in comparison with desloratadine, an antihistamine drug. Instead of blocking H1 receptors, we proposed vegetal diamine oxidase (vDAO) as an enzymatic approach to decompose histamine. Considering the damaging effect of high concentration of histamine at intestinal level, this study was conducted on Caco-2 intestinal cells treated with Fluo-4 AM as Ca²⁺ tracker. It was found by confocal microscopy that the vDAO down regulated histamine-induced Ca²⁺ mobility in intestinal Caco-2 cells. This effect was stronger than that obtained with the synthetic desloratadine drug. At a fixed concentration of histamine (able to trigger calcium mobilization), DAO at a concentration three times lower than that of desloratadine was similarly effective in inhibiting the same levels of calcium mobilization. It appeared that the histamine degrading vegetal DAO, can efficiently counteract the histamineinduced calcium release mobility at concentrations lower than those of desloratadine, an antihistamine agent, which competes with histamine for H1 receptors. These observations may be relevant for treatment of histamine-related intestinal dysfunctions.

Keywords : Antihistamine agents, Ca²⁺, diamine oxidase, DAO, histamine, histamine receptors.

Abbreviations: Ca^{2+} - Calcium ion, Deslo – Desloratadine, DAO - Diamine oxidase, Hist – Histamine and H1 – histamine receptor 1.

1.18 Introduction

Histamine is a biogenic amine, endogenously generated by decarboxylation of histidine by histidine decarboxylase (EC 4.1.1.22) (Maintz and Novak, 2007). Exogenous histamine is supplied by food. This aromatic amine is a ubiquitous agent and it is involved in many biological processes including gut contractibility (Neree *et al.*, 2020; Bertaccini *et al.*, 1997), and proliferation, migration of intestinal cells (Pietrangeli *et al.*, 2019; Nan-Hyung *et al.*, 2010). It is also a proinflammatory agent (MacGlashan, 2003) and a pro-angiogenic mediator (Pietrangeli *et al.*, 2019). The effects of histamine in gut behaviour are mostly mediated by H1 histamine receptors (Farzam *et al.*, 2020), G-protein coupled receptors expressed at intestinal level in mammals (Kim *et al.*, 2011; Fabisiak *et al.*, 2017) and in colon cancer cell lines including Caco-2 cells (Lampiasi *et al.*, 2007). The Caco-2 cell line exhibits a well-differentiated brush border on apical surface and tight junctions and expresses specific intestine transporters and enzymes. Thus, this cell line is the most popular intestinal *in vitro* model that correlates well with the human gut properties *in vivo* (Meunier *et al.*, 1995; Miret *et al.*, 2004).

The concentration (level) of histamine in the intestinal lumen, is regulated by diamine oxidase (EC 1.4.3.6) released from enterocytes (Sattler *et al.*, 1990). A dysfunction and an inhibition of this enzyme are commonly related to an unbalanced histamine level and histamine-related diseases such as histamine poisoning and food allergy (Sullivan 1999; Maintz *et al.*, 2007b; Götz, 1996; Wantke *et al.*, 1994).

Intestinal diamine oxidase (iDAO) and vDAO (also called histaminase), catalyzes the oxidative deamination of primary amino group of certain diamines (putrescine, cadaverine, spermine and spermidine) and histamine to the corresponding aldehydes with production of hydrogen peroxide and ammonia (Figure 4.1).

Histamine +
$$O_2$$
 + 2H₂O
Histaminase (DAO)
 4 -acetaldehyde + H₂O₂ + NH₃

Figure 4.1: Oxidative deamination of histamine by histaminase.

The choice of vDAO in this project as antihistamine agent is related to previous works proposing an oral administration of vDAO (Calinescu *et al.*, 2012) to treat histamine-related dysfunctions alleviate histaminosis, food-allergy and inflammatory symptoms. Furthermore, it is known that vDAO exhibits a higher affinity for histamine (Pietrangeli *et al.*, 2007) and lower immunogenicity (Mondovi *et al.*, 2013) than that of animal DAO. It was of interest to evaluate the amount of vDAO to obtain a decrease of histamine level in comparison with the current used antihistamine desloratadine drug and the histamine-induced Ca²⁺ mobility was the measured parameter.

The activation of H1 receptors stimulates the Gq protein and the phopholipase C (Jones *et al.*, 2011) inducing the hydrolysis of inositol phospholipids and leading to an increase of intracellular Ca²⁺ in mammalian cells (Berridge 1987). The possibility that H1 might be target for treatment of histamine-related diseases have been largely explored (Church *et al.*, 2014). The H1 antagonist drugs including desloratadine, compete with histamine, inhibit Ca²⁺ mobility and then relief the histamine-related inflammatory effects. Desloratadine is a non-sedating H1 antagonist drug (member of the second generation H1 antihistamines) and usually used for the relief of symptoms associated to allergic rhinitis (Wilken *et al.*, 2006; Anthes *et al.*, 2002). Blocking the binding of histamine by H1 antagonists, although they are effective in the remission of histamine-induced symptoms, may produce side effects, such as, itching, dry mouth, pharyngitis, myalgia, anxiety and even depression (Boer *et al.*, 2018; Murdoch *et al.*, 2003). To restrain the intestinal histamine level and avoid the deleterious side effects of antihistamine drugs, an oral supply of vDAO would help patients to regulate the histamine balance.

The Fluo-4 AM ester used as a dye for Ca^{2+} allows to measure the cellular activities in various systems in order to understand physiological processes such as gastrointestinal motility (Perrino 2016) and immune cells activation (Lewis 2001). As Ca^{2+} is a second messenger resulting from the H1 receptors activation, Ca^{2+} -imaging techniques was selected to track on Caco-2 cells, the Ca^{2+} traffic (from endoplasmic reticulum to

cytosol) induced by histamine (agonist) and the impact of antihistamine agent desloratadine (antagonist) and of vDAO (histaminase).

The adherent Caco-2 cells differentiated for 21 days, are currently used to mimic the intestinal tissue processes. These cells have been found as good model for *in vitro* study of the role of histamine in the gut (Jumarie *et al.*, 2017; Lampiasi *et al.*, 2007; Mu *et al.*, 1994). In the present study, we demonstrate that in Caco-2 cells, histamine induced an increase in cytosolic Ca²⁺ (probably via H1 stimulation) and that Ca²⁺ mobilization is inhibited by DAO as well as by desloratadine.

1.19 Materials and Methods

1.19.1 Materials

Aminoantipyrine (AAP), 3,5-dichloro2-hydroxybenzensulfonate (DCHBS), bovine serum albumin (BSA), calcium chloride (CaCl₂), 1,4-diaminobutane dihydrochloride (putrescine), dibasic sodium phosphate salt (Na₂HPO₄) dihydrate, glutamine, 4-(2hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), horseradish peroxidase (HRP) type I, monobasic sodium phosphate salt (NaH₂PO₄) dihydrate, dihydrochloride, potassium chloride (KCl), probenecid, sodium bicarbonate (NaHCO₃) and sodium chloride (NaCl), were purchased from Sigma-Aldrich (Winston Park Dr., Oakville, Ontario, Canada). Fluo-4 acetoxymethylester (Fluo-4 AM) and pluronic acid were purchased from Thermo Fisher Scientific (Mainway, Burlington, Ontario, Canada). Dulbecco's modified Eagle essential minimum medium containing 25 mM glucose (DMEM), 100X nonessential amino acids and 10 000 U/mL penicillin-streptomycin were purchased from Hyclone (Logan, UT, USA), fœtal bovin serum was from Wisent Bioproducts (St-Bruno, Québec, Canada). Colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells line cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). All current chemicals were reagent grade and were used without further purification.

1.19.2 Vegetal diamine oxidase purification

Diamine oxidase was extracted from etiolated *Lathyrus sativus* seedlings and purified by ion exchange chromatography on a YMC-BioPro S75 resin (Blemur *et al.*, 2016). After purification, the enzyme was lyophilized at -20 °C with a mass yield of 30 to 46% and a specific activity of 10 ± 1.3 U/mg of protein. DAO activity was determined in phosphate buffer 0.1 M pH 7.2 by following at 515 nm the formation of a pink product ($\epsilon_{515 \text{ nm}}$ = 26 000 M⁻¹cm⁻¹) due to the reaction of H₂O₂ (generated from the oxidation by DAO of 3 mM putrescine) with 0.1 mM DCHBS and 0.01 mM AAP in the presence of 10 µg/mL HRP (Pietrangeli *et al.*, 2012). The protein concentration was determined using colorimetric Bradford method at 595 nm with bovine serum albumin (BSA) as standard (Bradford, 1976).

1.19.3 Determination of vDAO activity

The activity of vegetal DAO was determinated by DCHBS-AAP-HRP method (using putrescine 3 mM as a substrate) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 and also in Dulbecco's Modified Eagle Essential Medium (DMEM), pH 7.2, supplemented or not with 15% foetal bovin serum (FBS).

1.19.4 Differentiation of Caco-2 cultured cells and treatment for measurement of Ca²⁺ flow

An amount of 1×10^6 Caco-2 cells were grown on six-well plate in 2 mL of DMEM containing 25 mM glucose and supplemented with 15% inactivated (56°C for 30 min) FBS, 0.1 mM nonessential amino acids (arginine, cystine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, thréonine, tryptophan, tyrosine and valine), 50 units/µL penicillin and 50 mg/µL streptomycin. Cells were maintained in a 5% CO₂. The complete medium was changed every two days until 21 days cells to allow differentiation (Jumarie and Malo, 1991, Natoli *et al.*, 2012).

In order to monitor the intracellular Ca^{2+} mobilization from endoplasmic reticulum, the 21-days old Caco-2 cells were incubated in absence of calcium for 1h at 37 °C with 1µM of the Fluo-4 AM indicator (previously dissolved at indicated concentration in the HBSS-HEPES saline buffer, pH 7.2, containing 10 mM HEPES, 1µM pluronic acid F127 (a nonionic detergent for solubilization of the hydrophobic Fluo-4 AM ester) and 2.5 mM probenecid (solubilized in 0.5 M NaOH, able to block organic anionic transporters and thus to prevent the exit of the internalized probe from the cell) in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) no containing calcium. The cells were then washed three times with the same buffer in order to remove the non-uptaken dye.

Once the non-active form of calcium probe (containing AM ester) was internalized in Caco-2 cells, it will be sensibilized to lyse the hydrophobic AM ester by esterases to its activated form (Fluo-4) and the cells were maintained in 1mL HBSS-Hepes buffer containing 1 mM calcium pH 7.2, 37 °C, 5% CO₂ for 30 min.

Fluorescent Caco-2 cells were treated with 100 μ L of different solutions, as follows: Histamine at concentrations in the range 50 μ M - 2.5 mM), vDAO (0.77 and 1.25 mg/mL), desloratadine (5 and 20 μ M), preincubated (15 min) 1.25 mM histamine-vDAO (0.77 - 2.5 mg/mL). The agents have been added under microscope and data acquisition was followed at 37 °C, 5% CO₂. To evaluate the effect of desloratadine on histamine-released Ca²⁺ the cells was treated with indicated concentrations of desloratadine (5-50 mM) during the de-esterification of the probe by cells.

1.19.5 Image acquisition and analysis

Confocal microscopy was used as an imaging technique to measure fluorescent Fluo-4-Ca²⁺ signal (λ_{Em} : 525 nm, λ_{Exc} : 488 nm) induced by histamine. Caco-2 cells were visualized on a Nikon A1 confocal microscope equipped with 10X objective. The acquisition was operated in kinetic scan mode, at 2.5 min with a rate of 2 seconds per scan, pinhole diameter of 11.9 µm, a detector sensibility or high voltage (HV) of 45 and an offset of -5. Fiji is ImageJ software (http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji) was used to quantify fluorescence. Data are expressed as variation of area under the curve (AUC) and were normalized the AUC of control mean obtained from all the data set of experiments. Statistics: All experiments were performed in minimum of three replicates (not replicate from same subculture). Where relevant, data are expressed as mean ± SD.

1.20 Results

1.20.1 Internalization of fluorescent Fluo-4 probe by Caco-2 cells

The behaviour of eukaryotic cells could be followed by several indicators. Usually, Fluo-4 AM, a sensitive probe, is used as indicator in calcium mobilization experiments (Persechini *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 2006). In confocal microscopy, the Caco-2 cells incubated with the Fluo-4 showed a non fluorescent area and some green spots characteristic of the probe (Figure 4. 2A). The non-fluorescence zone may suggest the lack of cells. However, transmitted light (Figure 4.2B) showed a not alter the cell integrity with 100% cells at confluence and also some clustered cells. A merge of the two panels (Figure 4.2C) confirmed that the majority of green spots (Figure 4.1A) is correlated with the cell clusters (Figure 4.2B) probably due to the adhesive property of differentiated Caco-2 cells. The success of Ca²⁺ dye loading was confirmed in the absence of histamine by a basal fluorescence and by the fluorescent spots (Figure 4.2C).

Caco-2 cells express histamine receptors H1 (Lampiasi *et al.*, 2007) and the Ca²⁺ pathway occurs via H1 of most of the intestinal cells. The activation of H1 regulates intracellular Ca²⁺ concentration (Thangam *et al.*, 2018). Considering the affinity of activated Fluo-4 for Ca²⁺ and the fluorescent properties of the formed complex probe, the time course of histamine-induced increase of fluorescence and the number of fluorescent spots was monitored in HBSS-HEPES medium without calcium as a measure of Ca²⁺ flow in the cytosol. During the first 40 s after histamine treatment, no response was observed, suggesting a lag phase of the process. Then, a linear increase

of number of fluorescent spots was observed (Figure 4. 3, Figure 4. 4) with a plateau reached after 60 s. Variations in the time-course of the increase Fluo-4 AM fluorescence in the Caco-2 cells including lag and linear increase (Figure 4. 3 and Figure 4. 4) can be explained by the time required for histamine to bind H1 receptors, before cytosolic Ca^{2+} release.



Figure 4.2: Caco-2 cells staining with Fluo-4 AM.

Caco-2 cells were seeded into 96-well plate at densities of 10 000 cells/well in DMEM supplemented with 15% FBS, 0.1 mM nonessentials amino acids and penicillin/streptomycin per well and were allowed to grow and to differentiate for 21 days at 37 °C. 21-days- cells stained with Fluo-4 AM were imaged in (A) green fluorescence or (B) transmitted light panels. (C) A superposition of the two panels showed a good correlation of fluorescent spots with clustered cells.



Figure 4.3: Time-course of intracellular Ca^{2+} release after 1.25 mM histamine stimulation of Caco-2 cells.

In vitro time lapse sequence showed an increase of fluorescent spots from 40 s until 60 s with a lag phase up to 40s (Figure 4.4). Red arrows indicated isolated of clustered fluorescence cells even they were visible on the screen but not on the picture.



Figure 4.4: Number of random fluorescent cells during fluorescence data acquisition on confocal microscopy.

The representative curve of Caco-2 cells fluorescence after histamine stimulation showed a lag phase followed by a linear increase of number of fluorescent spots (expressed as arbitrary unit (a.u.)) during the first 60 s. Data acquired with ImageJ software are representative of n=5 independent experiments.

1.20.2 vDAO prevents histamine-induced stimulation of intracellular Ca²⁺ mobility

The stability of DAO is related to its concentration and the nature of buffer (Neree *et al.*, 2018). In this way it was crucial to eliminate possible interference and to choose the best experimental conditions. The DMEM is a rich cell culture broth supplemented with antibiotics, nonessential amino acids and foetal bovine serum (FBS) as a main component of eukaryote cell culture media.

The FBS is harvested from bovine fetus blood and it contains hormones (growth factors) and also serum amino oxidase at an elevated level. This was expected, also considering that DAO is highly expressed in placenta.

In fact, we have observed that vDAO in FBS-enriched DMEM medium showed a higher oxidative deamination of histamine (Figure 4.5) than that found in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. This is why an FBS-free medium was used for the further experiments. It was also of interest to evaluate the vDAO activity at increasing histamine concentrations. An increase of reaction rate was found with histamine in the

range 0.01 to 10 mM and an inhibition was found at high concentration of 100 mM histamine, probably an inhibition by the substrate.

Repeated administrations of histamine at the same concentration presented a cumulative agonist effect (Figure 4.6) and a similar increase of fluorescence intensity was found at a subsequent treatment with 0.625 mM histamine. The repetitive and cumulative effects of histamine (0.625 mM) could be due to the fact that H1 receptors are not totally occupied after the first administration (Figure 4.6).

It was also found that the fluorescence intensity related to intracellular Ca^{2+} mobilization, proportionally increased with histamine concentrations (Figure 4.7).

A 1.25 mM histamine concentration was retained for the subsequent experiments to evaluate the effect of vDAO on Ca^{2+} mobility. This concentration of histamine was assumed as non toxic seems it fits well in the range of histamine concentrations up to 3mM exhibiting less toxicity (about 20%) on Caco-2 cells (Jumarie *et al.*, 2016).





The DAO enzyme activity was assayed *in vitro* with histamine as substrate at various concentrations in DMEM (white) supplemented or (grey) not with 15% foetal bovine serum (FBS) and in (black) 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.2. Data are representative of n=3 independent experiments (mean +/- SD).



Figure 4.6: Cumulative effect of histamine as Ca^{2+} signaling molecule. (A) The representative fluorescence and (B) the quantitative analysis based on the area under the curve (AUC) of two successive histamine stimulations (mean +/- SD, n=5 independent experiments).



Figure 4.7: Histamine-induced Ca^{2+} mobilisation on Caco-2 cells. The differentiated Caco-2 cells (21 days) were loaded with the Ca^{2+} -sensitive probe Fluo-4 AM. The fluorescence generated by histamine stimulation was (A) measured by real-time confocal microscopy (B) quantified as area under the curve (AUC) obtained by ImageJ software. Data are representative of n=5 independent experiments.

vDAO caused a concentration-dependant inhibition of Ca^{2+} mobility induced by 1.25 mM histamine (Figure 4.8). Thus, vDAO 0.77, 1.25 and 2.50 mg/mL (corresponding to 5.1, 8.3 and 16.6 μ M) generated about 50, 72 and 96 % inhibition of Ca^{2+} mobilization when the 1.25 mM histamine pre-incubated (for 15 min, room

temperature) with vDAO at various concentrations was added to the HBSS-HEPES without calcium medium. This suggests that the elimination of histamine is the main cause of Ca^{2+} mobility decrease and could be related to the decomposition of histamine in presence of vDAO (histaminase).

The treatment of Caco-2 cells with a solution of histamine preincubated with vDAO at increased concentrations markedly modified the kinetic of cytosolic Ca^{2+} liberation (Figure 4.8). This could be explained by the role of vDAO catalysing the histamine oxidative deamination. Diminishing histamine level in presence of vDAO could reduce its disponibility to bind H1 receptors and thus limiting Ca^{2+} transit from endoplasmic reticulum to cytosol and thus decreasing the related fluorescence.



Figure 4.8: Effect of vDAO at various concentrations on histamine-induced Ca²⁺ mobilization.

The differentiated Caco-2 cells (21 days) were loaded with the Ca²⁺-sensitive dye Fluo-4 AM. The cells were treated with solutions of 1.25 mM histamine previously pre-incubated for 15 min at room temperature with DAO at various concentrations. The fluorescence obtained was (A) measured by real-time confocal microscopy and (B) quantified by ImageJ software. (mean +/- SD, n=5 independent experiments).

1.20.3 Effect of desloratadine on histamine-induced Ca²⁺ signal

The effect of desloratadine on histamine-induced- Ca^{2+} release was also evaluated. An Inhibition of intracellular Ca^{2+} flux was observed at increasing concentrations of

desloratadine. At current desloratadine concentrations (5, 10 and 20 μ M) used to counteract histamine effect, the Ca²⁺ flux was inhibited to 21, 25 and 49 %, respectively (Figure 4. 9).

Our results indicate that the histamine-mediated Ca²⁺ mobilization in Caco-2 cells is derived mainly from H1 receptor activation since the treatment of cells with desloratadine, in concentration-dependent manner, was able to reduce the fluorescence response induced by histamine (Figure 4.9) in agreement with Anthers *et al.* (2002). However, the inhibition induced by vDAO was more efficient than that observed with desloratadine at the same concentrations. For instance, DAO 0.77 mg/mL (corresponding to 5.1 μ M) presented a similar effect than that of desloratadine 20 μ M, with a DAO to desloratadine ratio 1 to 4. Similar tendency was found when the effect of vDAO and desloratadine were evaluated on histamine-induced intestinal smooth muscle contractibility (Neree *et al.*, 2020).



Figure 4.9: Effect of desloratadine at various concentrations on histamine-induced Ca²⁺ mobilization differentiated Caco-2 cells (21 days).

Cells loaded with the Ca²⁺-sensitive Probe Fluo-4 AM were treated first for 15 min with desloratadine at indicated concentrations (5-50 mM) and then exposed to 1.25 mM histamine. In HBSS-HEPES without calcium Media . (A) The fluorescence measured by real-time confocal microscopy was (B) quantify as area under the curve (AUC) (mean +/- SD, n=5 independent experiments) using the ImageJ software (B, data and mean of 5 independent experiments).

The DAO and desloratadine treatments clearly eliminated histamine-induced intracellular Ca^{2+} mobility. Contrary to desloratadine, DAO used in this project comes from vegetal origin. Another significant difference between DAO and desloratadine was that DAO at concentration around four times lower than that of desloratadine efficiently inhibited about 50 % of histamine-mediated intracellular Ca^{2+} mobilization. Exposure of Caco-2 cells to vDAO or desloratadine in the absence of histamine presented no effect on Ca^{2+} mobility (Figure 4.10) ruling out the hypothesis of a direct interference of antihistamines in the Ca^{2+} response. A slight effect of desloratadine observed (Figure 4.9B) might be due to the binding of desloratadine to the receptor.



Figure 4.10: DAO and desloratadine did not induce Ca^{2+} mobilization. Differentiated Caco-2 cells (21 days) were loaded with the Ca^{2+} -sensitive probe Fluo-4 AM and treated with (A) DAO or (B) desloratadine at various concentrations (representative data of one experiment of 5).

1.21 Conclusion

A rise in cytosolic Ca^{2+} in epithelial cells serves as a marker for the cell activity behaviour. In addition, Ca^{2+} probe is a useful technique to evaluate various therapeutic agents that could counteract histamine damaging effects. Our data demonstrate that: *i*) the level of Ca^{2+} mobility appeared as mediated by histamine through H1 receptor; *ii*) both DAO and desloratadine are able, by different mechanisms, to inhibit histamineinduced Ca^{2+} mobilization and *iii*) DAO that inhibit 50 % of Ca^{2+} mobility at concentration four times lower than that of desloratadine, could be recommended to control histamine effects via H1 receptor activation.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) sont des maladies chroniques qui durent sur des longues périodes de la vie. Les personnes atteintes de ces maladies inflammatoires ont plus de risques de développer un cancer colorectal à long terme et ces risques augmentent avec l'âge. Le cancer colorectal occupe la troisième place parmi les cancers les plus répandus chez les Canadiens.

L'histamine (2-[4-imidazolyl]-éthylamine est un agent proinflammatoire impliqué dans l'apparition et le développement des MII. C'est une amine biogène d'origine endogène (issu de la dégranulation des mastocytes activés) et exogène (contenue dans les aliments fermentés). L'histamine est distribuée dans tout l'organisme humain et majoritairement dans le tractus gastro-intestinal. Cette dernière assure de nombreuses fonctions biologiques (contraction des muscles lisses de l'intestin, induction des réactions pseudo-allergiques, du choc anaphylactique) via quatre récepteurs appelés récepteurs histaminiques (H). Toutefois, un apport excessif d'histamine au niveau intestinal serait à l'origine ou maintiendrait plusieurs dysfonctions telles que des allergies alimentaires, des réactions anaphylactiques, des troubles de la motilité intestinale (apparition des diarrhées et des constipations), les MII et le syndrome du côlon irritable.

Chez les mammifères, la principale enzyme qui dégrade l'histamine exogène est la diamine oxydase (DAO/histaminase). Elle est produite majoritairement dans les reins, le placenta lors de la gestation et dans l'intestin. Plusieurs études ont montré une diminution de l'activité enzymatique de la DAO intestinale (DAOi) dans les MII, une accumulation de l'histamine au niveau intestinal et une intensification de la réponse immunitaire chronique. De plus, une relation directe entre la diminution de l'activité de la DAO et le développement de certains cancers a été aussi démontrée.

Le niveau d'histamine intestinale est contrôlé par l'action de la DAOi présente sur les villosités intestinales et par les transporteurs de cations organiques (OCT) qui contribuent au passage de l'histamine de la lumière intestinale vers la circulation sanguine (Figure 5.1). Ainsi pour prévenir le retour systémique de l'histamine vers le sang, une dégradation de l'histamine au niveau intestinal est essentielle. Si la capacité intestinale d'élimination de l'histamine n'est pas équilibrée alors le niveau de l'histamine circulatoire pourrait augmenter et occasionner (ou aggraver) les pathologies citées ci-dessus.

Les stratégies thérapeutiques disponibles pour les affections dues à l'histamine sont basées sur les agents antihistaminiques. Ils assurent principalement deux fonctions : celle d'antagoniste et d'agoniste inverse dont le mode d'action consiste à bloquer le récepteur histaminique ou à renverser les effets de l'agoniste, respectivement. Cependant, les agents antihistaminiques, issus de la chimie de synthèse présentent des effets secondaires et ils ne favorisent en aucun cas l'élimination de l'histamine.

Dans le même ordre d'idée on retrouve également sous forme de supplément alimentaire la diamine oxydase de rein de porc (DAOrp). La DAOrp présente une activité enzymatique très faible avec une affinité pour l'histamine inferieur à celle de la DAO végétale (DAOv). En plus de cela le fait que la DAOrp soit d'origine animale pourrait être plus immunogénique et pourrait présenter une limite pour une catégorie de consommateurs.



Figure 5.1 : Impact du milieu intestinal sur l'activité de la DAO végétale. Dans les fluides intestinaux simulés (A) l'acide cholique libre ou sous forme de micelles lipidiques stabiliserait l'activité de la DAO contrairement aux protéases (trypsine et pancréatine) et aux spiritueux (plus de 36 % d'alcool) qui inhibent l'activité de la DAO (Neree *et al.*, 2018). Le flux de l'histamine de la lumière intestinale vers la circulation générale et viceversa est assuré par des transporteurs de cations organiques (OCT). L'histamine cytosolique et extracellulaire (B) est décomposée par l'histamine N-méthyltransférase et par la diamine oxydase, respectivement. Les produits de décomposition de l'histamine sont : IA (Imidazole Acétaldéhyde), MIAA (Acide 1-Méthyl-4-Imidazole Acétique), IAA (Acide Imidazole Acétate) et MH (Méthyl-Histamine). L'administration orale de la DAO végétale décomposerait l'histamine au niveau intestinal (d'après Mateescu *et al.*, 2017; Neree *et al.*, 2018).

Dans ce contexte, nous avons proposé la DAOv, qui aurait une activité 30 fois plus élevée que celle de la DAOrp commerciale et qui présenterait une grande affinité pour l'histamine.

Tout comme la majorité des enzymes, la DAOv est fonctionnellement active sous la forme d'homodimère. Ainsi le non-assemblage ou un déséquilibre du ratio monomère : dimère, en solution dû à de faibles concentrations induisant une instabilité de la structure tridimensionnelle (Marianayagam *et al.*, 2004) de l'enzyme, pourrait expliquer l'instabilité temporelle de la DAOv à 37 °C et à des concentrations inférieures à 0.6×10^{-1} mg/mL. De plus la stabilité de la DAOv à 37 °C dans les différents (supérieure 0.6×10^{-1} mg de poudre/mL), pendant 48h à 37 °C dans les différents

milieux intestinaux simulés corroborerait avec l'hypothèse d'une interaction protéineprotéine et de la stabilisation conformationnelle à de grandes concentrations.

Dans des conditions de jeûne avec une variation dans la conductivité et le pH (FaSSIF pH 6.8, FaSSIF pH 6.5), la conductivité et l'acidité du milieu réactionnel inhiberaient de façon réversible l'activité de la DAOv.

En plus de la variation du pH, l'alimentation ingérée et les fluides digestifs (surfactants, électrolytes, bicarbonate, protéines et protéases) déversés dans le tractus intestinal constituent des paramètres importants dans la simulation du milieu intestinal (Figure 5.2). De façon inattendue, l'effet inhibiteur de la conductivité et du pH, du temps d'incubation (à 37 °C) et du bicarbonate (NaHCO₃) sur l'activité de la DAO est renversé par l'acide cholique sous forme libre ou sous forme de micelles. Toutefois, l'action inhibitrice des protéases (telles que la trypsine et la pancréatine) des spiritueux (plus de 36 % d'alcool) serait irréversible.

Dans le même ordre d'idées, 50% de l'activité initiale de la DAO incubée (37 °C) en présence du contenu intestinal de rat nourri serait stable pendant une période qui correspond à celle du transit intestinal.

1.22 Effets bénéfiques de la DAO

L'histamine relarguée pendant la réponse allergique est décomposée en aldéhyde correspondant, ammoniac et peroxyde d'hydrogène par certaines amine oxydases (AO) à cuivre. En fonction de leur groupement prosthétique, les AOs sont divisés en deux grandes classes : AO à flavine adénine dinucléotide (AO-FAD) et AO à cuivre (AO-Cu). Ce second groupe d'enzymes (AO-Cu, EC 1.4.3.6) regroupent les diamines oxydases d'origine végétale.

Plusieurs études ont montré un rôle des amines oxydases dans la modulation de la mort cellulaire programmée (apoptose) et les propriétés thérapeutiques de la diamine oxydase végétale contre les histaminoses et comme médecine douce pouvant être associée aux traitements actuels des maladies cancéreuses et des maladies inflammatoires (Pietrangeli *et al.*, 2019). Les amines biogènes sont des agents causatifs de la prolifération des cellules. Elles sont retrouvées à des fortes concentrations au voisinage des tumeurs (cas du cancer du côlon). Ainsi, l'action de la DAO végétale en absence de catalase a été mise en évidence dans le traitement de certains cancers par Kusche *et al.* (Kusche *et al.*, 1980; Averill-Bates *et al.*, 2005). Le H₂O₂ et l'aldéhyde produits inhibent la synthèse des protéines, la prolifération cellulaire et la viabilité des cellules Caco-2 (Jumarie *et al.*, 2017).

L'action de désamination oxydative de la DAO (histaminase) aurait un rôle bénéfique pour les dysfonctions-reliées à l'histamine. C'est le cas dans la réponse cardiaque anaphylactique, l'ischémie cardiaque, réactions asthmatiques, maladies inflammatoires de l'intestin et hyperperméabilités paracellulaires (Masini *et al.*, 2002; Masini *et al.*, 2004; Masini *et al.*, 2007; Mondovi *et al.*, 2013), (Figure 5.2). Masini et collaborateurs ont montré que la DAO végétale peut avoir un effet bénéfique dans l'ischémie intestinale en diminuant l'inflammation intestinale par la dégradation de l'histamine et aussi par ses effets antioxydants tels qu'observés chez d'autres enzymes à cuivre (Mateescu and Nadeau, 2009).

Il faut souligner que la DAO végétale administrée par voie orale agit exclusivement au niveau intestinal. Elle peut métaboliser des amines biogènes (histamine et autres) mais seulement au niveau intestinal. Ainsi, il n'est pas attendu que l'administration orale de la DAO puisse présenter des effets indésirables au niveau périphérique.

De plus, il est connu que l'histamine présente une capacité d'altérer l'intégrité de la barrière hématoencéphalique dans le cas des histaminoses alimentaires répétées, associées à une activité de la DAO réduite au niveau intestinal pourrait présenter des effets secondaires majeures (maladies neurologiques, sclérose en plaque, etc). Dans ces situations, l'administration de la DAOv par voie orale peut réduire les effets secondaires de l'histamine en limitant la quantité absorbée au niveau intestinal.
1.23 Effets bénéfiques de la DAO sur la dysmotilité intestinale de souris

Via des récepteurs histaminiques H1 majoritairement exprimés dans le tractus gastrointestinal, l'histamine, assure la motilité intestinale. Chez les sujets atteints de maladies inflammatoires de l'intestin, la constipation et l'apparition de diarrhées parfois sanguinolentes sont associées à un excès d'histamine. L'inflammation des ganglions nerveux entériques ou une inhibition des motoneurones sécrétrices entériques dues à un excès d'histamine conduit à une hyper-contraction du muscle lisse intestinal (Tidmarsh 1932, Fargeas *et al.*, 1989, Murch 2006).

La contraction du muscle entérique (enregistré *ex vivo* à 37 °C pendant deux min) croit avec la concentration d'histamine dans le milieu expérimental *ex vivo*. Pour une concentration fixe en histamine de 50 μ M, la contraction du colon distal de souris diminue avec des concentrations croissantes de la DAO végétale ou de la desloratadine. De plus, un traitement avec la DAO végétale associée à la vitamine B6 (encore appelée pyridoxal phosphate ou PLP) amplifie la réponse observée avec la DAO en absence de PLP (Figure 5.3).

Des études antérieures ont montré que le PLP forme un complexe avec l'histamine (Kierska *et al.*, 1978). Dans le but de montrer que l'inhibition de la contraction du côlon distal est liée à une augmentation de l'activité de la DAO et non à la diminution de la concentration d'histamine libre dans le milieu, des tests spectrophotométriques et électrophorétiques (zymographie) du dosage de la DAO avec ou sans PLP ont été réalisés. L'activité de la DAO augmente de 15 % avec la concentration de PLP en présence de 3 mM de putrescine. Comparativement à l'histamine, la putrescine a une affinité pour la DAO plus grande et de ce fait constitue un substrat de choix pour doser l'activité de la DAO. Donc, le PLP augmente l'activité de la DAO en comparaison au témoin (DAO). Dans le même ordre d'idée, le peroxyde d'hydrogène, produit au cours de la réaction enzymatique de la DAO en présence de l'histamine 50 μ M n'aurait aucun effet sur la contraction musculaire induite par l'histamine 50 μ M.



5-Hydroxytryptamine

Figure 5.2 : Rôle de la DAO.

Propriété inhibitrice de l'histaminase (DAO) dans les différents stades de développement des maladies cardiaques, de l'infarctus du myocarde et des maladies inflammatoires de l'intestin (d'après Mondovi *et al.*, 2013).

Dans le but d'évaluer la propriété antihistaminique de la DAO en cas de dysfonctions liées à l'histamine, la rétention de la DAO sur des villosités intestinales après qu'elle soit administrée *in vivo* par la voie rectale (lavements) majoritairement chez des souris femelles (pour plus de reproductibilité) a été investiguée. Cependant, une étude comparative male et femelles a montré des résultats similaires.

Des captures d'images (à l'aide d'un microscope à fluorescence) du segment distal de côlon de souris traité avec la DAO et la Concanavaline A fluorescente (Con A-FITC), qui se lie à la partie carbohydrate des glycoprotéines (DAO), ont révélé une fluorescence accrue de la membrane des cellules épithéliales pour le côlon traité en comparaison avec le côlon control (non traité avec la DAO végétale). Afin de confirmer cette observation, le dosage de la DAO sur les segments de colons de souris traitées avec la DAO végétale et lavés plusieurs fois au PBS 1X après excision, a montré une stabilité de l'activité de la DAO pendant une heure d'incubation à 37 °C.

La rétention de la DAO sur les villosités intestinales pourrait s'expliquer par le fait que la DAO oxyde les groupes ε -amine des résidus de lysine des protéines de la lumière intestinale. Les lysines oxydées établissent à leur tour des liaisons covalentes avec la fonction ε -amine de la DAO par un mécanisme similaire de formation des bases de Schiff présenté par Wang (Wang *et al.* 1996) et Befani (Befani *et al.*, 1998) pour l'amine oxydase sérique de bœuf.

1.24 DAO inhibe la motilité du Ca²⁺ intracellulaire induite par l'histamine

Le réseau de signalisation induit par l'histamine constitue une cible thérapeutique pour les histaminoses. L'intervention de nombreux médicaments en cas d'allergies alimentaires, a pour but de bloquer les récepteurs histaminiques et d'éliminer les effets induits par l'histamine : il s'agit des antagonistes ou des agonistes inverses.



Figure 5.3 : La DAO inhibe la contraction musculaire induite par l'histamine. L'histamine induit la contraction du colon de souris. Le traitement avec la DAO supplémentée ou non avec la vitamine B6 (PLP, un modulateur de l'activité de la DAO) réduit considérablement la contraction déclenchée. Les colons traités *ex vivo* avec la DAO rendue fluorescent par la Concanavaline A-FITC, lient de façon possiblement covalente l'enzyme.

En cas de dysfonctions liées à l'histamine, cette dernière se lie au récepteur H1, qui est couplé à la protéine de type Gq. La sous-unité Gq α active le phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le 4,5-bisphosphate de phosphatidylinositol (PIP2) en l'inositol triphosphate (IP3). Le diacylglycérol (DAG), localisé dans l'espace inter-membranaire active la protéine kinase C (PKC). L'IP3 se lie au récepteur sensible à l'inositol triphosphate (IP3R) et stimule la libération de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique vers le cytosol. Le Ca²⁺ intracellulaire relâché forme un complexe avec la calmoduline (CaM). Le complexe Ca²⁺-CaM supprime l'activité des canaux potassiques voltage-

dépendants de type 7 (canaux Kv7), qui dépolarisent les neurones, et conduisent à l'augmentation de l'excitabilité neuronale, qui se manifeste par une augmentation des symptômes de la douleur (Figure 5.4) qui accompagnent régulièrement la constipation ou les diarrhées.



Figure 5.4 : Cascade de signalisation activée par la liaison de l'histamine à ses récepteurs. La liaison de l'histamine aux récepteurs H stimule la production d'inositol triphosphate (IP3). L'IP3 active le récepteur IP3R du réticulum endoplasmique et il s'en suit le relâchement du calcium dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, le calcium se lie à la calmoduline (CaM). Le complexe Ca²⁺-CaM est impliqué dans le développement des douleurs abdominales (d'après Obara *et al.*, 2019).

De ce fait l'inhibition de la mobilité du calcium dans le cytosol des entérocytes par des agents anti-histaminiques tels que la desloratadine, soulage les patients en condition d'histaminose et d'entérite inflammatoire. Afin de contourner les effets sédatifs de ces agents antihistaminiques, le traitement des cellules épithéliales de type Caco-2 par la DAO végétale a montré une action antihistaminique similaire à celle de la desloratadine (Figure 5.5).



Figure 5.5 : Action hypothétique de l'histamine, de la diamine oxydase (DAO) et de la desloratadine sur le récepteur histaminique H1.

L'histamine active la voie de signalisation impliquant H1. Toutefois cette voie peut retourner à son activité basale suite à la désamination oxydative de l'histamine par DAO. Dans le même ordre d'idée, la voie activée par l'histamine est également inhibée par un antagoniste tel que la desloratadine (d'après Canonica *et al.*, 2011).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux suggèrent que la diamine oxydase d'origine végétale (DAOv) pourrait être considérée comme une thérapie alternative pour le traitement des histaminoses d'origine alimentaire et pourrait être associée aux thérapies déjà existantes contre les maladies inflammatoires de l'intestin et le syndrome de l'intestin irritable. Les propriétés physicochimiques (l'osmolarité, le pH, les acides biliaires, les enzymes pancréatiques, le bicarbonate de sodium, les lipides et les proteines) et les mouvements mécaniques (péristaltisme) du tube digestif auraient un impact sur la stabilité de la DAOv administrable par voie orale.

Considérant que la DAOv serait approximativement 30 et 4 fois plus active que la DAO de rein de porc commercialisée et que la desloratadine, respectivement, la DAOv pourrait être substituée (en cas d'histaminose alimentaire) à la DAO animal et à la desloratadine issue de la chimie de synthèse.

Les résultats obtenus au cours de ce projet de doctorat contribuent à l'avancement des connaissances dans le domaine *(i)* des allergies et des maladies inflammatoires de l'intestin, *(ii)* de la médecine à base des plantes thérapeutiques et *(iii)* de la phytothérapie dans les troubles intestinaux. Ces résultats ont permis de comprendre :

- (1) Le comportement et la stabilité de la DAO en milieux intestinaux simulés
- (2) La stabilité enzymatique de la DAO en présence d'un acide biliaire primaire (acide cholique) et d'un acide biliaire secondaire (acide déoxycholique).
- (3) Le devenir de la DAOv, formulée en association ou non avec d'autres composés (catalase et vitamine B6) pour administration orale, au niveau intestinal.

- (4) Le comportement et la retention à la muqueuse intestinale de la DAOv administrée par voie rectale (lavement).
- (5) Les applications de la DAOv en situation d'hypercontraction des muscles lisses du côlon induite par l'histamine.

En contrôlant l'équilibre entre l'histamine ingérée et celle dégradée, la DAOv favoriserait :

a. L'élimination de l'histamine de la lumière intestinale.

b. L'inhibition de la mobilité du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol.

La thérapie intestinale avec histaminase végétale administrable par voie orale est nouvelle et l'information concernant les effets thérapeutiques de cette enzyme dans différentes conditions pathologiques est pour le moment limitée.

La reduction des niveaux locaux d'histamine dans le tractus intestinal, conduit à une diminution significative des symptômes associés aux allergies alimentaires, MII, SII et aux cancers intestinaux. Pour des travaux ultérieurs, il serait interessant d'investiguer plus en détail la stabilité enzymatique de la DAO en présence de plusieurs groupes de protéines (globulaires et structurales), de lipides (micelles, cholesterol, omega), colorant (bilirubine) et sucres (sucres reducteurs et sucre non réducteurs). Il serait également pertinent d'évaluer les propriétés thérapeutiques de la DAOv chez des grands mammifères (le cochon et le chien).

BIBLIOGRAPHIE

Abraham C., Cho J.H. (2009) Mechanisms of disease. New England Journal Medicine 361: 2066-2078.

- Actis G.C., Pellicano R., Fagoonee S., Ribaldone D.G. (2019) History of inflammatory bowel diseases. Journal of Clinical Medicine 8: 1970-1984.
- Adányi N., Székács I., Szendrő I., Székács A. (2014) Determination of histamine content in vegetable juices by using direct and competitive immunosensors. Food and Agricultural Immunology 25: 20-33.
- Afilal M., Daoudi H., Jdaini S., Asehraou A., Bouali A. (2006) Study of the histamine production in a red flesh fish (*Sardina pilchardus*) and a white flesh fish (*Dicentrarchus punctatus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 6: 43-48.
- Ahmadifar S., Le T.C. Marcocci L., Pietrangeli P., 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.
- Aitken S.M., Lodha P.H., Morneau D.J. (2011) The enzymes of the transsulfuration pathways: active-site characterizations. Biochimica et Biophysica Acta -Proteins and Proteomics 1814: 1511-1517.
- Albrecht M., Dittrich A. (2015) Expression and function of histamine and its receptors in atopic dermatitis. Molecular and Cellular Pediatrics 2: 16-24.
- Amon U., Bangha E., Küster T., Menne A., Vollrath I., Gibbs B. (1999) Enteral histaminosis: Clinical implications. Inflammation Research 48: 291-295.

- Anthes J.C., Gilchrest H., Richard C., Eckel S., Hesk D., West Jr R.E., Williams, S.M., Greenfeder, S., Billah, M., Kreutner, W. (2002) Biochemical characterization of desloratadine, a potent antagonist of the human histamine H1 receptor. European Journal of Pharmacology 449: 229-237.
- Ash A., Schild H. (1966) Receptors mediating some actions of histamine. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy 27: 427-439.
- Ashina K., Tsubosaka Y., Nakamura T., Omori K., Kobayashi K., Hori M., Ozaki H., Murata T. (2015) Histamine induces vascular hyperpermeability by increasing blood flow and endothelial barrier disruption *in vivo*. Plos One 10: e0132367.
- Averill-Bates D.A., Chérif A., Agostinelli E., Tanel A., Fortier G. (2005) Antitumoral effect of native and immobilized bovine serum amine oxidase in a mouse melanoma model. Biochemical Pharmacology 69: 1693-1704.
- Baker A.-M., Cereser B., Melton S., Fletcher A.G., Rodriguez-Justo M., Tadrous,
 P.J., Humphries A., Elia G., McDonald S.A., Wright N.A. (2014)
 Quantification of crypt and stem cell evolution in the normal and neoplastic human colon. Cell Reports 8: 940-947.
- Barbara G., Stanghellini V., De Giorgio R., Cremon C., Cottrell G.S., Santini D., Pasquinelli G., Morselli-Labate A.M., Grady E.F., Bunnett N.W. (2004) Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. Gastroenterology 126: 693-702.
- Barcik W., Pugin B., Westermann P., Perez N.R., Ferstl R., Wawrzyniak M., Smolinska S., Jutel M., Hessel E.M., Michalovich D. (2016) Histaminesecreting microbes are increased in the gut of adult asthma patients. Journal of Allergy and Clinical Immunology 138: 1491-1494.
- Barger G., Dale H.H. (1910) Chemical structure and sympathomimetic action of amines. The Journal of Physiology 41: 19-59.
- Befani O., Graziani M.T., Agostinelli E., Grippa E., Mondovi B., Mateescu M.A. (1998) Serum amine oxidase can specifically recognize and oxidize aminohexyl (AH) chains on AH-Sepharose support: single-step affinity immobilization 1. Biotechnology and Applied Biochemistry 28: 99-104.

- Befani O., Shiozaki T., Turini P., Gerosa P., Mondovi B. (1995) Inhibition of diamine oxidase activity by metronidazole. Biochemical and Biophysical Research Communications 212: 589-594.
- Bellelli A., Morpurgo L., Mondovì B., Agostinelli E., (2000) The oxidation and reduction reactions of bovine serum amine oxidase: A kinetic study. European Journal of Biochemistry 267: 3264-3269.
- Benly P. (2015) Role of histamine in acute inflammation. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 7: 373-376.
- Berridge, M.J., (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. Annual Review of Biochemistry 56: 159-193.
- Church M.K., Maurer M., (2014) Antihistamines: history of allergy. Chemical Immunology Allergy. 100: 302-310.
- Bernstein C.N., Rawsthorne P., Cheang M., Blanchard J.F., (2006) A populationbased case control study of potential risk factors for IBD. American Journal of Gastroenterology 101: 993-1002.
- Best C.H., Dale H., Dudley H., Thorpe W. (1927) The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. The Journal of Physiology 62: 397-417.
- Biegański T., Kusche J., Lorenz W., Hesterberg R., Stahlknecht C.D., Feussner K.D. (1983) Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 756: 196-203.
- Bjarnadóttir T.K., Gloriam D.E., Hellstrand S.H., Kristiansson H., Fredriksson R., Schiöth H.B. (2006) Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. Genomics 88: 263-273.
- Binda C., Mattevi A., Edmondson D.E. (2002) Structure-function relationships in flavoenzyme-dependent amine oxidations a comparison of polyamine oxidase and monoamine oxidase. Journal of Biological Chemistry 277: 23973-23976.

- Birtwhistle R.V. (2009) Irritable bowel syndrome: are complementary and alternative medicine treatments useful? Canadian Family Physician 55: 126-127.
- Bissonnette P., Gagne H., Coady M.J., Benabdallah K., Lapointe J.-Y., Berteloot A., (1996) Kinetic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 270: 833-843.
- Blemur L., Le T.C., Marcocci L., Pietrangeli P., Mateescu M.A. (2016) Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. Biotechnology and Applied Biochemistry 63: 344-353.
- Bodmer S., Imark C., Kneubühl M. (1999) Biogenic amines in foods: histamine and food processing. Inflammation Research 48: 296-300.
- Boer J., Ederveen E., Grundmark B. (2018) Desloratadine and depression, a drug safety signal based on worldwide spontaneous reporting of side effects. Upsala Journal of Medical Sciences 123: 174-178.
- Borriello F., Iannone R., Marone G. (2017) Histamine release from mast cells and basophils. histamine and histamine receptors in health and disease. Handbook of Experimental Pharmacology 241: 121-139.
- Bouladoux N., Hand T.W., Naik S., Belkaid Y., (2013) Microbiota and T lymphocytes: the best enemies. Medecine Sciences 29: 349-352.
- Bradford M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Breunig E., Michel K., Zeller F., Seidl S., Weyhern C.W.H.V., Schemann M. (2007) Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. The Journal of Physiology 583: 731-742.
- Brotherton C.S., Taylor A.G., Keeling A. (2013) Fire in the belly and the professionalization of nurses: A historical analysis of Crohn disease care. The

Official Journal of the Society of Gastroenterology Nurses and Associates 36: 21-28.

- Brownell J., Casale T.B. (2004) Anti-IgE therapy. Immunology and Allergy Clinics 24: 551-568.
- Buffoni F. (1995) Semicarbazide-sensitive amine oxidases: some biochemical properties and general considerations. Progress in Brain Research 106: 323-331.
- Buffoni F., Banchelli G., Ignesti G., Pirisino R., Raimondi L. (1994a) The role of semicarbazide-sensitive amine oxidase with a high affinity for benzylamine (Bz. SSAO) in the catabolism of histamine in the mesenteric arterial bed of the rat. Agents and Actions 42: 1-6.
- Buffoni F., Cambi S., Banchelli G., Ignesti G., Pirisino R., Raimondi L. (1994b) Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity of guinea pig dorsal skin. Journal of Neural Transmission 41: 421-426.
- Buffoni F., Ignesti G. (2003) Biochemical aspects and functional role of the coppercontaining amine oxidases. Inflammopharmacology 11, 203-209.
- Calinescu C., Federico R., Mondovi B., Mateescu M.A. (2010) 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.
- Calinescu C., Mondovi B., Federico R., Ispas-Szabo P., Mateescu M.A. (2012) Carboxymethyl starch: chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. International Journal of Pharmaceutics 428: 48-56.
- Carriere V., Chambaz J., Rousset M. (2001) Intestinal responses to xenobiotics. Toxicology *In Vitro* 15: 373-378.
- Chelakkot C., Ghim J., Ryu S.H. (2018) Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. Experimental & Molecular Medicine 50: 1-9.

- Colombo F.M., Cattaneo P., Confalonieri E., Bernardi C. (2018) Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 58: 1131-1151.
- Comas-Basté O., Latorre-Moratalla M.L., Sánchez-Pérez S., Veciana-Nogués M.T., Vidal-Carou M.C. (2019) *In vitro* determination of diamine oxidase activity in food matrices by an enzymatic assay coupled to UHPLC-FL. Analytical and Bioanalytical Chemistry 411: 7595-7602.
- Cricco G.P., Mohamad N.A., Martín G.A. (2012) Insights into histamine role in cell migration and matrix remodeling: special focus on tumor biology. Advances in Medicine and Biology, Nova Science 54: 29-49.
- D'agostino L., Daniele B., Pignata S., Gentile R., Tagliaferri P., Contegiacomo A., Silvestro G., Polistina C., Bianco A.R., Mazzacca G. (1989) Ornithine decarboxylase and diamine oxidase in human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. Gastroenterology 97: 888-894.
- Dainese R., Galliani E.A., De Lazzari F., Di Leo V., Naccarato R., (1999) Discrepancies between reported food intolerance and sensitization test findings in irritable bowel syndrome patients. The American Journal of Gastroenterology 94: 1892-1897.
- Darwich A.S., Aslam U., Ashcroft D.M., Rostami-Hodjegan A. (2014) Meta-analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans. Drug Metabolism and Disposition 42: 2016-2022.
- Daure E., Ross L., Webster C.R. (2017) Gastroduodenal ulceration in small animals: part 2. Proton pump inhibitors and histamine-2 receptor antagonists. Journal of the American Animal Hospital Association 53: 11-23.
- Delie F., Rubas W. (1997) A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. Critical Reviews[™] in Therapeutic Drug Carrier Systems 14: 4717-4724.

- Dominy J.E., Stipanuk M.H. (2004) New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H₂S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant. Nutrition Reviews 62: 348-353.
- Dooley D.M., McIntire W.S., McGuirl M.A., Cote C.E., Bates J.L. (1990) Characterization of the active site of Arthrobacter P1 methylamine oxidase: evidence for copper-quinone interactions. Journal of the American Chemical Society 112: 2782-2789.
- Dressman, J.B., Amidon, G.L., Reppas, C., Shah, V.P. (1998) Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. Pharmaceutical Research 15: 11-22.
- Egawa G., Nakamizo S., Natsuaki Y., Doi H., Miyachi Y., Kabashima K. (2013) Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. Scientific Reports 3: 1-6.
- Fabisiak A., Włodarczyk J., Fabisiak N., Storr M., Fichna J. (2017) Targeting histamine receptors in irritable bowel syndrome: a critical appraisal. Journal of Neurogastroenterology and Motility 23: 341-348.
- Fargeas M., Bassotti G., Fioramonti J., Bueno L. (1989a). Involvement of different mechanisms in the stimulatory effects of cholecystokinin octapeptide on gastrointestinal and colonic motility in dogs. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 67: 1205-1212.
- Fargeas M., Fioramonti J., Bueno L. (1989b) Involvement of different receptors in the central and peripheral effects of histamine on intestinal motility in the rat. Journal of Pharmacy and Pharmacology 41: 534-540.
- Farzam, K., O'Rourke, M.C. (2020) Antihistamines. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Fogh J., Fogh J.M. Orfeo T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. Journal of the National Cancer Institute 59: 221-226.

- Frei P., Biedermann L., Rogler G. (2011) Maladie de Crohn et colite ulcéreuse l'essentiel pour les non gastro-entérologues. Forum Médical Suisse. EMH Media, p. 718-726.
- Gawandi V., Fitzpatrick P.F. (2007) The synthesis of deuterium-labeled spermine, N¹-acetyl-spermine and N¹-acetylspermidine. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 50: 666-670.
- Götz M. (1996) Pseudo-allergies are due to histamine intolerance. Wiener Medizinische Wochenschrift 146: 426-430.
- Graham H.T., Lowry O.H., Wahl N., Priebat M.K. (1955) Mast cells as sources of tissue histamine. Journal of Experimental Medicine 102: 307-318.
- Grimsby J., Toth M., Chen K., Kumazawa T., Klaidman L., Adams J.D., Karoum F., Gal J., Shih J.C. (1997) Increased stress response and β–phenylethylamine in MAOB–deficient mice. Nature Genetics 17: 206-210.
- Guss J.M., Zanotti G., Salminen T.A. (2009) Copper amine oxidases: structures, catalytic mechanisms and role in pathophysiology. Anticancer Research 30: 1035-1040.
- Håkanson R., Böttcher G., Ekblad E., Panula P., Simonsson M., Dohlsten M., Hallberg T., Sundler F. (1986) Histamine in endocrine cells in the stomach. Histochemistry 86: 5-17.
- Hare M.L.C. (1928) Tyramine oxidase: A new enzyme system in liver. Biochemical Journal 22: 968-979.
- He G., Hu J., Li T., Ma X., Meng J., Jia M., Lu J., Ohtsu H., Chen Z., Luo X. (2012) Arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. Molecular Medicine 18: 1-9.
- Hendrickson B.A., Gokhale R., Cho J.H. (2002) Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. Clinical Microbiology Reviews 15: 79-94.

- Hiebl V., Schachner D., Ladurner A., Heiss E.H., Stangl H., Dirsch V.M. (2020) Caco-2 cells for measuring intestinal cholesterol transport-possibilities and limitations. Biological Procedures Online 22: 1-18.
- Howell S., Kenny A.J., Turner A.J. (1992) A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. Biochemical Journal 284: 595-601.
- Huang H., Li Y., Liang J., Finkelman F.D. (2018) Molecular regulation of histamine synthesis. Frontiers in Immunology 9: 1392-1399.
- Huang W., Huang X., Xing Z., Qiu X., Wang Y., Fan R., Liu W., Ren P., Liu Z., Zhou H. (2011) Meranzin hydrate induces similar effect to Fructus Aurantii on intestinal motility through activation of H 1 histamine receptors. Journal of Gastrointestinal Surgery 15: 87-96.
- Ishiguro H., Yamamoto A., Nakakuki M., Yi L., Ishiguro M., Yamaguchi M., Kondo S., Mochimaru Y. (2012) Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. Nagoya Journal of Medical Science 74: 1-18.
- Ishizaki H., Yasunobu K.T. (1980) Bovine plasma amine oxidase interactions with concanavalin A in solution and with concanavalin A-Sepharose. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology 611: 27-34.
- Iwakawa H., Fukui T., Fukuwatari T., Bamba S., Sasaki M., Tsujikawa T., Shibata K. (2019) Blood concentrations and renal clearance of water-soluble vitamins in outpatients with ulcerative colitis. Biomedical Reports 10: 202-210.
- Jarisch, R., Wantke, F. (1996) Wine and headache. International Archives of Allergy and Immunology 110: 7-12.
- Johannessen L.E., Spilsberg B., Wiik-Nielsen C.R., Kristoffersen A.B., Holst-Jensen A., Berdal K.G. (2013) DNA-fragments are transcytosed across Caco-2 cells by adsorptive endocytosis and vesicular mediated transport. PloS One 8: 56671-56679.

- Jones B., Kearns G. (2011) Histamine: new thoughts about a familiar mediator. Clinical Pharmacology & Therapeutics 89: 189-197.
- Jumarie C., Séïde M., Marcocci L., Pietrangeli P., Mateescu M.A. (2017) Diamine oxidase from white pea (*Lathyrus sativus*) combined with catalase protects the human intestinal Caco-2 cell line from histamine damage. Applied Biochemistry and Biotechnology 182: 1171-1181.
- Jutel M., Watanabe T., Klunker S., Akdis M., Thomet O.A., Malolepszy J., Zak-Nejmark T., Koga R., Kobayashi T., Blaser K. (2001) Histamine regulates Tcell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. Nature 413: 420-425.
- Kagan H.M., Li W. (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. Journal of Cellular Biochemistry 88: 660-672.
- Kawakami Y., Kasakura K., Kawakami T. (2019) Histamine-releasing factor, a new therapeutic target in allergic diseases. Cells 8: 1515-1525.
- Keston A.S., Brandt R. (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. Analytical Biochemistry 11: 1-5.
- Kierska D., Sasiak K., Bogusławski M., Maśliński C. (1975) Phosphopyridoxal complexes with histamine and histidine (1) the kinetics of complex formation between pyridoxal 5'-phosphate and histamine. Agents and Actions 5: 15-19.
- Kim N.H., Lee A.Y. (2010) Histamine effect on melanocyte proliferation and vitiliginous keratinocyte survival. Experimental Dermatology 19: 1073-1079.
- Kim H., Dwyer L., Song J.H., Martin-Cano F.E., Bahney J., Peri L., Britton F.C., Sanders K.M., Koh S.D. (2011) Identification of histamine receptors and effects of histamine on murine and simian colonic excitability. Neurogastroenterology & Motility 23: 949-967.
- Klinman J., Dooley D., Duine J., Knowles P., Mondovi B., Villafranca J. (1991) Status of the cofactor identity in copper oxidative enzymes. FEBS Letters 282: 1-4.

- Klinman J.P. (2003) The multi-functional topa-quinone copper amine oxidases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics 1647: 131-137.
- Knoll, J., (1972) Some puzzling pharmacological demonstration for monoamine oxidase inhibition. Advances in Biochemical Psychopharmacology 5: 393-408.
- Knoll J., (1989) The pharmacology of selegiline ((-) deprenyl). Acta Neurologica Scandinavica 80: 83-91.
- Konturek S., Obtulowicz W., Kwiecien N., Sito E., Mikos E., Oleksy J. (1980) Comparison of ranitidine and cimetidine in the inhibition of histamine, shamfeeding, and meal-induced gastric secretion in duodenal ulcer patients. Gut: 21: 181-186.
- Kovacova-Hanuskova E., Buday T., Gavliakova S., Plevkova J. (2015) Histamine, histamine intoxication and intolerance. Allergologia et Immunopathologia 43: 498-506.
- Kuefner M., Schwelberger H., Weidenhiller M., Hahn E., Raithel M. (2004) Both catabolic pathways of histamine via histamine-N-methyltransferase and diamine oxidase are diminished in the colonic mucosa of patients with food allergy. Inflammation Research 53: 31-32.
- Kuefner M.A., Schwelberger H.G., Hahn E.G., Raithel M. (2008) Decreased histamine catabolism in the colonic mucosa of patients with colonic adenoma. Digestive Diseases and Sciences 53: 436-442.
- Kuenzig M.E., Benchimol E.I., Lee L., Targownik L.E., Singh H., Kaplan G.G., Bernstein C.N., Bitton A., Nguyen G.C., Lee K. (2019) The impact of inflammatory bowel disease in Canada 2018: Direct costs and health services utilization. Journal of the Canadian Association of Gastroenterology 2: 17-33.
- Kusche J., Biegański T., Hesterberg R., Stahlknecht C.-D., Feussner K.-D., Stahlenberg I., Lorenz W. (1980) The influence of carcinoma growth on diamine oxidase activity in human gastrointestinal tract. Agents and Actions 10: 110-113.

- Landete J.M., Ferrer S., Polo L., Pardo I. (2005) Biogenic amines in wines from three Spanish regions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 1119-1124.
- Largeron M. (2017) Aerobic catalytic systems inspired by copper amine oxidases: recent developments and synthetic applications. Organic & Biomolecular Chemistry 15: 4722-4730.
- Latek D., Modzelewska A., Trzaskowski B., Palczewski K., Filipek S. (2012) G protein-coupled receptors-recent advances. Acta Biochimica Polonica 59: 515-529.
- Laurenzi M., Tipping A.J., Marcus S.E., Knox P.J., Federico R., Angelini R., McPherson M.J. (2001) Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. Planta 214: 37-45.
- Lavizzari T., Veciana-Nogués M.T., Weingart O., Bover-Cid S., Mariné-Font A., Vidal-Carou M.C. (2007) Occurrence of biogenic amines and polyamines in spinach and changes during storage under refrigeration. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 9514-9519.
- Le Ferrec E., Chesne C., Artusson P., Brayden D., Fabre G., Gires P., Guillou F., Rousset M., Rubas W., Scarino M.L. (2001) *In vitro* models of the intestinal barrier: the report and recommendations of ECVAM workshop 46. Alternatives to Laboratory Animals 29: 649-668.
- Le T.C., Mateescu M.A., Ahmadifar S., Marcocci L., Pietrangeli P. (2018) Zymographic determination of intrinsic specific activity of oxidases in the presence of interfering proteins. Protein gel detection and imaging. Springer 1853: 207-221.
- Lee K.N., Lee O.Y. (2016) The role of mast cells in irritable bowel syndrome. Gastroenterology Research and Practice 2016: 2031480-2031492.
- Lewinsohn R., Böhm K.-H., Glover V., Sandler M. (1978) A benzylamine oxidase distinct from monoamine oxidase B-widespread distribution in man and rat. Biochemical Pharmacology 27: 1857-1863.

- Lewis R.S. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. Annual Review of Immunology 19: 497-521.
- Li M., Binda C., Mattevi A., Edmondson D.E. (2006) Functional role of the "aromatic cage" in human monoamine oxidase B: structures and catalytic properties of Tyr435 mutant proteins. Biochemistry 45: 4775-4784.
- Lizcano J.M., Tipton K.F., Unzeta M. (2000) Time-dependent activation of the semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) from ox lung microsomes. Biochemical Journal 351: 789-794.
- Lockwood J.M., Wilkins B.W., Halliwill J.R. (2005) H1 receptor-mediated vasodilatation contributes to postexercise hypotension. The Journal of Physiology 563: 633-642.
- Luk G.D., Bayless T.M., Baylin S.B. (1980 Diamine oxidase (histaminase). A circulating marker for rat intestinal mucosal maturation and integrity. The Journal of Clinical Investigation 66: 66-70.
- MacGlashan, D. (2003) Histamine: a mediator of inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology 112: 53-59.
- Madejska A., Michalski M., Pawul-Gruba M., Osek J. (2018) Histamine content in rennet ripening cheeses during storage at different temperatures and times. Journal of Veterinary Research 62: 65-69.
- Maintz L., Novak N. (2007) Histamine and histamine intolerance. The American Journal of Clinical Nutrition 85: 1185-1196.
- Makabe-Kobayashi Y., Hori Y., Adachi T., Ishigaki-Suzuki S., Kikuchi Y., Kagaya Y., Shirato K., Nagy A., Ujike A., Takai T. (2002) The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. Journal of Allergy and Clinical Immunology 110: 298-303.
- Mann R.D., Ferner R., Pearce G.L., Dunn N., Shakir S. (2000) Sedation with "nonsedating" antihistamines: four prescription-event monitoring studies in general

practice commentary: Reporting of adverse events is worth the effort. British Medical Journal 320: 1184-1187.

- Manzotti G., Breda D. Di Gioacchino M., Burastero S. (2016) Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. International Journal of Immunopathology and Pharmacology 29: 105-111.
- Marianayagam N.J., Sunde M., Matthews J.M. (2004) The power of two: protein dimerization in biology. Trends in Biochemical Sciences 29: 618-625.
- Masini E., Bani D., Marzocca C., Mateescu M.A., Mannaioni P.F., Federico R., Mondovi B. (2007) Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. The Scientific World Journal 7: 888-902.
- Masini E., Vannacci A., Giannini L., Befani O., Nistri S., Mateescu M.A., Mannaioni P.F., Mondovì B., Federico R. (2004) Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. European Journal of Pharmacology 502: 253-264.
- Masini E., Vannacci A., Marzocca C., Mannaioni P.F., Befani O., Federico R., Toma A., Mondovi B. (2002) A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. Biochemical and Biophysical Research Communications 296: 840-846.
- Mateescu M.A., Koudoufio M.D., Neree A.T., Mondovì 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., Nadeau R. (2009) 16 copper amine oxidases as antioxidant and cardioprotective agents. Boca Raton: CRC Press p. 253-260,
- McGrath A.P., Hilmer K.M., Collyer C.A., Shepard E.M., Elmore B.O., Brown D.E., Dooley D.M., Guss J.M. (2009) Structure and inhibition of human diamine oxidase. Biochemistry 48: 9810-9822.

- McIntire, W.S., Hartmann, C. (1993) Copper-containing amine oxidases. New York: Marcel Dekker p. 97–171.
- Meunier V., Bourrie M., Berger Y., Fabre G. (1995) The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. Cell Biology and Toxicology 11: 187-194.
- Michelson, A., Puget, K., Durosay, P., Rousselet, A., (1980) Penetration of erythrocytes by su- peroxide dismutase. New York: Elsevier p. 348-366
- Mizuguchi H., Imamura I., Takemura M., Fukui H. (1994) Purification and characterization of diamine oxidase (histaminase) from rat small intestine. The Journal of Biochemistry 116: 631-635.
- Mondovi B., Costa M., Agrò A.F., Rotilio G. (1967) Pyridoxal phosphate as a prosthetic group of pig kidney diamine oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics 119: 373-381.
- Mondovì, B. (1994) Biological role and reactivity of TPQ containing amine oxidases. In: Marino G., Sannia G., Bossa F. (eds) DOI:10.1007/978-3-0348-7393-2_38
- Mondovi B., Fogel W.A., Federico R., Calinescu C., Mateescu M.A., Rosa A.C., Masini E., (2013) Effects of amine oxidases in allergic and histamine-mediated conditions. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery 7: 20-34.
- Morrow J.D., Margolies G.R., Rowland J., Roberts L.J. (1991) Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning. New England Journal of Medicine 324: 716-720.
- Mu J.-Z., Fallon R.J., Swanson P.E., Carroll S.B., Danaher M., Alpers D.H. (1994) Expression of an endogenous asialoglycoprotein receptor in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research 1222, 483-491.
- Mu D., Janes S., Smith A., Brown D., Dooley D., Klinman J. (1992) Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. Journal of Biological Chemistry 267: 7979-7982.

- Murch S. (2006) Allergy and intestinal dysmotility-evidence of genuine causal linkage? Current Opinion in Gastroenterology 22: 664-668.
- Mure M., Mills S.A., Klinman J.P. (2002) Catalytic mechanism of the topa quinone containing copper amine oxidases. Biochemistry 41: 9269-9278.
- Murthy K.S. (2006) Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. Annual Review of Physiology 68: 345-374.
- Narkthewan P., Makkapan W., (2020) Determination of histamine-forming bacteria, total coliform and escherichia coli in fermented foods. International Journal 19: 69-74.
- Natoli M., Leoni B.D., D'Agnano I., Zucco F., Felsani A. (2012) Good Caco-2 cell culture practices. Toxicology *In Vitro* 26: 1243-1246.
- Neree A.T., Pietrangeli P., Szabo P.I., Mateescu M.A., 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.
- Neree A.T., Soret R., Marcocci L., Pietrangeli P., Pilon N., Mateescu M.A. (2020) Vegetal diamine oxidase alleviates histamine-induced contraction of colonic muscles. Scientific Reports 10: 21563-215761.
- Neumann D., Schneider E.H., Seifert R. (2014) Analysis of histamine receptor knockout mice in models of inflammation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 348: 2-11.
- Noguchi K., Ishida J., Kim J.-D., Muromachi N., Kako K., Mizukami H., Lu W., Ishimaru T., Kawasaki S., Kaneko S. (2020) Histamine receptor agonist alleviates severe cardiorenal damages by eliciting anti-inflammatory programming. Proceedings of the National Academy of Sciences 117: 3150-3156.
- Nolte H., Spjeldnæs N., Kruse A., Windelborg B. (1990) Histamine release from gut mast cells from patients with inflammatory bowel diseases. Gut 31: 791-794.

- Nugent S., Kumar D., Rampton D., Evans D. (2001) Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. Gut 48: 571-577.
- O'Mahony L., Akdis M., Akdis C.A. (2011) Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. Journal of Allergy and Clinical Immunology 128: 1153-1162.
- Padiglia A., Cogoni A., Floris G., (1991) Characterization of amine oxidases from *Pisum, Lens, Lathyrus* and *Cicer*. Phytochemistry 30: 3895-3897.
- Palmer A.E., Tsien R.Y. (2006) Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. Nature Protocols 1: 1057-1065.
- Paul L., Ueland P.M., Selhub J. (2013) Mechanistic perspective on the relationship between pyridoxal 5'-phosphate and inflammation. Nutrition Reviews 71: 239-244.
- Perrino B.A. (2016) Calcium sensitization mechanisms in gastrointestinal smooth muscles. Journal of Neurogastroenterology and Motility 22: 213.
- Pietrangeli P., Bellelli A., Fattibene P., Mondovi B., Morpurgo L. (2012) *Lathyrus cicera* copper amine oxidase reactions with tryptamine. Journal of Inorganic Biochemistry 109: 33-39.
- Pietrangeli P., Federico R., Mondovì B., Morpurgo L. (2007) Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. Journal of Inorganic Biochemistry 101: 997-1004.
- Pietrangeli P., Seguella L., Annunziata G., Casano F., Capuano R., Pesce M., De Conno B., Gigli S., Sarnelli G., Pesce M. (2019) *Lathyrus sativus* diamine oxidase counteracts histamine-induced cell proliferation, migration and proangiogenic mediators release in human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. Phytotherapy Research 33: 1878-1887.
- Pino-Ángeles A., Reyes-Palomares A., Melgarejo E., Sánchez-Jiménez F. (2012) Histamine: an undercover agent in multiple rare diseases? Journal of Cellular and Molecular Medicine 16: 1947-1960.

- Popielski L. (1920) β-Imidazolylathyamin ind die organextracte erster teil. Pflügers Archiv 178: 214-236.
- Prieto P., (2002) Barriers, nephrotoxicology and chronic testing *in vitro*. Alternatives to Laboratory Animals 30: 101-105.
- Pugin B., Barcik W., Westermann P., Heider A., Wawrzyniak M., Helling, P., Akdis C.A., O'Mahony L. (2017) A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. Microbial Ecology in Health and Disease 28: 1353881-1353891.
- Pulkoski-Gross M.J., Donaldson J.C., Obeid L.M. (2015) Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 50: 298-313.
- Read N., Cammack J., Edwards C., Holgate A., Cann P., Brown C. (1982) Is the transit time of a meal through the small intestine related to the rate at which it leaves the stomach? Gut 23: 824-828.
- Reese I. (2018) Nutrition therapy for adverse reactions to histamine in food and beverages. Allergologie Select 2: 56-61.
- Rocchi A., Benchimol E.I., Bernstein C.N., Bitton A., Feagan B., Panaccione R., Glasgow K.W., Fernandes A., Ghosh S. (2012) Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology 26: 811-817.
- Ruggiero C.E., Smith J.A., Tanizawa K., Dooley D.M. (1997) Mechanistic studies of topa quinone biogenesis in phenylethylamine oxidase. Biochemistry 36: 1953-1959.
- Sacks J., Ivy A., Burgess J., Vandolah J. (1932) Histamine as the hormone for gastric secretion. American Journal of Physiology-Legacy Content 101: 331-338.
- Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M., Stammati A., Zucco F. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and

culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biology and Toxicology 21: 1-26.

- Sander L.E., Lorentz A., Sellge G., Coeffier M., Neipp M., Veres T., Frieling T., Meier P.N., Manns M.P., Bischoff S.C. (2006) Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. Gut 55: 498-504.
- Sattler J., Lorenz W. (1990) Intestinal diamine oxidases and enteral-induced histaminosis: studies on three prognostic variables in an epidemiological model. Amine oxidases and their impact on neurobiology. Springer 32: 291-314.
- Sasiak K., Kierska D., Bogusławski M., Maśliński C. (1975) Phosphopyridoxal complexes with histamine and histidine (3) the influence of presumed complex on activity of rat intestinal histaminase. Agents and Actions 5: 25-30.
- Saslak, K., Kierska, D., Maśliński, C. 1977. Phosphopyridoxal complexes with histamine and histidine (5) the kinetics of cyclic compound formation between histamine and pyridoxal-5'-phosphate in the presence of pig kidney diamine oxidase and rat intestinal histaminase. Agents and Actions 7: 19-25.
- Sattler J., Häfner D., Klotter H.-J., Lorenz W., Wagner P. (1988) Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). Agents and Actions 23: 361-365.
- Schiller C., Fröhlich C.P., Giessmann T., Siegmund W., Mönnikes H., Hosten N., Weitschies W. (2005) Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 22: 971-979.
- Schnedl W.J., Lackner S., Enko D., Schenk M., Holasek S.J., Mangge H. (2019) Evaluation of symptoms and symptom combinations in histamine intolerance. Intestinal Research 17: 427-433.
- Schwelberger H. (2006) Origins of plasma amine oxidases in different mammalian species. Inflammation Research 55: 57-58.

- Schwelberger H. (2007) The origin of mammalian plasma amine oxidases. Journal of Neural Transmission 114: 757-762.
- Seiler N. (1995) Polyamine oxidase, properties and functions. Progress in Brain Research 106: 333-344.
- Selhub J., Byun A., Liu Z., Mason J.B., Bronson R.T., Crott J.W. (2013) Dietary vitamin B6 intake modulates colonic inflammation in the IL10^{-/-} model of inflammatory bowel disease. The Journal of Nutritional Biochemistry 24: 2138-2143.
- Sethi A., Wordinger R.J., Clark A.F. (2012) Focus on molecules: lysyl oxidase. Experimental Eye Research 104: 97-98.
- Shahid M., Tripathi T., Sobia F., Moin S., Siddiqui M., Khan R.A. (2009) Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an updated systematic review. The Open Immunology Journal 2: 9-41.
- Shimoji K., Isono E., Bakke M. (2020) Modified enzymatic assays for the determination of histamine in fermented foods. Journal of Food Protection 83: 1430-1437.
- Smolinska S., Jutel M., Crameri R., O'mahony L. (2014) Histamine and gut mucosal immune regulation. Allergy 69: 273-281.
- Springuel P., Vu D. (2002) Convulsions with newer-generation antihistamines. WHO Drug Information 16: 287-288.
- Sullivan P. (1999) Food allergy and food intolerance in childhood. Indian Journal of Pediatrics 66: 37-45.
- Sun J., Hoying J.B., Deymier P.A., Zhang D.D., Wong P.K. (2016) Cellular architecture regulates collective calcium signaling and cell contractility. PLoS Computational Biology 12: 1004955-1004975.

- Soret R., Schneider S., Bernas G., Christophers B., Souchkova O., Charrier B., Righini-Grunder F., Aspirot A., Landry M., Kembel S.W. (2020) Glial cellderived neurotrophic factor induces enteric neurogenesis and improves colon structure and function in mouse models of hirschsprung disease. Gastroenterology 159: 1824-1838.
- Tatarkiewicz J., Rzodkiewicz P., Żochowska M., Staniszewska A., Bujalska-Zadrożny M. (2019) New antihistamines–perspectives in the treatment of some allergic and inflammatory disorders. Archives of Medical Science 15: 537-553.
- Tavladoraki P., Schininà M.E., Cecconi F., Di Agostino S., Manera F., Rea G., Mariottini P., Federico R., Angelini R. (1998) Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. FEBS Letters 426: 62-66.
- Thangam E.B., Jemima E.A., Singh H., Baig M.S., Khan M., Mathias C.B., Church M.K., Saluja R. (2018) The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: the hunt for new therapeutic targets. Frontiers in immunology 9: 1873-1882.
- Thomas H. (2016) Probiotics for IBD: a need for histamine? Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 13: 62-63.
- Tidmarsh C. (1932) The action of histamine on the motility of the large intestine. Quarterly Journal of Experimental Physiology 22: 33-43.
- Timothy F., René B. (2017) USP 40 NF35: United States Pharmacopeia and National Formulary. supplement 2. United States Pharmacopeial Convention.
- Turpin W., Lee S.-H., Garay J.A.R., Madsen K.L., Meddings J.B., Bedrani L., Power N., Espin-Garcia O., Xu W., Smith M.I. (2020) Increased intestinal permeability is associated with later development of crohn's disease. Gastroenterology 159: 2092-2100.
- Trzaskowski B., Latek D., Yuan S., Ghoshdastider U., Debinski A., Filipek S. (2012) Action of molecular switches in GPCRs-theoretical and experimental studies. Current Medicinal Chemistry 19: 1090-1109.

- Ueland P.M., McCann A., Midttun Ø., Ulvik A. (2017) Inflammation, vitamin B6 and related pathways. Molecular Aspects of Medicine 53: 10-27
- Van Beers E.H., Al R.H., Rings E.H., Einerhand A.W., Dekker J., Büller H. (1995) Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. Biochemical Journal 308: 769-775.
- Waldbott G.L. (1947) The antihistaminic drugs. Journal of the American Medical Association 135: 207-209.
- Waldum H., Sandvik A., Brenna E., Petersen H. (1991) Gastrin-histamine sequence in the regulation of gastric acid secretion. Gut 32: 698-701.
- Wang X., Pietrangeli P., Mateescu M.A., Mondovi B. (1996) Extended substrate specificity of serum amine oxidase: possible involvement in protein posttranslational modification. Biochemical and Biophysical Research Communications 223: 91-97.
- Wantke F., Götz M., Jarisch R. (1994) The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model for food intolerance. Allergy and Asthma Proceedings 15: 27-32.
- Wilken J.A., Daly A.F., Sullivan C.L., Kim H. (2006) Desloratadine for allergic rhinitis. Expert Review of Clinical Immunology 2: 209-224.
- Wertz D.L., Klinman J.P. (2011) Eukaryotic copper amine oxidases. Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry 2006: 1-15.
- Wierenga R.K., Drenth J., Schulz G.E., Huber R. (1983) Comparison of the threedimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of phydroxybenzoate hydroxylase with the FAD-as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. Journal of Molecular Biology 167: 725-739.
- Wills-Karp M. (2017) Histamine-releasing factor: a promising therapeutic target for food allergy. The Journal of Clinical Investigation 127: 4238-4241.

- Wu F., Yu J., Gehring H. (2008) Inhibitory and structural studies of novel coenzymesubstrate analogs of human histidine decarboxylase. The FASEB Journal 22: 890-897.
- Yu Y., Wang P., Bian L., Hong S. (2018) Rare death via histamine poisoning following crab consumption: a case report. Journal of Forensic Sciences 63: 980-982.
- Zhou S., Huang G. (2020) Synthesis of anti-allergic drugs. RSC Advances 10: 5874-5885.
- Zimatkin S.M., Anichtchik O.V. (1999) Alcohol-histamine interactions. Alcohol and Alcoholism 34: 141-147.
- Zouiten-Mekki L., Serghini M., Fekih M., Kallel L., Matri S., Mustapha N.B., Boubaker J., Filali A. (2013) Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Médecine /Sciences 29: 1145-1150.
- Zucco F., Batto A.-F., Bises G., Chambaz J., Chiusolo A., Consalvo R., Cross H., Dal Negro G., De Angelis I., Fabre G. (2005) An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. Alternatives to laboratory animals 33: 603-618.