

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA DIAMINE OXYDASE VÉGÉTALE: ASPECTS ANALYTIQUES ET  
PRÉPARATIFS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

PAUL MORRISON CHOMDOM KOUNGA

JUILLET 2022

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Cette merveilleuse aventure n'aurait pas été possible sans le support et l'opportunité offerte par mon directeur de recherche Pr Mircea Alexandru Mateescu. Il restera à jamais pour moi un modèle de persévérance, de bonté et de dévouement. Je n'aurais pu effectuer cet immense travail sans sa patience, ses conseils et sa confiance en mes capacités.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à la Dre Pompillia Ispas-Szabo pour sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard. Par la même occasion, je profite pour remercier la Pre Lucia Marcocci et la Dre Paola Pietrangeli de l'Université de Rome «Sapienza» en Italie pour les nombreux échanges ayant contribué à nourrir ma curiosité intellectuelle.

Je remercie très profondément les membres du comité d'évaluation, Pr David Dewez et Pr Laurent Cappadocia, pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Un chaleureux remerciement à la Fondation Courtois pour tout l'appui qui a permis l'avancement du projet depuis plusieurs années.

Dans le cadre des collaborations avec le CNETE (Centre National en Électrochimie et en Technologies Environnementales), j'ai particulièrement apprécié travailler avec Joshua Cloutier-Beaupré, Mohamed Rahni et leur équipe. Je voudrais les remercier pour les nombreuses discussions utiles.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Armelle Tchoumi de m'avoir épaulé tout au long de ma maîtrise. Merci Armelle, d'avoir facilité mon intégration dans le monde de la recherche, pour tes conseils et pour l'aide que tu m'as apportée dans la réalisation de ce travail.

Je ne manquerais pas de remercier toute notre équipe pour l'ambiance familiale qui régnait dans le laboratoire, pour les fous rires que nous avons partagés et nos anniversaires célébrés. Merci à mes amis et collègues Ali, Farzaneh, Marc-André, Mariela, Rimaz, Rym, Salma. Merci Meriem, pour ta présence et nos belles séances de motivation.

Je remercie également le regroupement stratégique CRIPA/FRQNT, la Fondation Courtois et la Faculté des sciences de l'UQAM pour des bourses d'études qui m'ont soutenue financièrement tout au long de ma maîtrise. Je profite de cette occasion pour adresser mes profonds remerciements aux responsables et aux personnels de l'Université du Québec à Montréal.

Du plus profond de mon cœur, je souhaite remercier chaleureusement tous les membres de ma famille qui m'ont soutenue depuis le début, et qui ont été très présents malgré la distance. Un grand merci aussi à tous mes amis qui ont toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Mention honorable à Deblaiso Kamdem, pour nos nombreuses et précieuses soirées à la bibliothèque dans la joie et la bonne humeur. J'ai adoré nos longues heures d'études ensemble.

J'aimerais remercier mon amoureuse, Joyce Nouteji, pour sa bonté, son soutien moral, ses encouragements, et sa présence, particulièrement dans les moments difficiles.

Pour finir, je tiens encore à remercier les personnes formidables que je n'ai pas citées et qui, de près ou de loin, ont contribué à de petites joies durant ma maîtrise.

## DÉDICACE

Je pense à mes grands-parents que j'aime  
profondément,

Vous m'avez toujours encouragé de façon  
inconditionnelle,

À mes chers parents,  
Merci de votre belle éducation,

À mes oncles et tantes,  
Merci d'être mes modèles de réussite,

Sans vous tous je ne serais pas venu au Québec,  
Merci de votre amour sans limites,

Je vous dédie mon mémoire pour tous vos efforts et sacrifices.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	xi
RÉSUMÉ .....	xiii
CHAPITRE I : INTRODUCTION .....	1
1.1 Étude critique de la littérature sur les diamines oxydases .....	1
1.1.1 Introduction.....	1
1.1.2 Quelques généralités sur les enzymes de type oxydases .....	2
1.1.3 Classification des amines oxydases .....	4
1.1.4 Le métabolisme de l’histamine et ses effets (« <i>Amis ou Ennemis</i> »).....	14
1.1.5 La diamine oxydase (DAO) végétale comme alternative thérapeutique à la prise d’antihistaminique .....	22
1.2 Techniques de séparation et de dosage des amines oxydases .....	24
1.2.1 Extraction et solubilisation des amines oxydases .....	24
1.2.2 Techniques de séparation chromatographique des amines oxydases .....	26
1.2.3 Les méthodes de dosage des amines oxydases .....	33
1.2.4 Méthodes oxymétriques .....	37
1.2.5 Les méthodes radiométriques .....	37
1.2.6 Méthodes zymographiques .....	38
1.3 Généralités sur la glucose oxydase et ses applications.....	39
1.4 Présentation du projet de maîtrise .....	40

CHAPITRE II	ARTICLE: « FASTER AND SENSITIVE ZYMOGRAPHIC DETECTION OF OXIDASES GENERATING HYDROGEN PEROXIDE. THE CASE OF DIAMINE OXIDASE ».....	46
2.1	Résumé .....	48
2.2	Abstract .....	48
2.3	Introduction .....	49
2.4	Materials and methods.....	52
2.4.1	Materials .....	52
2.4.2	Characterization of DAO for zymography .....	52
2.4.3	Zymographic detection of DAO activity on polyacrylamide gels .....	54
2.4.4	Assessment of the protein patterns of PAA gels after zymography .....	54
2.5	Results and discussion.....	55
2.6	Appendices - Supplementary Data .....	60
2.7	Acknowledgements .....	62
CHAPITRE III	ARTICLE: « ENRICHMENT OF VEGETAL DIAMINE OXIDASE BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OR BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY. A COMPARATIVE STUDY ».....	63
3.1	Résumé .....	65
3.2	Abstract .....	65
3.3	Introduction .....	66
3.4	Experimental .....	69
3.4.1	Materials .....	69
3.4.2	Methods .....	69

3.5 Results and discussion: comparative data on DAO enriched using YMC BioPro s75 and Con A Sepharose® 4B.....	73
CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE .....	80
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	87
ANNEXE A : EFFET DE LA CONCANAVALINE A SUR L'ACTIVITÉ DE LA DAO .....	89
ANNEXE B : EFFET DU PLP SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA DAO .....	90
BIBLIOGRAPHIE.....	93

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Mécanisme d'action des MAO.....	7
Figure 1.2 Processus de synthèse et d'interconversion des polyamines. ....	9
Figure 1.3 Site actif de l'amine oxydase à Cuivre d' <i>E. coli</i> . ....	12
Figure 1.4 Classification des amine oxydases à Cuivre.....	13
Figure 1.5 Synthèse de l'histamine.....	15
Figure 1.6 Voies de transduction du signal des récepteurs d'histamine H1-H4.....	16
Figure 1.7 Symptômes médiés par l'histamine selon le récepteur impliqué .....	20
Figure 1.8 Métabolisme de l'histamine. ....	21
Figure 1.9 Principales techniques de séparation chromatographique de la DAO.....	32
Figure 1.10 Exemple de dosage fluorimétrique de la DAO.....	35
Figure 1.11 Exemple de dosage de la DAO par spectrophotométrie.....	37
Figure 1.12 Dosage de la DAO par zymographie. ....	39
Figure 1.13 Présentation schématique des différents volets du projet de maîtrise. ....	43
Figure 1.14 Extraction et séparation de la DAO sur des colonnes chromatographiques. ....	44
Figure 1.15 Détermination de l'activité de la DAO par zymographie.....	45
Figure 2.1 Detection of DAO activity with <i>o</i> -PDA or DCHBS-AAP method. ....	58
Figure 2.2 Detection of GoX activity with <i>o</i> -PDA or DCHBS-AAP method. ....	59

Figure 2.3 Electrophoretic pattern of DAO (0–2 µg/well) on non-resolving PAA gel.....	60
Figure 2.4 Images analysis of DAO zymography gel.....	61
Figure 2.5 Images analysis of GoX zymography gel.....	61
Figure 3.1 Chromatogram of purified DAO using BioPro s75 (A) and using Con A Sepharose 4B column (B). .....	74
Figure 3.2 The retention of DAO on chromatographic columns. ....	75
Figure 3.3 Zymography of purified DAO .....	78
Figure 3.4 SDS-PAGE electrophoresis of the purified DAO .....	78
Figure 4.1 Activité du complexe lectine:enzyme.....	89
Figure 4.2 Analyse de l'activité DAO en fonction de la concentration de PLP. ....	91

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1.1 Classification des amines oxydases.....	4
Tableau 1.2 Caractéristiques des récepteurs de l'histamine (H1-H4). ....	17
Tableau 3.1 Purification of DAO by ion exchange chromatography on YMC BioPro s75 anionic resin. ....	76
Tableau 3.2 Purification of DAO by affinity chromatography on Con A Sepharose resin. ....	76

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AAP	4-Aminoantipyrine
AO	Amine Oxydase
APS	Ammonium persulfate
Asn	Asparagine
BSA	Albumine de sérum bovin
Cu-AO	Amine Oxydase à Cuivre
Con A	Concanavaline A
DAO	Diamine Oxydase
DCHBS	Acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonique
EC	Enzyme Commission
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAD-AO	Amine Oxydase à Flavine Adénine Dinucléotide
GoX	Glucose Oxydase
H	Récepteur histaminique
HRP	Horseradish peroxidase
HDC	Histidine Décarboxylase
HNMT	Histamine N-méthyltransférase
LO	Lysyl Oxydase
MAO	Monoamine Oxydase

<i>o</i> -PDA	Ortho-phénylènediamine
PAA	Polyacrylamide
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAO	Polyamine Oxydase
PBS	Tampon Phosphate Salin
pkDAO	Diamine Oxydase de rein de porc
PLP	Pyridoxal-5'-phosphate
PsDAO	Diamine oxydase provenant du <i>Pisum sativum</i>
SAO	Amine Oxydase sérique
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSAO	Amine oxydase sensible aux sémi-carbazides
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthylphénylènediamine
TPQ	2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone
VAP-1	Protéine d'adhésion vasculaire -1

## RÉSUMÉ

Les oxydases sont des enzymes impliquées dans divers processus métaboliques et biologiques tels que la respiration cellulaire, la détoxification cellulaire, la lutte anti-infectieuse, etc. La diamine oxydase (DAO, EC 1.4.3.22) est une oxydase à Cuivre catalysant la désamination des amines biogènes à l'exemple de la putrescine, la cadavérine et l'histamine. La DAO végétale a été proposée comme agent thérapeutique visant à traiter les histaminoses alimentaires et des dysfonctions entériques liées à l'excès d'histamine. Des travaux précédents de formulation de l'enzyme DAO associée à la catalase en comprimé monolithique, ont montré le potentiel thérapeutique et prometteur du comprimé bi-enzymatique sur le catabolisme de l'histamine. Cette approche thérapeutique représente une grande avancée du fait de son acceptabilité, sa meilleure affinité pour l'histamine et son activité plus élevée contrairement à son homologue commercial d'origine animale. Bien que des formes pharmaceutiques ont été formulées pour la libération intestinale de l'enzyme, le faible rendement de production avec les méthodes conventionnelles de purification rend difficile son accessibilité pour commercialisation. Un des points importants de ce projet de maîtrise était l'évaluation et la détermination de la DAO par zymographie. Parmi les points saillants, nous avons montré que: la méthode de zymographie avec le 3,5-dichloro-2-hydroxybenzènesulfonate (DCHBS) et la 4-amino-antipyrine (AAP) est plus sensible que celle avec l'*o*-phénylènediamine (*o*-PDA) pour la détection du DAO; elle s'applique également pour la détermination d'autres oxydases, même en présence de catalase. Également, la méthode proposée avec du DCHBS-AAP est moins nocive pour l'environnement. Les procédés de purification existants impliquent plusieurs étapes, donnent de faibles rendements et restent difficilement applicables à l'échelle industrielle. Face à ces limitations, ce projet se donnait pour autre objectif de: développer de nouvelles approches d'extraction et de purification de l'enzyme par chromatographie échangeuse d'ions et par chromatographie d'affinité dans un premier temps; puis, d'évaluer le comportement de la DAO sur chacun des matériaux chromatographiques dans un second temps. Les activités oxydasiques et l'intégrité de l'enzyme ont servi des paramètres de contrôle (évalués par spectrophotométrie et par zymographie) tout au long des processus d'extraction et purification. Les résultats obtenus ont montré des capacités de rétention comparable pour chaque colonne chromatographique. De plus, les procédés de séparation se sont avérés simples, rapides et rentables.

Mots clés: Concanavoline A, Diamine oxydase végétale, Histamine, Intolérance alimentaire, Peroxydase, Zymographie.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Étude critique de la littérature sur les diamines oxydases

##### 1.1.1 Introduction

Les oxydases sont des enzymes catalysant les réactions d'oxydo-réductions impliquant une molécule de dioxygène comme accepteur d'électron (on parle également de réactions d'oxydation). Les amines oxydases (AOs) sont des oxydases présentes dans tous les organismes vivants procaryotes et eucaryotes et elles catalysent la désamination oxydative des amines biogènes avec la formation des aldéhydes respectifs, du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniac selon les équations :



Équation 1 : Désamination oxydative des amines. L'amine primaire est oxydée en aldéhyde correspondant (1) et l'amine secondaire est oxydée en cétone (exclusif aux amines oxydases à FAD [Binda *et al.*, 2002]) correspondant (2) avec production concomitante d'ammoniac et de peroxyde d'hydrogène.

Sur la base du cofacteur redox impliqué dans le mécanisme catalytique (Befani *et al.*, 1989; Floris et Mondovì, 2009), on distingue les amines oxydases à FAD (EC 1.4.3.4.

FAD-AOs : monoamines oxydases [MAO] mitochondriale et polyamine oxydase [PAO] cytosolique) et celles ayant du Cuivre (Cu-AOs) et un autre groupe prosthétique identifié comme étant le 2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (TPQ). Toutes les Cu-AOs sont sensibles à la sémicarbazide mais une enzyme particulière de ce groupe est nommée amine oxydase sensible à la semicarbazide (SSAO/VAP-1, EC 1.4.3.6). Ajouté à cette dernière, nous avons la diamine oxydase (EC 1.4.3.22), la sérum amine oxydase (EC 1.4.3.21) et la lysyl oxydase (EC 1.4.3.13) (Mondovì et Finazzi Agrò, 1982; Pietrangeli *et al.*, 2007; Salmi et Jalkanen, 2019). Les 4 numéros qui caractérisent une enzyme selon l'EC sont : la classe, la sous-classe, la sous sous-classe et le numéro de chacune des enzymes du groupe mentionné. Les amines oxydases font parties de la classe des oxydases (1) et de la sous-classe 4. Toutes ces enzymes diffèrent par leur mécanisme catalytique, leur localisation subcellulaire, leur structure moléculaire ou encore la nature de leur substrat respectif.

### 1.1.2 Quelques généralités sur les enzymes de type oxydases

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de réactions. En grande majorité, elles facilitent les réactions sans être altérées à la fin du processus. Cependant, il y'a des enzymes qui peuvent être inhibées par leur propre produit de réaction. Ces enzymes sont des molécules dotées d'une grande spécificité pour un type de réaction et pour le substrat. À l'exception de quelques enzymes composés d'ARN ou « ribozymes », les enzymes présentent dans leur constitution des protéines avec des successions spécifiques d'acides aminés (Cooper GM, 2000; Walter et Engelke, 2002). Elles catalysent des centaines de réactions chimiques essentielles à notre survie. Comme tous les catalyseurs, les enzymes ne se consomment pas au cours des réactions qu'elles catalysent et elles ne modifient pas l'équilibre chimique entre substrats et produits. Les enzymes diffèrent en revanche de la plupart des autres types de

catalyseurs par leur très grande spécificité qui résulte de leur structure tridimensionnelle. Plusieurs facteurs de l'environnement tels que le pH ou la température peuvent affecter l'activité des enzymes. De plus, l'activité d'une enzyme est modulée par diverses autres molécules : des inhibiteurs (ralentissent l'activité d'une enzyme) et des activateurs (accélèrent l'action de l'enzyme). Les enzymes sont impliquées dans différentes réactions métaboliques incluant la digestion des aliments, la formation et à la décomposition de l'ADN et de l'ARN, et la détoxification.

Les oxydases, les oxygénases et les déshydrogénases (toutes dans la catégorie des oxydoréductases) forment une famille d'enzymes oxydatives. Contrairement aux oxygénases et aux déshydrogénases qui ont la plupart du temps besoin de coenzymes organiques (exemple du  $\text{NAD}^+$ ) pour fonctionner, les oxydases ont besoin uniquement d'oxygène moléculaire comme accepteur d'électron pour la catalyse (Dijkman *et al.*, 2013). C'est justement cette caractéristique précieuse qui fait d'elles des outils indispensables pour des applications industriels (biocapteurs, bioréacteurs etc.). Les sources les plus importantes d'enzymes sont les tissus végétaux, des organes des animaux ou les microorganismes. Quelques applications importantes comprennent les biosenseurs enzymatiques utilisés dans les analyses cliniques ou alimentaires. Dû au fait des limitations réglementaires, l'usage des enzymes de source animale est de moins en moins répandu (Comas-Basté *et al.*, 2020). Néanmoins, la grande majorité d'enzymes animales ou végétales disponible sur le marché sont de type protéases et peuvent servir à diverses applications industrielles (agroalimentaire, textile, etc.) ou thérapeutiques; toutefois, la source d'enzymes la plus répandue reste les microorganismes (Illanes, 2008). De plus, des formulations contenant une ou plusieurs enzymes sont commercialisés sous forme de compléments alimentaires et de médicaments.

### 1.1.3 Classification des amines oxydases

D'une manière générale, le tableau 1.1 présente les différentes classes d'AOs.

Tableau 1.1 Classification des amines oxydases.

Classification des AOs en fonction du cofacteur, de la localisation et de la spécificité de substrat (Adapté d'après Pietrangeli *et al.*, 2007).

Amines oxydases (AO)	Cofacteur	Localisation	Localisation	Substrat
		tissulaire	subcellulaire	
<b>Monoamine oxydase A (FAD-MAO A)</b>	FAD	Tous les tissus Neurones cathécholaminergiques	Membranes mitochondriales externes	Noradrénaline Sérotonine Tyramine Tryptamine
<b>Monoamine oxydase B (FAD-MAO B)</b>	FAD	Neurones Cellules gliales	Membranes mitochondriales externes	Dopamine Tyramine Tryptamine Benzylamine
<b>Polyamine oxydases (FAD-PAO)</b>	FAD	Tous les tissus	cytoplasme	Spermine Spermidine
<b>Diamine oxydase (DAO)</b>	Cu, TPQ	Tissus animaux : vésicules intestinale Rein, placenta Tissus végétaux : Jeunes pousses de plantes	Membranes	Putrescine Cadaverine Histamine Spermidine Spermine
<b>Sérum Amine Oxydase (SAO)</b>	Cu, TPQ	Circulante	-	Benzylamine Spermidine Spermine
<b>Amine oxydase sensible aux sémicarbazides (SSAO/VAP-1)</b>  VAP: Vascular Adhesion Protein	Cu, TPQ	Fluides biologiques Adipocytes, placenta, rein	Membranes plasmiques	Méthylamine Aminoacétone Benzylamine Spermidine Spermine

### 1.1.3.1 Les amines oxydases à FAD

Ce groupe d'enzymes se compose principalement de monoamines oxydases d'origine mitochondriale, qui jouent un rôle essentiel pour le métabolisme des neurotransmetteurs comme la norépinephrine, la dopamine et la sérotonine du système nerveux central. Elles sont généralement localisées aussi dans le foie, les poumons, le tractus gastro-intestinal, les plaquettes sanguines et le placenta (Billett, 2004). Leurs rôles dans divers syndromes psychiatriques ont également été établis (Mondovì et Finazzi Agrò, 1982). Ces enzymes peuvent être liées au cofacteur FAD de façon covalente (c'est le cas des enzymes mitochondriales) (Edmondson et Newton-Vinson, 2001) ou de façon non covalente (cas de certaines bactéries et champignons à l'instar de *Aspergillus niger*) (Sablin *et al.*, 1998; Yagodina *et al.*, 2002). Le FAD est un cofacteur redox impliqué dans diverses réactions du mécanisme d'action de ces enzymes. Dans les systèmes biologiques, ce dernier agit comme accepteur de H<sup>+</sup> dans sa forme oxydée et comme donneur d'électrons sous sa forme réduite (FADH<sub>2</sub>). Les oxydases à FAD ont un fort pouvoir redox et interviennent dans diverses réactions dont l'oxydation des aldéhydes par l'aldéhyde oxydase ou des monoamines par les monoamines oxydases (figure 1.1).

Les monoamines oxydases à FAD (MAOs, EC 1.4.3.4) représentent la famille d'enzymes catalysant la désamination oxydative des monoamines (figure 1.1). Elles se retrouvent sur la membrane mitochondriale externes sous plusieurs formes. Chez les mammifères, deux formes différentes de MAO sont présentes dans la plupart des tissus, à savoir MAO-A et MAO-B (Abell et Kwan, 2001). Elles se différencient principalement par leur spécificité de substrat et leur sensibilité vis-à-vis d'inhibiteurs. La MAO-A exerce son activité dans les neurones cathécholaminergiques avec une préférence pour le 5-hydroxytryptamine (sérotonine), la noradrénaline, l'adrénaline et

elle est inhibée par le clorgyline tandis que la MAO-B est exprimée dans les neurones, les cellules gliales du cerveau humain et elle métabolise la tyramine, la dopamine, la benzylamine, la phényléthylamine. De plus, elle est inactivée par le deprenyl. Toutefois, l'adrénaline, la noradrénaline et la tyramine constituent des substrats communs à la MAO-A et à la MAO-B (Glover *et al.*, 1977).

Sur le plan structurel, les MAOs-FAD comprennent deux sous-unités reliées par un pont disulfure, chacun étant relié de façon covalente au cofacteur FAD (De Colibus *et al.*, 2005). Elles jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des monoamines et des catécholamines en régulant leur concentration. Elles sont également impliquées dans la détoxification, notamment par le métabolisme des monoamines alimentaires comme la dopamine, la sérotonine, la tyramine (Ilett *et al.*, 1980). Singulièrement, la MAO-A joue un rôle capital dans la protection du système nerveux central et du système nerveux périphérique contre toutes les amines issues de l'alimentation quotidienne (poisson fumé, fromage, bière, etc.). Les deux MAOs agissent aussi comme des stabilisateurs de l'humeur. En effet, les troubles de l'activité de ces dernières seraient une des causes potentielles des problèmes psychiatriques et neurologiques tels que la dépression et la maladie de Parkinson, respectivement (Checkoway *et al.*, 1998a, 1998b).

Il est indiqué que la dépression mentale est due à un déficit d'activité monoaminergique cérébrale et qu'elle serait traitée par des médicaments qui augmentent cette activité (Schildkraut, 1965). Certaines maladies occasionnées par la dégénérescence progressive des cellules nerveuses sont généralement à l'origine d'une déficience dans la synthèse de monoamines (maladie de Parkinson et d'Alzheimer) et d'une augmentation de l'activité MAO-B (Saura *et al.*, 1994). Une suractivité de la MAO-B induit le métabolisme de plusieurs neurotransmetteurs aminés générant ainsi plusieurs

produits réactionnels neurotoxiques tels que les aldéhydes réactifs et le peroxyde d'hydrogène qui contribuent au développement de la maladie d'Alzheimer (Behl *et al.*, 2021).

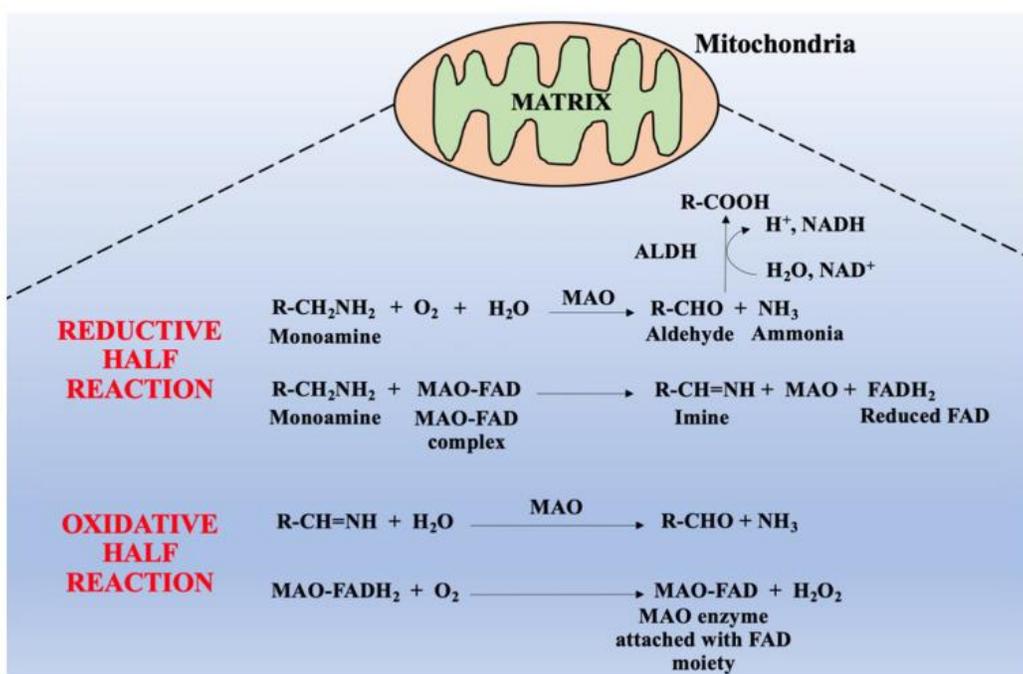


Figure 1.1 Mécanisme d'action des MAO.  
 Mécanisme de désamination des monoamines oxydases à FAD en deux étapes (d'après Behl *et al.*, 2021).

Les polyamines naturelles (putrescine, spermidine, spermine et structures apparentées) sont des métabolites omniprésents dans divers types cellulaires. Ces entités chimiques ubiquitaires jouent un rôle important dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques, la prolifération cellulaire et dans la croissance. Elles sont également

impliquées dans la réparation de la matrice extracellulaire, l'adhésion cellulaire et certains processus de signalisation cellulaire (Moinard *et al.*, 2005; Takahashi et Kakehi, 2010). Les polyamines sont formées à partir des produits de décarboxylation de l'ornithine et de la S-adénosyl-méthionine dans presque toutes les cellules eucaryotes (figure 1.2). Ces dernières sont métabolisées par une polyamine oxydase (PAO) à FAD, une enzyme présente principalement dans le règne animal et végétal (Kohlmeier, 2003; Tavladoraki *et al.*, 2012). Les polyamines oxydases à FAD sont des enzymes monomériques dont le poids moléculaire est compris entre 53 et 63 kDa.

Tout comme le mécanisme catalytique des MAO, l'oxydation des polyamines par les polyamines oxydases peut être divisée en deux demi-réactions: (i) une réduction de la flavine lors de l'oxydation des polyamines suivie de (ii) la réoxydation de la flavine par l'oxygène moléculaire (Kohlmeier, 2003). Néanmoins, contrairement à la réaction des MAO et des CuAOs/TPQ, l'oxydation des polyamines par les PAO ne libère pas d'ammoniac (Floris et Mondovì, 2009). La teneur en polyamines intracellulaires est la résultante de la régulation simultanée de leur synthèse, leur catabolisme, leur captation, leur élimination et une dérégulation des systèmes contrôlant cette homéostasie pourrait induire des effets toxiques (Seiler *et al.*, 1996). Ainsi, l'accumulation excessive de polyamines favoriserait l'apoptose et un des mécanismes responsables est le stress oxydatif généré par l'accumulation de peroxyde d'hydrogène lors du catabolisme des polyamines par la PAO (Agostinelli *et al.*, 2007; Hoet et Nemery, 2000; Seiler et Raul, 2005). Le métabolisme naturel des polyamines par la PAO se révèle donc être le principal moyen de régulation de la teneur intracellulaire en polyamines et dans la survie cellulaire.

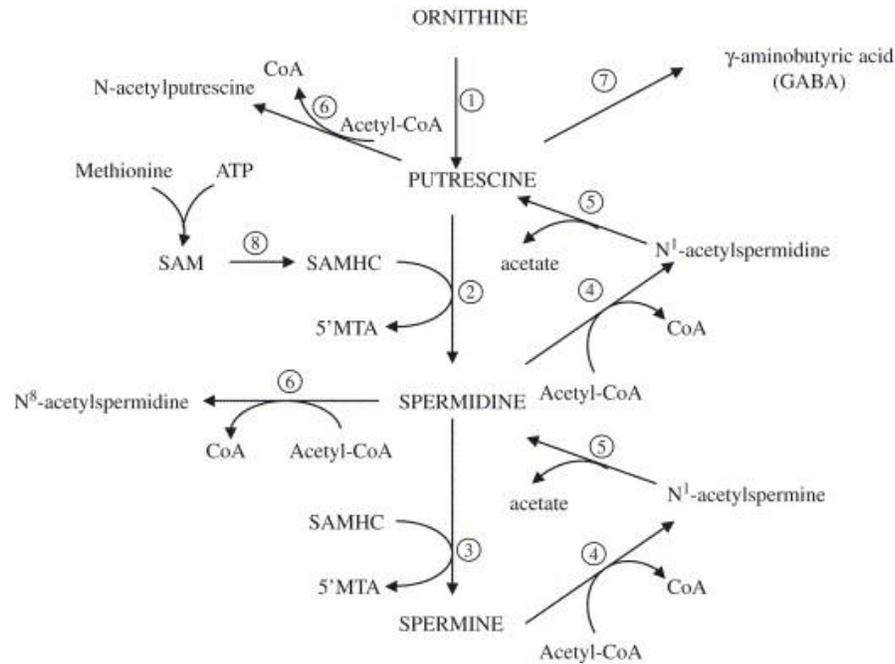


Figure 1.2 Processus de synthèse et d'interconversion des polyamines.

L'ornithine est décomposée en putrescine sous l'action de l'ornithine-décarboxylase (ODC) (1); Par la suite, la putrescine est prise en charge par la spermidine synthétase (2); La spermine est synthétisée via l'action de la spermine synthétase en présence de la spermine produite à l'étape 2 (3). La putrescine et la spermidine sont des réactifs clés dans la synthèse de dérivés aminés. L'acétylation via l'acétyl-CoA de la putrescine (6), de la spermidine (4 et 6) et de la spermine (4) va conduire à la synthèse de la N-acétylputrescine, de la N1-acétylspermidine, de la N8-acétylspermidine et de la N1-acétylspermine, respectivement. Tandis que la perte du groupement acetate par la N1-acétylspermidine et la N1-acétylspermine va conduire à la regulation de la putrescine et de la spermidine, respectivement. Toutes ces modifications post-traductionnelle dés/acétylation, décarboxylation et de transamination permettent de réguler les amines biogènes. Légende : spermidine/spermine N1-acétyltyl-transférase (SSAT); polyamine-oxydase (PAO); diamine-oxydase (DAO); S-adenosyl-méthionine (SAM); SAM-décarboxylase (SAMdc); S-adenosyl-S-méthyl homocystéamine (SAMHC); 5'-méthylthioadénosine (5'MTA) (d'après Moinard et al., 2005).

### 1.1.3.2 Les amines oxydases à Cuivre

La majorité des oxydases à Cuivre sont des métalloenzymes possédant un ou plusieurs ions métalliques dans leur structure, essentiel(s) à l'exercice de leur activité catalytique et au maintien de leur conformation tridimensionnelle. On distingue entre autres les oxydases ayant les sites mononucléaires de Cuivre (type 2), dinucléaires (type 3) ou trinucléaires (hybrides de types 2 et 3). Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  sont essentiels à l'activité des enzymes détoxifiantes (Twomey *et al.*, 2005). Les amines oxydases à Cuivre (CuAOs) sont des homodimères dont la masse moléculaire de chaque monomère est comprise entre 70-95 kDa. De plus, chaque sous-unité contient un ion Cuivre et un cofacteur 2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (TPQ) généré par la modification autocatalytique et post-traductionnelle d'un résidu de tyrosine situé au niveau du site actif (Klinman et Mu, 1994; McGuirl *et al.*, 1994). Les oxydases à Cu/TPQ (figure 1.3) catalysent la désamination oxydative des groupements amine primaire des mono-, di- et polyamines en capturant deux électrons des groupes amines pour les transférer à l'oxygène moléculaire dans le but de former l'aldéhyde correspondant, l'ammoniac et le peroxyde d'hydrogène. Ce sont des enzymes ubiquitaires qui sont exprimées chez les organismes microscopiques, chez les animaux et chez les végétaux où elles régulent les amines biogènes (Cohen, 1998).

Les amines oxydases à Cuivre (figure 1.4) se divisent généralement en 4 catégories: diamine oxydase, DAO; amine oxydase sérique, SAO; lysyl oxydase, LO; protéine d'adhésion vasculaire, VAP-1. Ces enzymes sont désignées collectivement comme amine oxydase sensible aux sémicarbazide (SSAO) en raison de leur sensibilité caractéristique et leur inhibition sélective par un composé réactif carbonyle, le sémicarbazide.

La diamine oxydase (DAO, EC 1.4.3.22) est une enzyme intracellulaire ubiquitaire retrouvée chez les microorganismes (bactéries, champignons), plantes et mammifères. Autrefois décrite comme histaminase (Best, 1929), cette enzyme à Cuivre est la principale responsable du métabolisme de l'histamine ingérée. Le dysfonctionnement ou l'absence de la DAO est associé à une intoxication à l'histamine, l'intolérance à l'histamine et le syndrome de l'intestin irritable. La DAO traduite dans différentes espèces a été purifiées et caractérisées. Dans le règne végétal, la lentille *Lens esculenta* et les pois verts *Pisum sativum* constituent la principale source de DAO végétale où cette enzyme est présente en fortes concentrations, jusqu'à 4 % du contenu protéique total (Padiglia *et al.*, 1991; Masini *et al.*, 2007). Chez les mammifères, les plus utilisées pour lutter contre l'intolérance à l'histamine sont celles des reins ou intestins de porc ainsi celle du placenta humain (Schwelberger et Bodner, 1997). Au niveau de la spécificité de substrat, les DAO ont une préférence pour les groupes aliphatiques courts comme la putrescine (1,4 diaminobutane), la cadavérine (1,5 diaminopentane) ou l'histamine et une affinité faible pour la spermine et la spermidine (Buffoni, 1966; Buffoni et Ignesti, 2000). Selon la source de provenance, la DAO exerce diverses fonctions. Les bactéries et les levures utilisent des amines comme sources d'azote et de carbone par une réaction catalysée par l'amine oxydase. Chez les plantes, la DAO participe à la croissance et la prolifération cellulaire en régulant les taux intracellulaires de di- et polyamines et les aldéhydes produits de la réaction pourraient avoir un rôle clé dans la biosynthèse de certains alcaloïdes (Floris et Mondovì, 2009), tandis que chez les mammifères, cette fonction est beaucoup plus diversifiée. La DAO exerce son activité dans de nombreux tissus avec des niveaux plus élevés dans les cellules déciduales du placenta, dans les cellules épithéliales tubulaires du rein et dans les cellules épithéliales intestinales. Ces localisations suggèrent une fonction de barrière générale contre l'entrée des diamines et polyamines

extracellulaires en circulation. Ajouté à cela, la DAO contribue à réguler le taux d'histamine, qui peut être responsable de plusieurs conditions pathologiques comme l'allergie, l'ulcère gastroduodéal, et les réactions anaphylactiques. Il a été démontré que la DAO de placenta est identique à la protéine de liaison à l'amiloride et celle-ci pourrait donc être impliquée dans la régulation du transport des ions à travers les canaux ioniques ( $\text{Na}^+$ ) épithéliaux (Barbry *et al.*, 1990).

Les autres SSAO sont pour la plupart solubles (SAO) ou exprimés à la surface cellulaire (VAP-1) et ont des préférences de substrats différents.

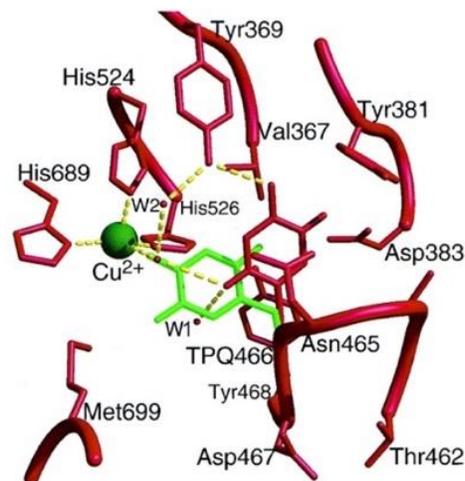


Figure 1.3 Site actif de l'amine oxydase à Cuivre d'*E. coli*.

Structure du site actif de l'amine oxydase à Cuivre d'*E. coli* obtenu par cristallographie aux rayons X avec des variantes mutationnelles. La structure sauvage est représentée en rouge avec les résidus numérotés et le TPQ (résidu 466) dans la conformation normale « hors Cuivre ». Le Cuivre est représenté par une sphère verte et les résidus de liaison au Cu (His524, His526 et His689) sont également étiquetés. La position du TPQ sous forme inactive cristallisée à partir de sulfate d'ammonium est indiquée en vert et représente la conformation « sur Cuivre » (d'après Murray *et al.*, 1999).

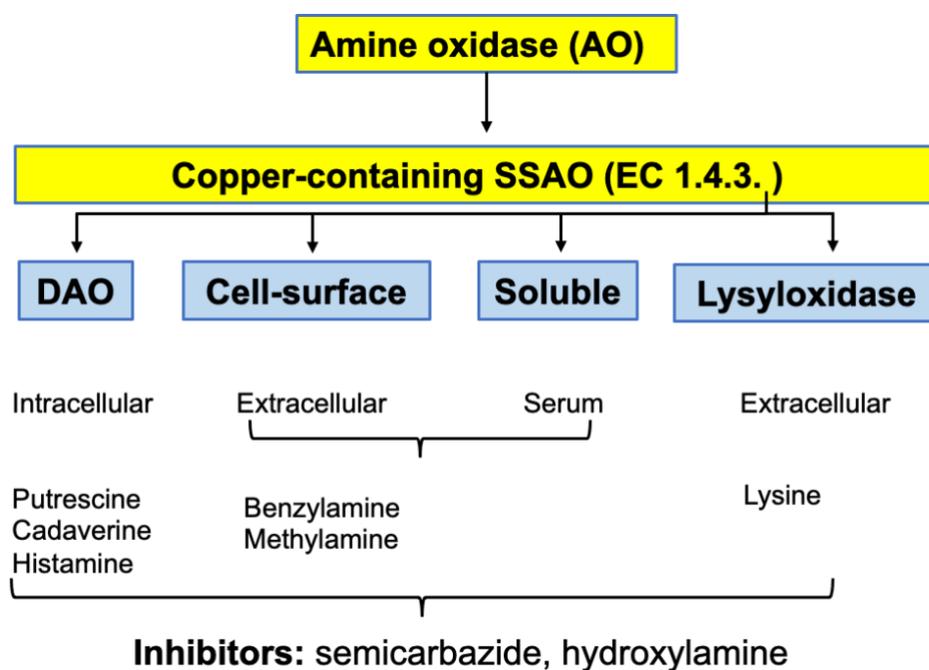


Figure 1.4 Classification des amine oxydases à Cuivre (adapté de Jalkanen et Salmi, 2001).

#### 1.1.4 Le métabolisme de l'histamine et ses effets (« *Amis ou Ennemis* »)

L'intolérance à l'histamine, également appelée histaminose entérale ou sensibilité à l'histamine alimentaire (incluant les pseudo-allergies), résulte d'un déséquilibre de l'histamine accumulée et de sa capacité de dégradation par l'organisme (Hrubisko *et al.*, 2021). Cette condition pharmacologique, dont l'origine était autrefois associée uniquement à une ingestion excessive d'histamine des aliments, est désormais identifiée comme pouvant provenir d'un déficit enzymatique. En effet, l'incapacité de certains individus à métaboliser l'histamine dans l'intestin, bien qu'ayant des niveaux faibles ou normaux d'histamine et quelques fois consommant des aliments pauvres en histidine (ou histamine), permettrait d'expliquer les raisons de ce mécanisme enzymatique induisant l'intoxication à l'histamine.

L'histamine ou 2-[4-imidazolyl]éthylamine est une amine biogénique issue de la décarboxylation d'un acide aminé précurseur, l'histidine (L-histidine) dans une réaction enzymatique impliquant la L-histidine décarboxylase (EC 4.1.1.22) et en présence de vitamine B6 (figure 1.5) (Comas-Basté *et al.*, 2020; Windaus et Vogt, 1907). Cette réaction est produite principalement dans les mastocytes, les basophiles, les plaquettes, et l'histamine qui en découle est stockée de façon intracellulaire dans des vésicules pour être ensuite libérée sous diverses stimulations (Vlieg-Boestra *et al.*, 2005). Structurellement, l'histamine se présente sous forme d'hétérocycle avec un cycle imidazole et un groupe éthylamine lui fournissant la fonction amine primaire (Comas-Basté *et al.*, 2020).

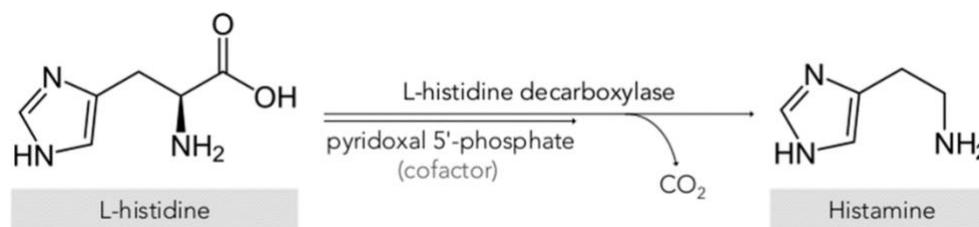


Figure 1.5 Synthèse de l'histamine.

Réaction de synthèse de l'histamine par décarboxylation de son acide aminé précurseur (d'après Comas-Basté *et al.*, 2020).

Fonctionnellement, l'histamine joue un rôle important dans divers processus biologiques et pathologiques. Elle est impliquée dans divers mécanismes immunitaires et physiologiques, stimule la sécrétion d'acide gastrique, l'inflammation, la contraction des cellules musculaires lisses plus particulièrement au niveau des bronches et de l'intestin, la vasodilatation et la production de cytokines, des tachycardies et des arythmies cardiaques, une stimulation nociceptive des fibres nerveuses (Bäumer et Roßbach, 2010). Ces effets (Tableau 1.2) sont contrôlés par quatre récepteurs membranaires (H1-H4) appartenant à la famille des récepteurs couplés à la protéine G (Nakamura *et al.*, 2000) et présents sur la surface de cellules épithéliales, musculaires, endothéliales ou sur les neurones intestinaux qui activent les voies de transduction du signal (figure 1.6) lors de la perception de leur ligand, l'histamine (Panula *et al.*, 2015). Les récepteurs H1 et H2 sont ubiquitaires avec H2 majoritairement présent dans le tube digestif (estomac, duodénum, intestin grêle). Les récepteurs H3 sont plus abondants dans le système nerveux et les récepteurs H4 quant à eux peuvent être retrouvés dans les tissus comme la peau et les amygdales en faible quantité.

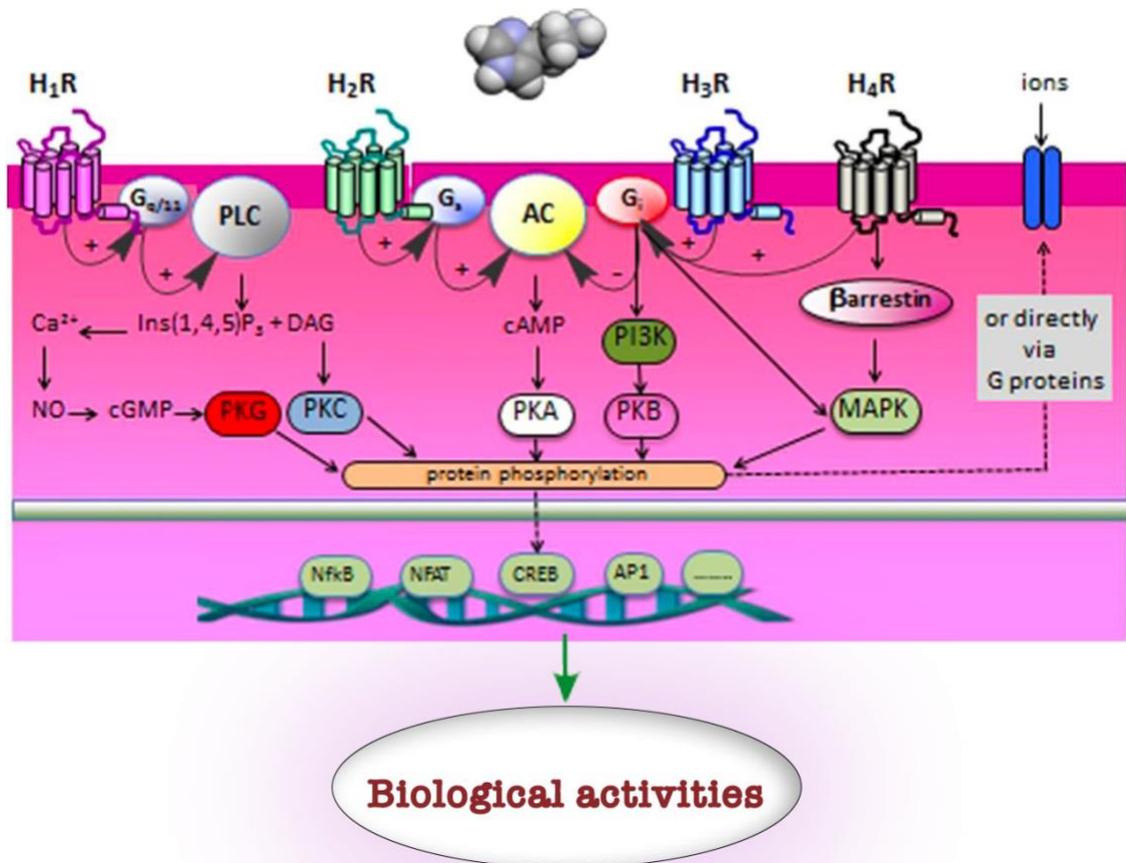


Figure 1.6 Voies de transduction du signal des récepteurs d'histamine H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>. Les sites de liaison classiques de l'histamine et leurs principales voies de signalisation telles que AC (adénylate cyclase/AMP cyclique), PKG (protéine kinase G), PKC (protéine kinase C), PKA (protéine kinase A), PKB (protéine kinase B), PLC (phospholipase C), MAPK (protéines kinases activées par les mitogènes) (adapté de Panula *et al.*, 2015).

Tableau 1.2 Caractéristiques des récepteurs de l’histamine (H1-H4).  
 Caractérisation selon la distribution tissulaire, la transduction du signal, la fonction physiologique et la physiopathologie associée (adapté de Bäumer et Roßbach, 2010).

Récepteurs	H1	H2	H3	H4
<b>Tissus d’expression</b>	Cellules neuronales, muscle lisse des voies et vaisseaux respiratoires, gastro-intestinaux, urogénitaux, hépatocytes, cellules endothéliales, cellules épithéliales, neutrophiles, éosinophiles, monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes T et B	Cellules neuronales, muscle lisse des voies respiratoires et des vaisseaux, cellules pariétales de la muqueuse gastrique, hépatocytes, chondrocytes, cellules endothéliales, épithéliales, neutrophiles, éosinophiles, monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes T et B	Neurones histaminergiques, éosinophiles, monocytes, cellules dendritiques	Mastocytes, basophiles éosinophiles, lymphocytes T, cellules dendritiques monocytes, neutrophiles, cellules nerveuses, fibroblastes dermiques, cellules endocrines du tractus gastro-intestinal
<b>Protéine G</b>	Gq/11	Gas	Gi/o	Gi/os
<b>Fonction physiologique</b>	Contraction des muscles lisses, augmentation de la perméabilité capillaire, cycle veille-sommeil	Sécrétion glandulaire, relâchement des muscles lisses	Régulation du sommeil et de la prise alimentaire	Chimiotaxie/production de cytokines/chimiokines par les cellules immunitaires
<b>Pertinence pathologique</b>	Hypersensibilité immédiate	Gastrite d'origine acide, ulcères gastro-intestinaux	Troubles cognitifs, obésité	Inflammation, prurit

La libération d’histamine par les cellules (mastocytes, basophiles, neurones histaminergiques, cellules entérochromaffines de l’estomac etc.) peut se produire de différentes manières. Le plus important des mécanismes chez l’homme est la libération d’histamine par les mastocytes et les basophiles sous stimulation immunologique. En effet, l’histamine stockée dans les vésicules de ces cellules est libérée brutalement après la liaison des récepteurs IgE de surface des anticorps IgE spécifiques de l’antigène (Thurmond *et al.*, 2008). La synthèse de novo d’histamine s’y ajoute et induit la libération de l’histamine endogène produite dans diverses cellules à partir de son précurseur L-histidine via l’enzyme histidine décarboxylase. Ces cellules ne stockant pas l’histamine, la libère immédiatement sous diverses stimulations (inflammations, cytokines, facteurs du complément C3a et C5a etc.) après synthèse. L’histamine peut être apportée par voie exogène avec l’ingestion d’aliments qui en sont riches (vins, fromages, aliments fermentés, etc.). Cet apport externe reste indépendant de la cuisson de l’aliment car l’histamine étant thermostable, sa présence ne peut être influencée par la cuisson (Bäumer et Roßbach, 2010). De plus la fermentation, qu’elle soit naturelle ou non dans les aliments, contribue à augmenter la concentration d’histamine de même qu’une contamination bactérienne à la suite de mauvaises pratiques de conservation.

En fonction de sa localisation, l’histamine présente dans l’organisme est désaminée ou méthylée (figure 1.8) par l’action des enzymes DAO et histamine-N-méthyltransférase (HNMT) respectivement. Les deux enzymes convertissent l’histamine en produits qui sont inactifs aux récepteurs cellulaires d’histamine. La DAO est une protéine sécrétoire, exclusivement stockée dans les structures vésiculaires de la membrane plasmique et responsable de la dégradation de l’histamine extracellulaire (Bäumer et Roßbach, 2010; Maintz et Novak, 2007). Chez les mammifères, l’expression de la DAO est limitée à certains tissus comme l’intestin, le côlon ascendant, le placenta et les reins. Chez la

femme, l'activité de la DAO est notamment augmentée pendant la grossesse et une diminution de celle-ci serait un marqueur biologique de la menace d'accouchement prématuré (Lefèvre *et al.*, 2017). En revanche, l'enzyme HNMT est exprimée dans un plus large éventail de tissus tels que les reins, le foie, la rate, le côlon, la prostate, les ovaires, les cellules de la moelle épinière, la trachée et les voies respiratoires (Bäumer et Roßbach, 2010; Kovacova-Hanusikova *et al.*, 2015).

La HNMT est une protéine cytosolique impliquée dans l'inactivation de l'histamine intracellulaire et sa présence dans le cytosol peut être causée par la synthèse *in situ* de la cellule elle-même ou du fait de l'incorporation au travers de l'espace extracellulaire grâce à un récepteur ou par des transporteurs membranaires (Tuck *et al.*, 2019). Pour ce qui est de l'activité catalytique des deux enzymes au niveau du tractus gastro-intestinal (porte d'entrée de l'histamine exogène dans le corps), la DAO reste la plus fortement exprimée et la moins sélective car elle peut métaboliser d'autres amines biogènes provenant des aliments à l'instar de la putrescine et la cadavérine, bien qu'elle montre une préférence pour l'histamine.

Bien que l'histamine ait des fonctions physiologiques importantes dans le corps, elle peut présenter un risque pour la santé lorsqu'elle est ingérée à des niveaux élevés. En effet, l'accumulation d'histamine ingérée et sa pénétration ultérieure dans la circulation en raison d'un catabolisme réduit ou ralenti par l'enzyme DAO au niveau de l'épithélium intestinal (l'intestin grêle) sont considérées comme une cause possible du syndrome d'intolérance à l'histamine (Tuck *et al.*, 2019). L'intoxication alimentaire à l'histamine, peut survenir après la consommation d'aliments à teneur inhabituellement élevée qui dépassent les mécanismes de dégradation généralement supérieure à 500 mg/Kg (Comas-Basté *et al.*, 2020). Cette dernière peut toucher plusieurs organes au travers de l'activation de différents récepteurs (H1-H4) et

entraîner différents symptômes de gravité faible/modérée qui disparaissent en quelques heures (figure 1.7). Les symptômes typiques de l'intolérance à l'histamine sont les troubles gastro-intestinaux, les éternuements, la rhinorrhée et la congestion du nez, les maux de tête, la dysménorrhée, l'hypotonie, les arythmies, l'urticaire, le prurit, les bouffées vasomotrices et l'asthme (Maintz et Novak, 2007; Wantke *et al.*, 1996).

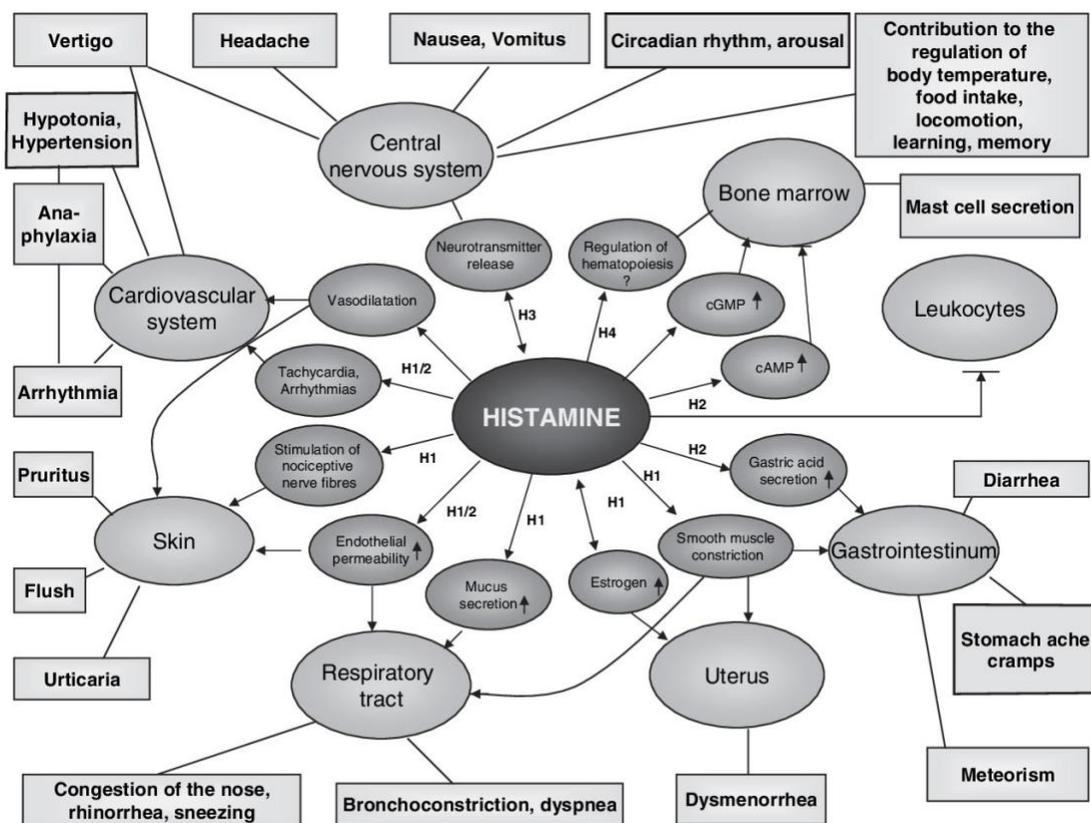


Figure 1.7 Symptômes médiés par l'histamine selon le récepteur impliqué (d'après Maintz et Novak, 2007).

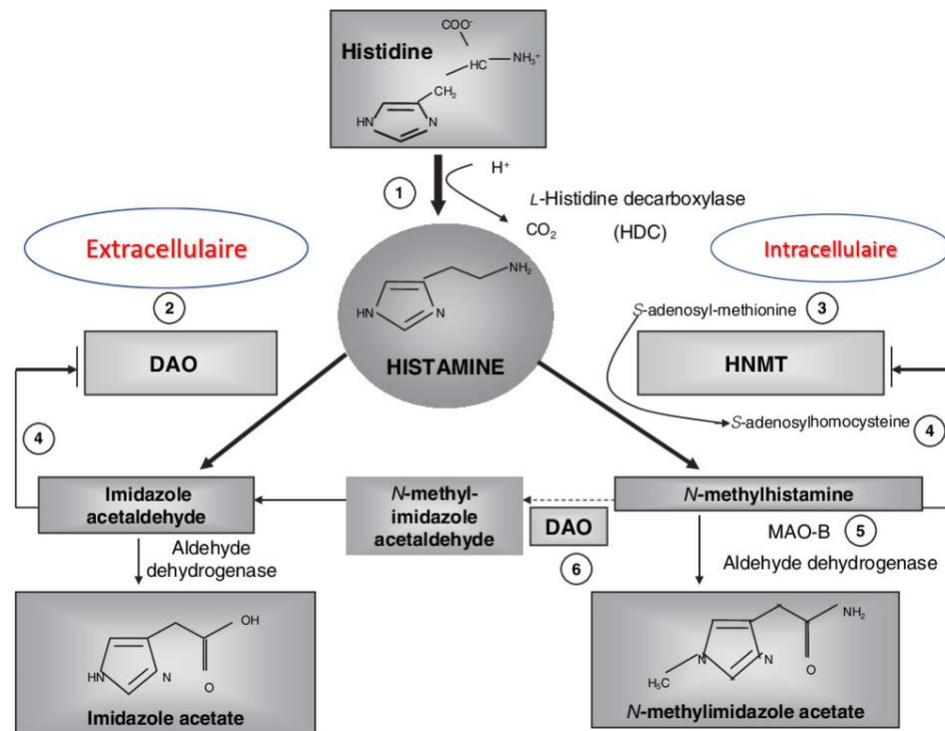


Figure 1.8 Métabolisme de l'histamine.

DAO: Diamine oxydase; MAO-B : monoamine oxydase B; HNMT: Histamine N-méthyltransférase (d'après Maintz et Novak, 2007). L'histamine peut être métabolisée par désamination oxydante extracellulaire du groupe amine primaire par la DAO (2) ou par méthylation intracellulaire du cycle imidazole par l'enzyme histamine-N-méthyltransférase (HNMT) (3). Par conséquent, une activité enzymatique insuffisante causée par une carence ou une inhibition enzymatique peut entraîner une accumulation d'histamine. Les deux enzymes peuvent être inhibées par leurs produits de réaction respectifs dans une boucle de rétroaction négative (4).

La N-méthylhistamine est désaminée par oxydation en N-méthyl-imidazole acétaldéhyde MAO B (5) ou par la DAO (6). En raison du fait que la voie de méthylation se réalise dans le compartiment cytosolique des cellules, MAO B (5) a été suggéré pour catalyser cette réaction *in vivo* (Tsujikawa *et al.*, 1999).

### 1.1.5 La diamine oxydase (DAO) végétale comme alternative thérapeutique à la prise d'antihistaminique

Les progrès récents dans notre connaissance et notre compréhension de la pharmacologie de l'histamine avec entre autres le diagnostic de l'intolérance à l'histamine, la compréhension des acteurs majeurs qui y sont impliqués, l'identification des récepteurs, etc. ont permis d'entreprendre diverses pistes pouvant faire office de thérapie contre l'intolérance à l'histamine. En effet, plusieurs études (Hrubisko *et al.*, 2021; Maintz et Novak, 2007) ont montré que bien que certains facteurs puissent contribuer à accentuer la sensibilité de l'organisme à l'histamine (ingestion d'aliments contenant d'autres amines biogènes, consommation d'alcools, malnutrition, prise de médicaments pouvant inhiber la DAO), deux principales causes restent considérées comme les responsables du mal-être physiologique associé à l'histamine : la carence ou la faible activité de la DAO et la présence d'un excès d'histamine pouvant être généré par la consommation régulière d'aliments riches en histamine, une mastocytose, une production bactérienne ou une surproduction endogène liée à l'allergie.

Pour résoudre ce problème, notamment réduire les effets nauséabonds induits par l'histamine, diverses approches thérapeutiques ont été proposées :

- Un régime alimentaire pauvre en histamine pour limiter les effets de cette dernière. L'adhésion à un tel régime a conduit à une amélioration des manifestations gastro-intestinales, cutanées et neurologiques des patients et quelques fois une augmentation des taux sériques de DAO a été également observée (Lackner *et al.*, 2019; Wagner *et al.*, 2017).
- La prise d'antihistaminique. La prise d'antihistaminique pour traiter les dysfonctions liées à l'histamine se révèle risquée sous certains aspects liés aux effets secondaires (Hrubisko *et al.*, 2021).

- L'apport exogène de DAO. Cette approche thérapeutique a été proposée pour traiter les effets de l'intoxication à l'histamine. Plusieurs études cliniques (Komericki *et al.*, 2011; Schnedl *et al.*, 2019; Yacoub *et al.*, 2018) ont démontré une réduction significative des symptômes médiés par l'histamine à la suite de la prise de suppléments oraux de DAO.

Du fait de l'absence d'études cliniques claires et précises, le traitement par les antihistaminiques se doit d'être conscient et limité dans le temps. De même, un ajustement sérieux du régime alimentaire n'est également recommandé que sur une courte période, car l'utilisation d'une telle thérapie sur un patient présente le risque de réduire inutilement sa qualité de vie en le privant potentiellement de vitamines et autres éléments nutritifs tous aussi importants et contenus dans les aliments exempts de sa consommation (Reese *et al.*, 2017). De plus, les traitements diététiques dans différentes études cliniques varient de 3 à 4 semaines et aucune corrélation positive n'a pu être établie entre une durée de traitement plus longue et la rémission des symptômes (Comas-Basté *et al.*, 2020).

Pour ce qui est de l'apport de DAO exogène, les reins de porcs sont la principale source d'enzymes commercialisée et de nombreuses études (Comas-Basté *et al.*, 2020; Kettner *et al.*, 2020; Mondovì *et al.*, 1967; Schnedl *et al.*, 2019) ont démontré la capacité de ce produit à dégrader l'histamine et d'autres amines biogènes. Bien que cette approche thérapeutique soit répandue, les résultats faibles concernant les valeurs d'activité DAO de reins de porcs ont montré la nécessité d'identifier des sources alternatives plus actives pour la supplémentation exogène chez les personnes intolérantes à l'histamine. Divers auteurs (Blemur *et al.*, 2016; Calinescu *et al.*, 2012; Masini *et al.*, 2007) ont mis en évidence une capacité catalytique plus élevée des DAO végétales notamment de légumineuses à dégrader l'histamine. À cela vient s'ajouter son acceptabilité par une

plus grande population, notamment les populations végétariennes et celles ayant des restrictions religieuses sur la consommation de produits à base de porc. Une étude récente *in vitro* de Jumarie *et al.*, 2017 a montré que la DAO de *Lathyrus sativus* modulerait la toxicité de l'histamine. Cette étude sur la lignée cellulaire intestinale humaine Caco-2 a montré l'effet protecteur vis-à-vis de l'histamine que jouerait la DAO en association bi-enzymatique avec la catalase (celle-ci viendrait réduire les dommages cellulaires produits par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> issu de la désamination oxydative de l'histamine par DAO) (Jumarie *et al.*, 2017).

## 1.2 Techniques de séparation et de dosage des amines oxydases

La purification des enzymes varie selon les différents objectifs d'utilisation. Alors que certaines méthodes sont spécialisées dans la préparation industrielle d'enzyme, d'autres servent à répondre aux besoins basiques à savoir la détermination de l'activité enzymatique, la caractérisation et les études de structures. Cependant, il est observé une diminution de l'activité enzymatique totale tout au long des étapes de purification et dans ces conditions, l'utilisation d'une méthode au détriment d'une autre relève de l'objectif de performance et de rentabilité. Les trois étapes principales dans la préparation de l'enzyme sont : l'extraction, la solubilisation dans le milieu pour obtenir l'enzyme brute et la purification sélective ou séparation (Barthomeuf, 1989).

### 1.2.1 Extraction et solubilisation des amines oxydases

L'extraction de l'enzyme et sa solubilisation dans le tampon approprié consistent à la séparation de macro-contaminants tels que les microorganismes, les débris cellulaires et autres impuretés. Les amines oxydases sont extraites de tissus après lyse cellulaires. Cette destruction se fait par des méthodes physico-chimiques (alkalisation, chocs

osmotiques, EDTA, détergent) et ou des méthodes mécaniques (sonication, cycle gel-dégel, cisaillement solide ou liquide, broyage ou par agitation avec des abrasifs) (Wiseman, 1975). Les impuretés et autres débris cellulaires sont ensuite éliminés par différentes techniques de séparation : la filtration et la centrifugation. De même, certains débris de tailles plus petits peuvent être éliminés par filtration tangentielle afin d'éviter des pertes d'activités enzymatiques dues au bouchage des pores des membranes de filtration. Pour la préparation de grande quantité d'enzyme dispendieuse, la technique d'extraction liquide-liquide ou partitionnement est à privilégier. Elle se base sur l'incompatibilité entre deux polymères (polyéthylène glycol et dextran) en solution aqueuse ou entre un polymère et un sel approprié (généralement le phosphate de potassium); cette séparation conduit à la formation de deux phases dans laquelle chacune contient 65-90% d'eau assurant ainsi une meilleure stabilité enzymatique que lors de l'utilisation des mélanges eau et solvant organique (Johansson, 1984). De plus, cette méthode ne permet pas seulement d'éliminer les débris insolubles, mais elle permet aussi de réduire l'activité enzymatique des milieux qui en sont faiblement concentrés comme les filtrats de culture cellulaire.

L'obtention d'un extrait brut à la suite de l'extraction de l'enzyme facilite le processus de séparation. Cette étape est fortement recommandée pour optimiser le processus de purification, mais elle n'est pas obligatoire. Les principales méthodes utilisées consistent en des précipitations et adsorptions :

- La précipitation par les sels neutres ou « salting out » : le système permet d'éliminer les protéines qui s'agrègent facilement de celles qui sont très solubles, ce qui en fait une bonne étape initiale de purification pour les protéines solubles (England et Seifter, 1990). Le sel le plus couramment utilisé est le

sulfate d'ammonium en raison de sa haute solubilité, son manque de toxicité, de son prix abordable et, quelquefois son effet stabilisant.

- L'adsorption sur résine échangeuse d'ions : ce processus est utilisé lorsque nous disposons d'un échangeur d'ion peu coûteux à et haute capacité de liaison. Cette technique s'applique principalement en opération batch pour sélectivement isoler l'enzyme; il peut également s'appliquer en sens inverse et de ce fait permettre la rétention des contaminants sur une résine (ou un ligand spécifique) afin d'augmenter la concentration de l'enzyme.

### 1.2.2 Techniques de séparation chromatographique des amines oxydases

La purification des amines oxydases reposent sur des techniques de séparation exploitant des différences de structures et de surfaces de protéines avec pour objectif principal l'isolement de l'enzyme dans un mélange complexe, la récupération maximale d'activité et de la masse. Parmi les différentes techniques utilisées, la chromatographie joue un rôle prépondérant et reste la plus utilisée bien que certaines techniques comme l'électrophorèse préparative soient également répandues. Les différents types de chromatographie (figure 1.9) pouvant être utilisée se répartissent en quatre catégories : la filtration sur gel, la chromatographie par des interactions hydrophobes, la chromatographie d'échange ionique et la chromatographie d'affinité.

#### 1.2.2.1 La filtration sur gel

Encore appelée chromatographie d'exclusion stérique ou perméation de gel, cette méthode n'est pas basée sur des interactions physiques ou chimiques et elle sépare les molécules en fonction de leur taille. Son applicabilité dans la purification des protéines

est généralement très large. Les molécules sont éluées selon de leur taille au travers d'un gel dont les mailles retiennent les molécules de petites tailles et laissent passer celles de tailles plus élevées. Verma et collaborateurs (Verma *et al.*, 2020) ont récemment utilisé cette technique comme étape pour la purification de la DAO de *P. sativum* après précipitation de l'extrait brut avec du sulfate d'ammonium.

#### 1.2.2.2 La chromatographie par des interactions hydrophobes

La chromatographie par des interactions hydrophobes est utilisée pour la séparation de protéines sur la base de leur différence d'hydrophobicité. Ainsi, la rétention de l'enzyme dérive de l'interaction des groupes hydrophobes qui la compose avec la matrice à laquelle est attaché un ligand hydrophobe. Plus basse est la densité des ligands fixés à la matrice et plus faible est la force de la liaison de l'enzyme ce qui favorise l'éluion efficace de cette dernière à l'aide de tampons enrichis en sels plutôt que par des solutions organiques qui peuvent dénaturer l'enzyme ou réduire son activité biologique (Toribio *et al.*, 1996). Les ligands attachés à la matrice généralement utilisée et classés par ordre croissant d'hydrophobicité sont l'hydroxypropyle, le propyle, le butyle et le phényle. La sélectivité repose sur le type et la concentration en sel, le pH, la température ou encore le gradient. Plusieurs études (Kettner *et al.*, 2020; Wimmerovd *et al.*, 1993) ont utilisé cette technique pour purifier la diamine oxydase à partir du rein de porc et à partir des germes de pois verts. Généralement, cette technique de purification partielle est combinée à d'autres procédés de purification plus avancés.

#### 1.2.2.3 La chromatographie d'échange ionique

La chromatographie échangeuse d'ions permet de séparer les ions et les molécules polaires selon leur charge ou selon le point isoélectrique des protéines. Selon le pH

résiduel du milieu, les amines oxydases ont une charge globale positive ou négative en fonction de leur point isoélectrique (pI) ce qui permet l'interaction avec une résine de charge opposée. Le pI de la DAO extraite du rein de porc et de l'intestin grêle de rat a été déterminé à 6 (Leonida *et al.*, 2019; Mizuguchi *et al.*, 1994). Le choix de la résine dépend de la quantité et des propriétés de l'enzyme (charge, pH) ainsi que du taux de purification voulu. Les résines cationiques les plus répandues présentent des groupements diéthylaminoéthyle (DEAE), polyéthylèneimine (PEI) ou ammonium quaternaire (QA) tandis que les résines anioniques les plus communes présentent des fonctions: carboxyméthyl (CM) ou sulfopropyl (SP) (Toribio *et al.*, 1996). L'élution de l'enzyme se fait généralement par un gradient de force ionique ou par un gradient de pH. La DAO a été purifiée à partir de *Lathyrus sativus* par chromatographie d'échange ionique au moyen d'un échangeur anionique fort (YMC-BioPro S75; résine sulfonate) (Blemur *et al.*, 2016) et d'un échangeur cationique faible (DEAE52-cellulose) (Calinescu *et al.*, 2010).

#### 1.2.2.4 La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est une technique chromatographique dans laquelle la molécule à purifier est adsorbée sélectivement et de manière réversible sur un ligand biospécifique. Cette méthode de séparation, la plus puissante utilisée pour la purification des protéines, se base sur la grande affinité de certaines protéines pour des ligands fixés de façon covalente à une matrice (Kaufman, 1995). L'interaction peut être très spécifique avec un substrat de l'enzyme (ou une molécule semblable) qui est lié à la phase stationnaire et reconnu spécifiquement par l'enzyme. Les phases stationnaires assemblées avec le substrat de la DAO ne sont pas commercialisées; cependant la grande majorité des études utilisant cette technique de purification pour isoler la DAO ont utilisé l'interaction avec des lectines présentant des oligosaccharides spécifiques

(exemple la Concanavaline A immobilisée sur la Sepharose 4B). Dans ce cas, l'élution de l'enzyme est réalisée en régime isocratique ou en gradient au moyen de sucres spécifiques comme le glucose et/ou le mannose pour l'interaction compétitive avec la Concanavaline A (Shieh *et al.*, 1975; Turini *et al.*, 1982).

#### 1.2.2.4.1 Les lectines : spécificité de reconnaissance osidique

Les lectines sont des glycoprotéines d'origine bactérienne, virale, végétale ou animale. Elles sont extraites de diverses sources par chromatographie d'affinité ou obtenues par technologie de l'ADN recombinant et elles ont la capacité de reconnaître spécifiquement les glucides simples ou des oligosaccharides plus complexes sans les modifier (Franz *et al.*, 1982; Goldstein *et al.*, 1980). Les lectines représentent un groupe hétérogène de protéines oligomères qui varient en taille, structure, organisation moléculaire, ainsi que dans la constitution de leurs sites de combinaison. Suite à leur découverte, elles se sont avérées être des outils précieux pour l'investigation structurale et fonctionnelle des hydrates de carbone complexes, particulièrement des glycoprotéines ainsi que pour les études de signalisation cellulaire pendant les processus physiologiques et pathologiques, allant de la différenciation cellulaire jusqu'au cancer (Goldstein *et al.*, 1997).

Les lectines sont capables de reconnaître les glycoconjugués, mono et oligosaccharides. Les sucres simples reconnus par les lectines et avec lesquels ils ont une interaction forte se répartissent en cinq groupes: le mannose (Man), le galactose (Gal)/N-acétylgalactosamine (GalNAc), le glucose (Glu)/N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique). Ces sucres sont pour la plupart de configuration D à l'exception du fucose qui a une configuration L (Lis et Sharon, 1998).

L'affinité des lectines pour les monosaccharides est généralement faible, mais très sélective avec des constantes d'association de l'ordre du millimolaire (Sharon et Lis, 1989). En particulier, les lectines spécifiques au galactose ne réagissent pas avec le glucose ou le mannose et pareillement celles spécifiques au mannose ne lient pas le galactose. À l'exception de l'agglutinine germinale de blé, les membres du groupe de spécificité de la N-acétylglucosamine ne se combinent pas avec ceux de la N-acétylgalactosamine (et vice-versa). La sélectivité des lectines pour les monosaccharides spécifiques peut néanmoins tolérer des variations en C<sub>2</sub> de l'anneau pyranose. En effet, les lectines spécifiques au mannose peuvent lier le glucose (épimère en C<sub>2</sub> du mannose) tandis que la plupart des lectines qui lient le galactose interagissent également avec la N-acétylgalactosamine et pourraient même avoir une meilleure affinité pour cette dernière (exemple de l'agglutinine de soja [ASB], dont l'affinité est 25 à 50 fois supérieure à celle du galactose) (Lis et Sharon, 1998).

Contrairement aux groupes de lectines les plus usuelles, certaines lectines n'interagissent qu'avec des oligosaccharides et peuvent souvent avoir des constantes d'associations jusqu'à 1000 fois supérieures. L'affinité des lectines avec leurs oligosaccharides spécifiques est notamment influencée par la forme des molécules, car ces dernières présentent une flexibilité rotative au niveau des liaisons glycosidiques reliant les monosaccharides de la chaîne. Ces observations ont été confirmées par les études de modélisation moléculaire et résonance magnétique nucléaire (Gabijs, 1997; Weis et Drickamer, 1996).

#### 1.2.2.4.2 Les lectines et la purification de la DAO

La N-glycosylation de la DAO est une étape fondamentalement essentielle à l'exercice des différentes fonctions de l'enzyme et une altération de ce processus pourrait être la cause de sérieux dommages immunitaires. En effet, la glycosylation servirait essentiellement au transport intracellulaire de l'enzyme.

L'analyse structurale et catalytique de la DAO a montré que l'enzyme consiste en trois domaines: D2 (acides aminés 27-135), D3 (acides aminés 144-258) et D4 (acides aminés 310-751) avec 4 sites potentiels de N-glycosylations. Les N-glycosylations se localisent sur Asn-110, Asn-168, Asn-538, Asn-745 (Gludovacz *et al.*, 2018). L'utilisation de la DAO végétale pour dégrader l'histamine exogène ou endogène des personnes malades implique la connaissance des structures carbohydrates pour des études pharmacocinétiques.

Lorsque les enzymes à isoler sont de types glycoprotéines, l'usage des lectines comme ligand de chromatographie d'affinité est un principe utilisé en biochimie. La Concanavaleine A (Con A) est notamment la plus utilisée des lectines végétales et cette dernière reconnaît les protéines glycoconjuguées qui contiennent divers oligosaccharides comprenant dans leur structure des résidus de D-mannose ou de D-glucose. Les lectines sont particulièrement avantageuses pour la purification de glycoprotéine du fait de leur biodisponibilité et de leur interaction très spécifique avec les parties carbohydrates. De plus, celles-ci n'interagissent pas de manière très forte avec les sucres reconnus permettant ainsi à l'interaction d'être possiblement rompue grâce à l'usage d'un sucre spécifique à pH neutre ou par gradient de concentration (Barthomeuf, 1989; Kamra et Gupta, 1987).

D'un point de vue structural, la Concanavoline A est un tétramère de 110 kDa dans lequel chaque sous-unité peut lier une molécule de glucose/mannose ou autres glycoprotéines contenant un sucre spécifique. Cette interaction a de nombreuses fois été utilisée pour purifier efficacement la DAO animale (Huetz et Schwelberger, 2003; Ishizaki et Yasunobu, 1980; Shieh *et al.*, 1975; Turini *et al.*, 1982; Wilflingseder et Schwelberger, 2000). En effet, la DAO de rein de porc contient entre 11-12% de carbohydrate dont majoritairement le galactose, le mannose, l'acide sialique et la N-acétylglucosamine et des études de son interaction avec la Con A ont montré toute la complexité de cette interaction (Shah et Ali, 1988).

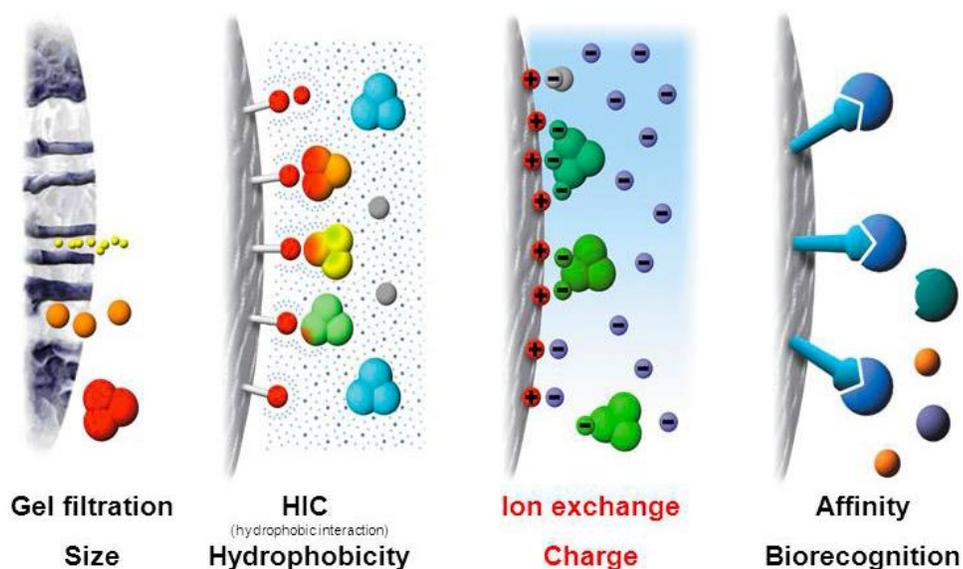


Figure 1.9 Principales techniques de séparation chromatographique de la DAO (adapté de Amersham Biosciences, 2010).

### 1.2.3 Les méthodes de dosage des amines oxydases

L'activité enzymatique représente la propriété caractéristique générale et ultime d'une enzyme. Les dosages enzymatiques sont des méthodes qui permettent de détecter et mesurer les quantités d'enzymes spécifiques dans un échantillon. Idéalement, un dosage enzymatique doit être spécifique, sensible, simple et rapide tout en permettant de détecter l'activité enzymatique d'une préparation brute ou purifiée. Généralement, les dosages enzymatiques servent deux objectifs principaux : identifier une enzyme et prouver sa présence ou son absence dans un échantillon donné d'une part; déterminer la quantité ou l'activité de l'enzyme dans l'échantillon d'autre part (Bisswanger, 2014). La réaction catalysée doit initialement suivre une relation linéaire à partir de laquelle sa vitesse peut être calculée. Plusieurs méthodes sont utilisées pour doser l'activité de la DAO et l'ensemble des méthodes appliquées se résume en deux approches distinctes: les méthodes continues et les méthodes à temps fixe.

Le dosage en continu consiste à suivre progressivement la quantité de l'enzyme à travers la disparition du substrat ou encore la formation du produit. Les méthodes les plus répandues pour ce type de dosage sont les méthodes *spectrométriques*, *fluorimétriques*, *oxymétriques* et *zymographiques*. Les méthodes à temps fixe consistent à mélanger et incuber les composantes de la réaction pendant un temps prédéterminé pour mesurer la quantité de substrat restant ou la quantité de produit formé, généralement par *spectrophotométrie* ou par *radiométrie*. Ces méthodes utilisent des agents et processus dénaturants (agents chaotropiques, chaleur, changement de pH) de l'enzyme pour arrêter la réaction au bout du temps choisi. Une telle procédure ne donne aucune garantie que la mesure se produit effectivement dans la partie linéaire de la courbe de progression et des mesures de contrôle à différents temps de réaction doivent être envisagées pour réduire l'erreur. Ce sont des

méthodes plus laborieuses qui sont généralement utilisées pour certaines approches qualitatives.

### 1.2.3.1 Méthodes spectrométriques

#### 1.2.3.1.1 Méthodes spectrométriques basées sur la détermination du peroxyde d'hydrogène formé

- i) Méthodes spectrophotométriques en utilisant la peroxydase comme réaction enzymatique couplée

Cette méthode de détermination de la DAO se base sur la mesure du taux de génération du  $H_2O_2$  généré suite à la dégradation de son substrat (généralement la putrescine). Ensuite, une réaction couplée avec la peroxydase et un substrat chromogène oxydé par le  $H_2O_2$  libéré va permettre la formation d'un produit coloré dont l'intensité de coloration est directement proportionnelle à la quantité de substrat putrescine transformé par la DAO. Un exemple d'application de cette méthode est le système DCHBS-AAP-HRP pour déterminer l'activité enzymatique de la DAO (Pietrangeli *et al.*, 2012; Neree *et al.*, 2020). Le chromogène 3,5-dichloro-2-hydroxybenzènesulfonate (DCHBS), une fois oxydé, passe de l'incolore à un composé rose en présence de peroxydase (HRP) et de 4-amino-antipyrine (AAP).

- ii) Méthodes fluorimétriques

Les méthodes *fluorimétriques* utilisent un substrat fluorigène pour déterminer l'activité de la DAO par dosage du  $H_2O_2$  libéré à la suite de la réaction de désamination oxydative de son substrat. Le  $H_2O_2$  libéré réagit avec un composé fluorigène pour former un

produit fluorescent. Snyder et Hendley ont développé une méthode pour le dosage des amines oxydases (figure 1.10) qui a été optimisée par Matsumoto *et al.*, 1982. Globalement, le  $H_2O_2$  convertit l'acide homovanillique en un composé hautement fluorescent avec une excitation à 315 nm et une émission à 425 nm (Matsumoto *et al.*, 1982; Snyder et Hendley, 1968). Cette méthode est grandement utilisée pour sa simplicité et sa haute sensibilité pour doser la DAO.

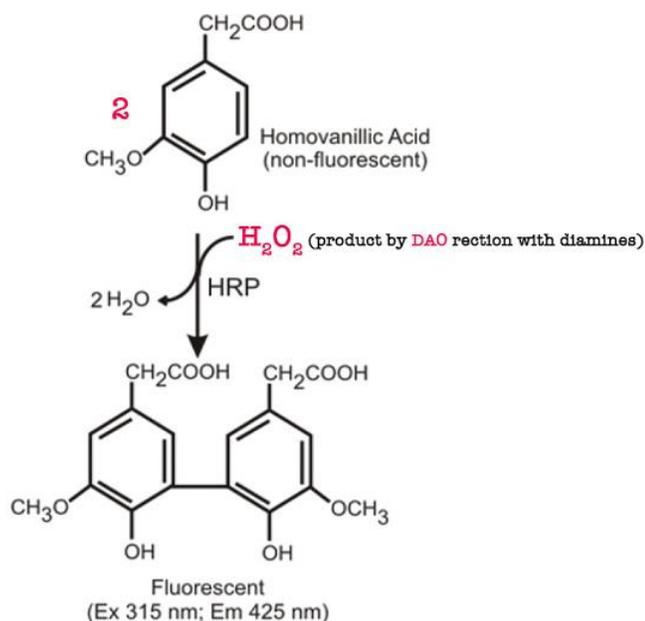


Figure 1.10 Exemple de dosage fluorimétrique de la DAO.  
Dosage fluorimétrique de la DAO par dimérisation de l'acide homovanillique sous l'action du peroxyde d'hydrogène catalysé par la HRP (adapté de Rani *et al.*, 2015).

### iii) Méthodes de chimioluminescence

Certaines méthodes de dosage *spectrométriques* de la DAO utilisent la *chimioluminescence*. Celle-ci génère l'émission de lumière par une réaction chimique. Cette propriété permet d'utiliser la DAO et la peroxydase de raifort en présence de putrescine (substrat de la DAO) et du luminol pour détecter le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par désamination oxydative. Cette méthode est très sensible et permet la détection de la DAO dans les échantillons non concentrés comme le sérum ou de visualiser l'activité de la DAO dans une section tissulaire (Bruun et Houen, 1996).

#### 1.2.3.2 Méthodes spectrométriques basées sur la détermination de l'ammoniac formé

Plusieurs méthodes de dosages *spectrométriques* de la DAO sont disponibles dans la littérature. Une des méthodes de dosage les plus répandues se base sur la détermination de l'ammoniac produit après la transformation par désamination oxydative du substrat de l'enzyme en aldéhyde (figure 1.11). L'ammoniac produit réagit avec  $\alpha$ -cétoglutarate et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) en présence de L-glutamate déshydrogénase (GDH) pour former le L-glutamate et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé (NADP<sup>+</sup>). Cette technique utilise les différences d'absorption du NADPH (340 nm) et du NADP<sup>+</sup> (n'absorbe pas à 340 nm) pour suivre la diminution du substrat de la DAO (celui-ci génère une réaction mole à mole avec la consommation du NADPH) et déterminer la vitesse de la réaction. Cette méthode se montre également efficace pour le dosage d'échantillons susceptibles de contenir la catalase qui est une enzyme dégradant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

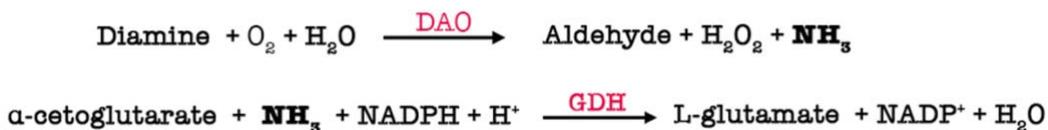


Figure 1.11 Exemple de dosage de la DAO par spectrophotométrie. Dosage de l'ammoniac produit de l'oxydation des diamines par la DAO avec la méthode enzymatique couplée avec la L-glutamate déshydrogénase (GDH).

#### 1.2.4 Méthodes oxymétriques

La réaction de dégradation des diamines par la DAO se déroule en milieu aérobie. Le suivi de la consommation de O<sub>2</sub> avec un oxymètre est une méthode efficace permettant d'évaluer l'activité de l'enzyme étant donné la conservation de la matière entre les substrats de la DAO et les produits formés. Mondovi et collaborateurs ont utilisé une méthode oxymétrique de dosage de la DAO avec la putrescine comme substrat (Mondovi *et al.*, 1992). Sachant que la disparition d'une mole de putrescine s'accompagne de la consommation d'une mole de O<sub>2</sub>, au cours de la réaction de formation d'une mole de  $\gamma$ -aminobutyrate, l'usage d'une sonde oxymétrique durant un temps déterminé permet d'évaluer l'activité de l'enzyme. Bien que cette méthode soit sensible et efficace, l'usage non désiré de l'O<sub>2</sub> par d'autres réactions parallèles limite sa portée.

#### 1.2.5 Les méthodes radiométriques

Les dosages *radiométriques* de la DAO mesurent la libération de radioactivité à partir de ses substrats (putrescine, cadaverine). La procédure consiste à préalablement incuber les substrats putrescine-<sup>14</sup>C (ou cadaverine-<sup>14</sup>C) avec l'extrait contenant l'enzyme à doser. Après incubation, la réaction est arrêtée par le bicarbonate de sodium et les produits désaminés ( $\gamma$ -aminobutyrate) sont extraits dans une solution de toluène

et de 2,5-diphényloxazole (PPO) pour servir à la mesure de la radioactivité dans un compteur à scintillation liquide (Andersson *et al.*, 1978; Okuyama et Kobayashi, 1961; Snyder *et al.*, 1971). Ce type de dosage est très sensible, spécifique et les résultats s'apparentent aux méthodes fluorimétriques.

#### 1.2.6 Méthodes zymographiques

La zymographie est une des premières techniques développées pour mesurer l'activité des enzymes de types protéases présentes dans un échantillon. Pour ce qui est de la DAO (figure 1.12), la zymographie s'effectue sur un gel de polyacrylamide contenant de la peroxydase piégée (Calinescu *et al.*, 2010, 2012). Cette méthode permet la détection et la détermination de l'activité spécifique intrinsèque de la DAO en présence d'autres enzymes interférentes comme la catalase (qui dégrade le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit) basée sur la mobilité électrophorétique différente. Pour la révélation de la DAO, le gel est incubé dans une solution de développement contenant le substrat approprié (putrescine) ainsi qu'un chromogène (*o*-PDA) en tant que co-substrat de la peroxydase. L'accumulation du produit de la réaction bi-enzymatique *in situ* (quinonediimine) conduit à l'apparition des bandes brunes sur le gel. L'analyse densitométrique permet de corrélérer l'intensité des bandes à l'activité enzymatique de la DAO (Ahmadifar *et al.*, 2017; Calinescu *et al.*, 2010, 2012).

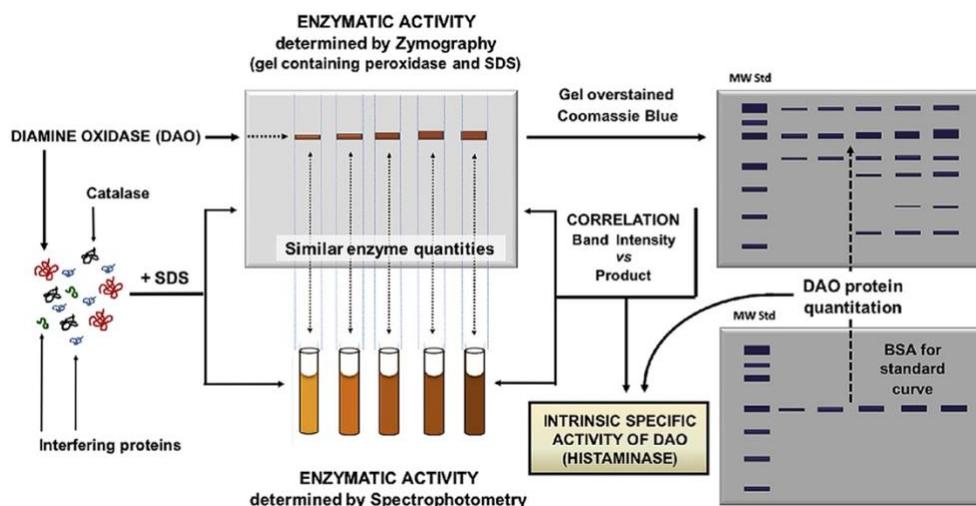


Figure 1.12 Dosage de la DAO par zymographie.

Dosage de la DAO en présence d'enzymes interférentes (d'après Ahmadifar *et al.*, 2017).

### 1.3 Généralités sur la glucose oxydase et ses applications

La glucose oxydase (EC 1.1.3.4) est également une oxydase à FAD qui catalyse l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en acide gluconique, avec utilisation de l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons et la production simultanée de peroxyde d'hydrogène (Bankar *et al.*, 2009). C'est une holoenzyme composée de deux sous-unités identiques de 80 kDa, qui agissent comme des transporteurs redox en utilisant diverses coenzymes (Khatami *et al.*, 2022). Il en existe différentes sources les plus importantes étant d'origines bactériennes, fongiques, végétales et animales.

La glucose oxydase (GoX) a une grande valeur commerciale; c'est notamment une des enzymes les plus commercialisées au monde. Elle est largement utilisée et elle suscite un intérêt croissant dans diverses industries: pour la transformation des aliments et des boissons, elle est utilisée pour ses propriétés antioxydantes, conservatrices et

stabilisatrices (Dubey *et al.*, 2017); dans l'industrie pharmaceutique, l'une des principales utilisations de la réaction catalysée par la GoX est la production d'acide gluconique et sels dérivés pour le traitement des carences en calcium, rhume, cicatrisation des plaies etc. (Khurshid *et al.*, 2016); dans l'industrie textile, elle est utilisée essentiellement pour le blanchiment (Mojsov, 2019). En plus des applications susmentionnées, la glucose oxydase est utilisée pour d'autres applications diverses. Elle s'utilise comme biosenseur pour le diagnostic médical en dosant le glucose présent dans le sang avec un glycomètre (Wang et Lee, 2015), pour améliorer la production de biocarburant (Khatami *et al.*, 2022) ou encore pour la biodégradation de la lignine et autres polluants récalcitrants (Ansari *et al.*, 2016).

#### 1.4 Présentation du projet de maîtrise

La DAO végétale a été proposée par le laboratoire d'accueil (Calinescu *et al.*, 2010, Jumarie *et al.*, 2017, Mateescu *et al.*, 2018) comme agent thérapeutique visant à traiter les histaminoses alimentaires et dysfonctions entériques liées à l'histamine, car contrairement à son homologue commercialisé (d'origine animale), l'enzyme végétale posséderait une meilleure affinité pour l'histamine et une activité spécifique plus élevée. En effet, ces résultats ont été démontrés par des séries de tests enzymatiques (avec l'histamine comme substrat) combinés à une méthode de détection par chromatographie liquide à ultra-haute performance et fluorimétrie (Comas-Basté *et al.*, 2019). De même, une meilleure réactivité pour les diamines aliphatiques et l'histamine de l'enzyme de source végétale comparé à son homologue animal avait été démontré par la mesure des paramètres cinétiques à l'état d'équilibre  $K_m$  et  $k_{cat}$  (Pietrangeli *et al.*, 2007).

Structurellement l'enzyme se présente sous forme de glycoprotéine homodimérique avec un poids moléculaire d'environ 150 kDa et un point isoélectrique déterminé à 6.5. L'une des principales limites à l'utilisation de suppléments de DAO est son processus de purification. Malgré que des formes pharmaceutiques adéquates répondant aux exigences immunitaires et de biodisponibilités aient été formulées pour la libération intestinale de l'enzyme, le faible rendement avec les méthodes conventionnelles de purification rend difficile sa disponibilité. En plus, les méthodes de purification de la diamine oxydase végétale présentées auparavant sont quelques fois longues, coûteuses, donnent de faibles rendements et restent difficilement applicables à l'échelle industrielle principalement à cause de leurs sensibilités. Face à ces limitations, le projet actuel se donnait pour objectif de développer de nouvelles approches d'extraction et de purification de l'enzyme à l'aide de système chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie d'affinité de façon à élaborer une préparation de DAO à haute stabilité pour des applications thérapeutiques. Les méthodes de purifications chromatographiques utilisées se sont montrées simples, rapides et permettaient de récupérer une enzyme avec haute activité spécifique. L'activité et l'intégrité de la DAO ont été principalement évaluées par une nouvelle procédure de zymographie développée dans le cadre de ce projet de maîtrise.

Par ailleurs, plusieurs études montrent une association activatrice entre la DAO et le pyridoxal 5'-phosphate (PLP) dérivé de la vitamine B6. Cet effet activateur se ferait soit par élimination directe du peroxyde d'hydrogène produit (par l'action de la DAO sur l'histamine) et connu comme inhibiteur de la DAO (Pietrangeli *et al.*, 2000) ou alors simplement par élimination des radicaux libres présents (Gliszczynska-Swiglo, 2006). Notre hypothèse est que l'usage d'un tel antioxydant en formulation avec l'enzyme purifiée aiderait au maintien de sa stabilité dans le temps et à l'amplification

de son activité catalytique. Nous nous sommes proposé d'évaluer l'effet de cet antioxydant non enzymatique sur l'activité de la DAO au moyen de la procédure de zymographie plus sensible que nous avons nouvellement développée. Les résultats de l'étude sont disponibles dans la partie annexe B de ce mémoire.

Un des deux objectifs principaux de ce projet de maîtrise (qui est présenté dans son ensemble à la figure 1.13) était de mettre en place une procédure alternative beaucoup plus sensible et mieux résolue pour la détection par zymographie de l'enzyme DAO. Ce nouveau protocole (figure 1.15) devrait s'appliquer également pour la détermination de l'activité enzymatique d'autres oxydases dont la réaction libre du  $H_2O_2$ . Nous pensons qu'en utilisant le DCHBS comme substrat de la HRP (enzyme utilisée pour le dosage de la DAO), celui-ci permettra une meilleure sensibilité du dosage et une plus basse limite de détection.

L'autre objectif principal était de comparer le comportement de la DAO (figure 1.14) et les rendements de séparation par chromatographie d'échange ionique (sur le matériau YMC BioPro s75) et par chromatographie d'affinité (sur Con A Sepharose® 4B).

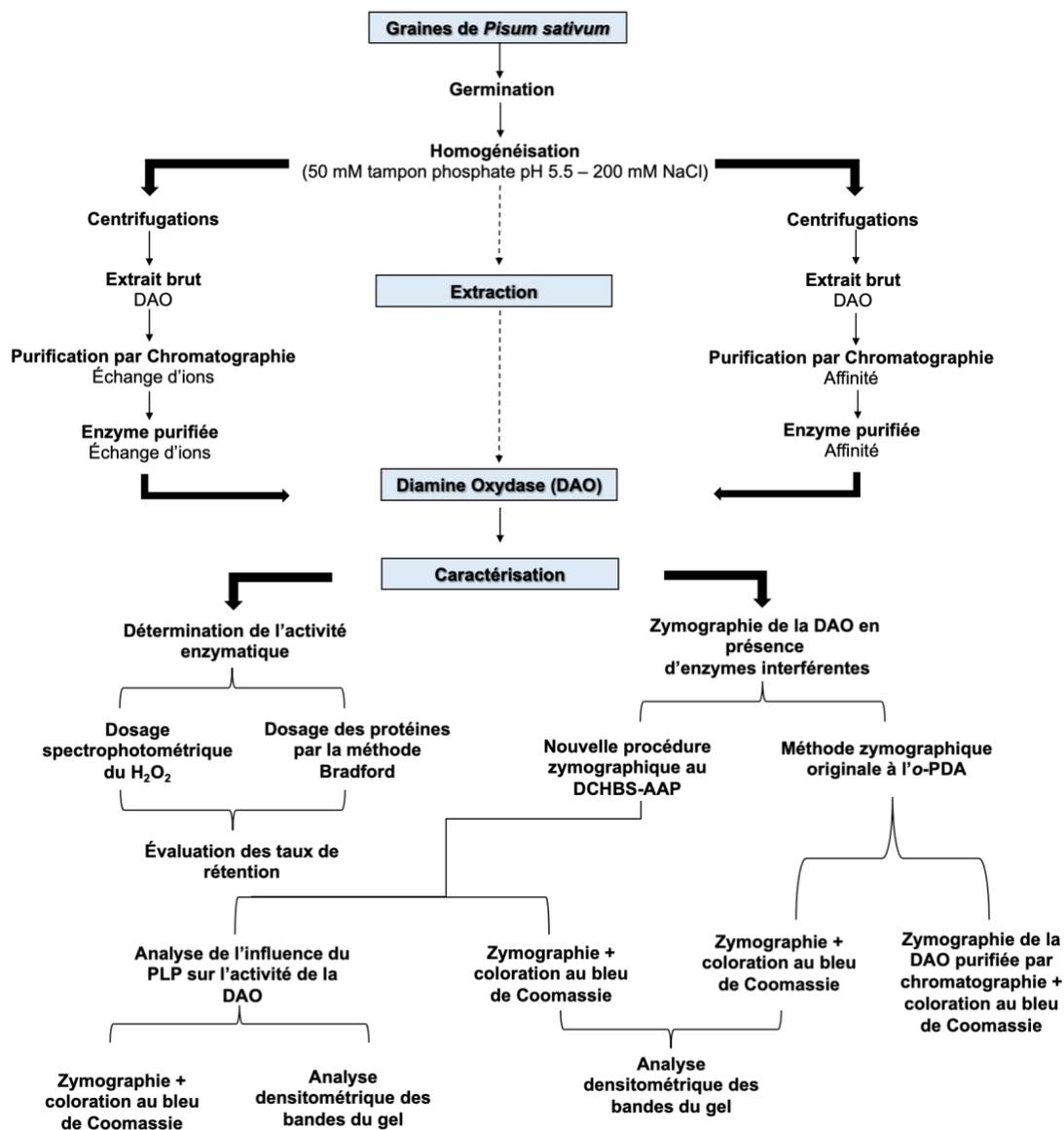


Figure 1.13 Présentation schématique des différents volets du projet de maîtrise.

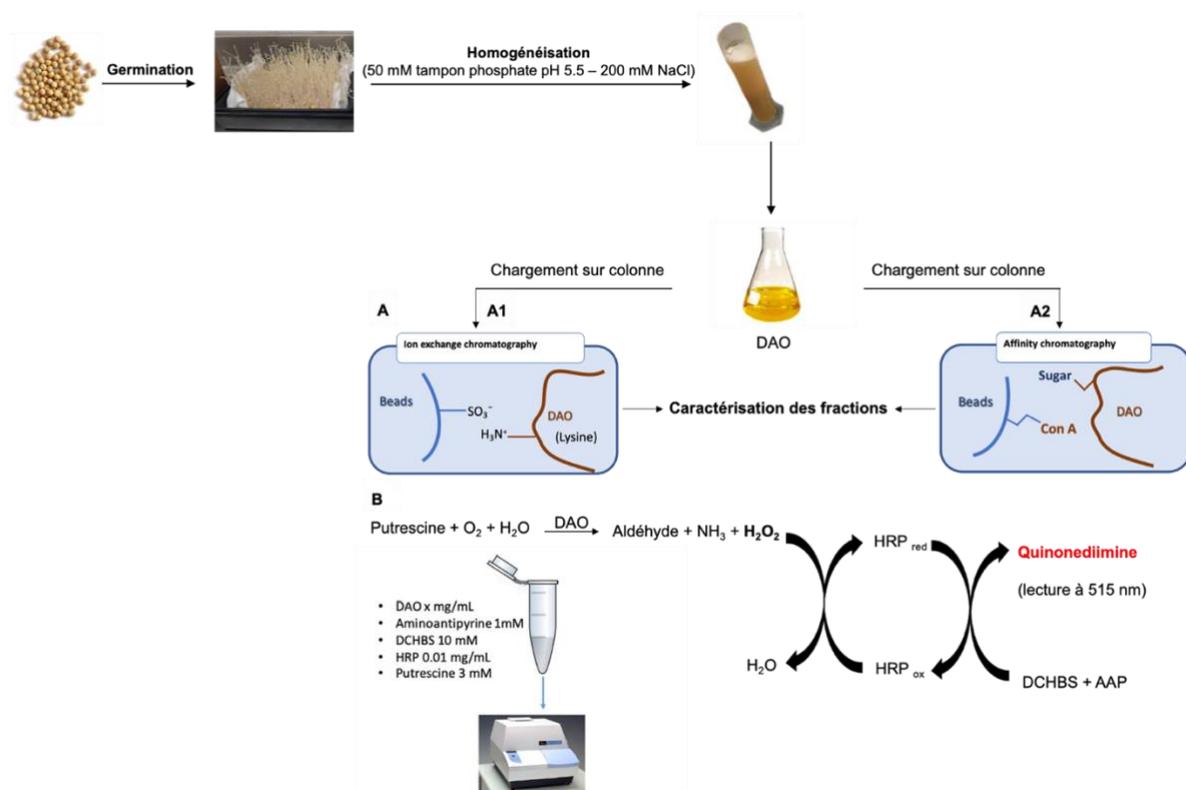


Figure 1.14 Extraction et séparation de la DAO sur des colonnes chromatographiques. Séparation de la DAO extraite à partir des pousses de *P. sativum*, comparaison de sa rétention par chromatographie sur des colonnes d'échange ionique (A1) ou d'affinité (A2) et dosage de l'activité enzymatique par spectrophotométrie (B).

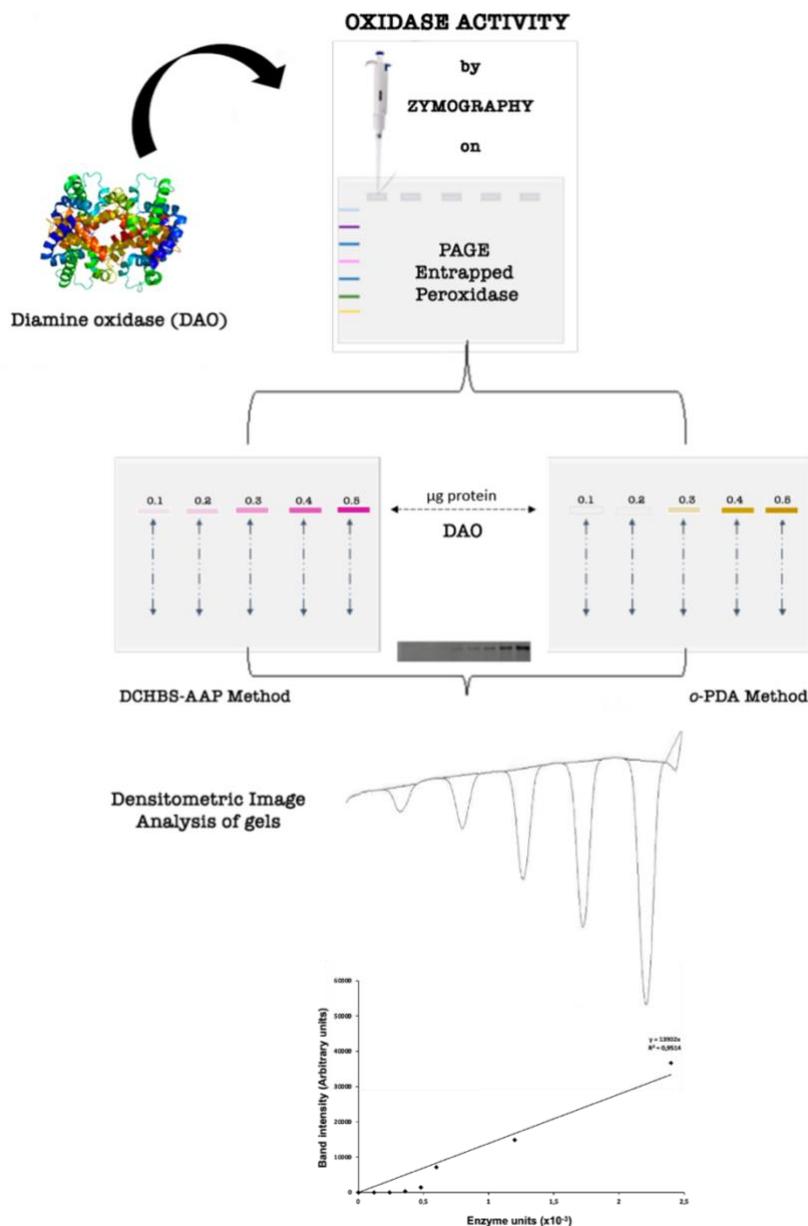


Figure 1.15 Détermination de l'activité de la DAO par zymographie. Ce procédé permet la détermination de l'activité oxydasique de la DAO et autres oxydases en présence ou en absence des enzymes interférentes (résumé graphique de l'article publié dans le journal *Analytical Biochemistry*) (Chomdom Kounga *et al.*, 2022).

## CHAPITRE II

### ARTICLE I

#### FASTER AND SENSITIVE ZYMOGRAPHIC DETECTION OF OXIDASES GENERATING HYDROGEN PEROXIDE. THE CASE OF DIAMINE OXIDASE

Paul C. Kounga<sup>1</sup>, Armelle Tchoumi<sup>1</sup>, Paola Pietrangeli<sup>2</sup>, Lucia Marcocci<sup>2</sup>,  
M. A. Mateescu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry & Centre CERMO-FC, Université du Québec à Montréal,  
CP 8888, Branch A, Montreal, Québec H3C 3P8, Canada

<sup>2</sup> Department of Biochemical Sciences, “Rossi-Fanelli”, University of Rome “La  
Sapienza”, 00185 Rome, Italy

Cet article a été publié dans la revue *Analytical Biochemistry*. Volume 648, Pages  
114676, 2022.

Doi : 10.1016/J.AB.2022.114676

---

\*Corresponding author

Mircea Alexandru Mateescu

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

Phone : --1 (514) 987 4319

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

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

Paul Morrison Chomdom, a participé l'élaboration du concept; était responsable de la rédaction du corps du manuscrit et de toutes les parties expérimentales. Il était chargé de la préparation des protocoles, du traitement des résultats et de la recherche bibliographique.

Armelle Tchoumi Neree, a participé à l'élaboration du concept et à la coordination des travaux.

Paola Pietrangeli, a participé l'élaboration du concept, à la rédaction et à la correction du manuscrit.

Lucia Marocci, a participé l'élaboration du concept, à la rédaction et à la correction du manuscrit.

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

## 2.1 Résumé

La méthode de zymographie courante pour la détection de l'activité de la diamine oxydase (DAO) a été améliorée sur le plan de la procédure de coloration dans le but d'améliorer sa sensibilité. Les deux procédures utilisent des gels SDS-PAGE contenant de la peroxydase piégée et uniformément répartie (qui ne migre pas pendant l'électrophorèse). La nouvelle approche utilise le 3,5-dichloro-2-hydroxybenzènesulfonate (DCHBS) comme substrat de la peroxydase et la 4-amino-antipyrine (AAP) comme stabilisateur de couleur et permet une détection plus sensible de la DAO par rapport à l'*o*-phénylènediamine (*o*-PDA) utilisée précédemment comme substrat de la peroxydase. La méthode ainsi améliorée apparaît plus rapide, simple et rentable. Elle peut être utilisée pour la plupart des oxydases libérant du peroxyde d'hydrogène comme produit de réaction.

Mots clés: Diamine oxydase; Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate (DCHBS); Glucose oxydase; Peroxydase; Peroxyde d'Hydrogène; Zymographie.

## 2.2 Abstract

The existing zymography method for the detection of diamine oxidase (DAO) activity has been improved by a new staining procedure with the aim to ameliorate its sensitivity. Both procedures used SDS-PAGE gels containing uniformly distributed entrapped peroxidase (that wouldn't migrate during electrophoresis). The new approach with 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate (DCHBS) as peroxidase substrate and with 4-amino-antipyrine (AAP) as color stabilizer allows a more sensitive detection of DAO when compared to the previously reported *o*-phenylenediamine (*o*-PDA) as peroxidase substrate. The newly improved method appears faster, simple

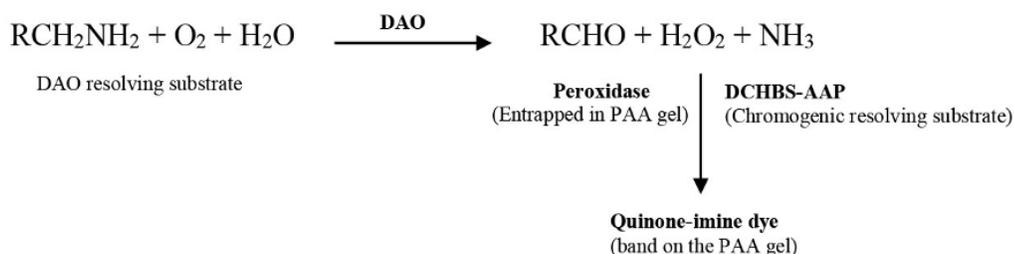
and environmentally friendly. It can be used for most of oxidases releasing hydrogen peroxide as reaction product.

Keyword: Diamine oxidase; Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate (DCHBS); Glucose oxidase; Hydrogen peroxide; Peroxidase; Zymography.

Abbreviations: AAP, 4-amino-antipyrine; DAO, diamine oxidase; DCHBS, 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate sodium; GoX, Glucose oxidase; HRP, horseradish peroxidase; *o*-PDA, ortho-phenylenediamine; PAA, polyacrylamide gel; PBS, Phosphate-buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulphate; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate; TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.

### 2.3 Introduction

Diamine oxidases (DAO) are copper-topaquinone amine oxidases (Brazeau *et al.*, 2004) able to catalyze with high efficiency the deamination of diamines, generating the corresponding aldehydes, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and ammonia (scheme 1). These enzymes purified from placenta, intestine, kidney and *Fabaceae* seedlings efficiently metabolize histamine too. For this reason, DAO from pig kidney, or from *Pisum sativum* or *Lathyrus sativus* seedlings have been proposed for oral administration to treat food histaminosis, allergies and histamine-related enteric dysfunctions (Jumarie *et al.*, 2017; Mondovi *et al.*, 2013).



Scheme 1: Detection of DAO via a coupled reaction with horseradish peroxidase (HRP) and a chromogenic substrate (DCHBS-AAP) oxidized by the released  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

However, since the hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) generated from the substrate degradation by DAO is toxic and can generate oxidative damages to cell structures (membranes, proteins, DNA, etc.), Calinescu et al (2012), Jumarie et al (2017) and Mateescu et al (2017) suggested a medication combining DAO and catalase to degrade the produced  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Calinescu *et al.*, 2012; Jumarie *et al.*, 2017; Mateescu *et al.*, 2017).

An accurate evaluation of the catalytic efficiency of DAO is needed during the enzyme purification and formulation. The large majority of methods to determine the activity of oxidase enzymes like DAO are based on the measurement of the rate of oxygen consumption or of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production. The spectrometric (Arsen et Kemp, 1964; Holmstedt *et al.*, 1961) or fluorometric (Matsumoto *et al.*, 1982) methods to determine DAO activity which are based on the dosage of  $\text{H}_2\text{O}_2$  reaction product via a peroxidase-coupled reaction, in which a peroxidase substrate is oxidized in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to a chromogenic or fluorogenic product. However, these methods cannot be used when DAO is associated with catalase because, depending on its concentration, catalase competes with the peroxidase for  $\text{H}_2\text{O}_2$ , decomposing the generated  $\text{H}_2\text{O}_2$  (its substrate) and thus perturbs the measurement of DAO activity via  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

To remedy this problem of possible interference of catalase (consume of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), as well as of other interfering molecules, a zymographic procedure for the determination of the catalytic activity of DAO has been developed in our laboratory (Ahmadifar *et al.*, 2017; Calinescu *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2018). It was based on a coupled reaction of the DAO-generated  $\text{H}_2\text{O}_2$  with a donor substrate under the catalysis of horseradish peroxidase (HRP) entrapped in polyacrylamide (PAA) gel. This zymographic approach reduces the interference of competing enzymes (such as catalase), due to different electrophoretic migration. After the electrophoretic separation, DAO was revealed following the previous zymographic methods (Ahmadifar *et al.*, 2017; Le *et al.*, 2018) by incubating the PAA gel in the developing solution containing putrescine (DAO substrate) and *o*-phenylenediamine to give colored bands on the gels due to release *in situ* of DAO-generated  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Differently to the previous methods, we propose now the 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic (DCHBS) acid sodium salt chosen as electron donor substrate of HRP. It is able to donate electron to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which then interact with 4-amino-antipyrine (AAP) leading to the formation of a quinoneimine stable pink product easily monitored on gels. The DCHBS was previously used as a chromogenic reagent in combination with AAP for the clinical determination of uric acid with urate oxidase and peroxidase (Fossati *et al.*, 1980). More recently, the DCHBS-AAP system was used for the spectrophotometric determination of DAO activity (Angelini *et al.*, 1996; Neree *et al.*, 2018; Pietrangeli *et al.*, 2012). The redox 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate dye, once oxidized, changes in color from colorless to a stable pink compound, easy to detect on the gel and to quantify the of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , in the presence of peroxidase and of 4-amino-antipyrine.

As an extension of previous works (Ahmadifar *et al.*, 2017; Calinescu *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2018), this report is aimed to develop a new zymographic detection procedure which is faster, more sensitive, and utilizes a lesser toxic reagent than the previously used *o*-PDA as peroxidase chromogenic substrate.

## 2.4 Materials and methods

### 2.4.1 Materials

Horseradish peroxidase (HRP, Type I, 96 U/mg solid), glucose oxidase (*Aspergillus niger*, 26.82 U/mg protein), putrescine (1,4-diaminobutane dihydrochloride), ortho-phenylene diamine dihydrochloride (*o*-PDA), 4-amino-antipyrine (AAP), 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate sodium (DCHBS) were from Sigma–Aldrich (St-Louis, MO, USA). *Pisum sativum* diamine oxidase (Diamaze 1.2 U/mg protein) was from IBEX Pharmaceuticals, Inc (Montreal, Canada). Bradford reagent, acrylamide/bis-acrylamide solution (29:1) and molecular weight protein standard for electrophoresis (Precision plus Protein Kaleidoscope Standards) were from Bio-Rad Laboratory (Mississauga, Ontario, Canada). All other chemicals were Reagent Grade and were used without further purification.

### 2.4.2 Characterization of DAO for zymography

#### 2.4.2.1 Protein content

The protein content was estimated by the Bio-Rad protein assay (Bradford, 1976) reagent using bovine serum albumin as the calibration standard. Same procedure was used to measure the protein content of GoX samples.

#### 2.4.2.2 Spectrophotometric assay DAO activity

DAO catalytic activity was measured by evaluating the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by oxidative deamination of 30 mM putrescine, as previously reported (Pietrangeli *et al.*, 2012). GoX activity was measured using 30 mM glucose in 0.1 M PBS (pH 7.2) determining the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in the presence of peroxidase (1 mg/mL).

#### 2.4.2.3 Preparation of SDS-PAGE gel with entrapped peroxidase for zymography

Separating polyacrylamide (PAA) gels containing SDS and entrapped HRP were prepared as previously reported (Calinescu *et al.*, 2010). Practically, to prepare the SDS-PAA gel (10% acrylamide/bis-acrylamide), the composition (approximately 5 mL) was the following: 1.7 mL of stock solution 30% acrylamide/bis-acrylamide (29:1), 1.3 mL of Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 50 µL of SDS (10%), 2 µL of TEMED, 1 mL of HRP (1 mg/mL) and 1 mL of water. Polymerization was started by the addition of 50 µL of ammonium persulfate (10%). Stacking gels with SDS, but without HRP, were prepared by mixing 0.17 mL of 30% acrylamide/bis-acrylamide (29:1), 0.13 mL of Tris-HCl 1 M (pH 6.8), 10 µL of SDS (10%), 0.68 mL of water, 1 µL of TEMED and 10 µL of ammonium persulfate (10%). All gel-forming solutions were degassed in the conventional PAGE fashion (by briefly placing them under vacuum) in order to remove the loosely dissolved air, prior to use.

#### 2.4.2.4 Sample loading and electrophoretic run

A volume of 20 µL of each sample (up to 2 mg protein/mL) and 10 µL of molecular weight standards were loaded on the PAA gels and run for 2 h (at room temperature,

120 V) using a Mini-Protean® (Bio-Rad) electrophoresis system. The electrophoresis running buffer (pH 8.8) contained 0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, and 0.1% SDS.

#### 2.4.3 Zymographic detection of DAO activity on polyacrylamide gels

After the electrophoretic run, the activity of DAO on gels was detected by treatment with a solution of 30 mM each putrescine and *o*-PDA in 50 mM PBS, pH 7.2, at 25 °C for 30 min with gentle shaking (previous method (Le *et al.*, 2018)) or for 15 min with a solution containing putrescine 30 mM (in PBS 50 mM, pH 7.2), 1.25 mM AAP and 1.25 mM DCHBS (improved procedure, here described). For the detection of GoX activity the gels were prepared and run as above indicated and incubated in 50 mM PBS, pH 7.2 containing 30 mM  $\beta$ -D glucose (as GoX substrate) with *o*-PDA (previous method), or with DCHBS-AAP (improved procedure) in similar conditions of DAO. Control gels were prepared as above and stained directly in Coomassie Brilliant Blue reagent.

The intensities of DAO and of GoX bands were quantified using the Image J software after subtraction of the background signal (band-free area of the gel). The detection limits were established experimentally as the lowest enzyme still visible on the zymography gel.

#### 2.4.4 Assessment of the protein patterns of PAA gels after zymography

In all cases, the protein patterns on the gels after zymography were established by destaining the gels with a solution of methanol 50% for 15 min and restained by incubating them in a solution of 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 in methanol:acetic acid:water (40:10:50, v/v/v). After each experiment, the zymography gels were disposed in dedicated waste recipients. To remove the excess of Coomassie

Brilliant Blue R-250, the gels were washed with a solution of methanol:acetic acid:water (20:5:75, v/v/v).

Statistics. All experiments were run with a minimum of three replicates and the shown data are representative of n=3 different experiments.

## 2.5 Results and discussion

Most of oxidases are enzymes catalyzing the oxidation of their substrates with release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The example of application here shown is for diamine oxidase, but the method can be extended for most of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing oxidases. Their catalytic activity is often determined in solution via a coupled reaction with the horseradish peroxidase and a chromogenic substrate which is oxidized by the enzyme released H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. When an oxidase is in the presence of catalase, which metabolizes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, its activity cannot be determined by the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. The previous zymographic method of revealing the enzyme as brown bands with *o*-PDA (Ahmadifar *et al.*, 2017) was carried out in order to be compared with the new improved procedure using DCHBS-AAP. Our results indicated similar migration patterns (on SDS-PAGE gels containing the entrapped peroxidase) of proteins of the molecular weight standards and of *Pisum sativum* DAO. However, different sensitivity thresholds were experimentally established depending on the resolving method (*o*-PDA or DCHBS-AAP).

After the electrophoretic run, each DAO-containing gel was stained using a developing solution that contained *o*-PDA (as previously reported) or DCHBS-AAP (this study). Each of these solutions contained the DAO enzyme substrate putrescine which during its oxidation by DAO would release the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> needed for reaction with the entrapped HRP in each gel. A comparative analysis of the different staining procedures of DAO

showed visible brown colored bands in the presence of *o*-PDA as chromogenic substrate (figure 2.1A) with a detection limit of  $0.60 \times 10^{-3}$  U, corresponding to 0.5  $\mu$ g loaded protein (supplementary data, figure 2.4A on the gel). Under the same conditions but with DCHBS as the HRP substrate and AAP (figure 2.1C), visible pink colored bands were found with a detection limit of  $0.12 \times 10^{-3}$  U, corresponding to 0.1  $\mu$ g of DAO protein (supplementary data, figure 2.4B). We also noticed that the destaining of the zymographic gels with methanol 50% prior to the restaining with Coomassie Brilliant Blue affected only in a limited extent the detection of protein (figures 2.1B and 2.1D).

DAO bands were identified on the SDS-PAA gel as a result of a bi-enzymatic local reaction involving DAO-generated  $H_2O_2$  and HRP. It is worth noting that, when trapped in the PAA gel, HRP will not migrate during the electrophoresis (Calinescu *et al.*, 2010; Ugarova *et al.*, 1976). This immobilization allows the *in situ* interaction between the  $H_2O_2$  (the degradation product of putrescine by DAO), and the HRP chromogenic substrates (*o*-PDA or DCHBS-AAP) under the HRP catalysis, at the level of the electrophoretic band. As experimental evidence, no migration at all of HRP was found in the PAA gel during the electrophoresis run. This was confirmed by electrophoresis on a gel containing entrapped peroxidase only (but at a higher concentration, such as to be detected by Coomassie Brilliant Blue). The result showed a homogeneously blue, suggesting that no migration of HRP had occurred (data not shown). Our explanation is that peroxidase macromolecule can be involved in the copolymerization of acrylamide and bis-acrylamide. In fact, the prosthetic group of peroxidase (protoporphyrin, also called protohemin IX) possesses two vinyl groups  $-CH=CH_2$ . Both of these vinyl groups can be involved in the radical polymerization of acrylamide and this explains why the enzyme is strongly immobilized by “covalent entrapment” on the gel.

Checking the substrate (donor of electron) that can be oxidized by HRP, we can observe the production on the gel of colored products such as azo-aniline (from *o*-PDA) or quinoneimine (from DCHBS-AAP) with intensities proportional to the amount of released H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulting from the DAO activity. Since the concentration of generated-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is stoichiometrically equivalent with the number of moles of putrescine being oxidized by DAO, the color intensity of the spots is indicative of DAO oxidase activity. These products are visible on the zymographic gel as single bands, brown for the method with *o*-PDA (figure 2.1A) or pink for the method with DCHBS-AAP (figure 2.1C) and their intensities are related to the enzyme activity in a linear dependency as shown by the densitometric data of the gels provided by Image J analysis software (supplementary data, figures 2.4 and 2.5).

The above results suggest that the newly developed zymographic method using DCHBS-AAP has a lower detection limit and an improved resolution. To further explain this, it is supposed that, differently from the HRP oxidizing reaction of *o*-PDA with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the oxidation of DCHBS-AAP with HRP produces first an oxidation of DCHBS followed by condensation of oxidized DCHBS with AAP to form a stable pink dye product (Artiss et Entwistle, 1981 ; Fossati *et al.*, 1980), which makes easier its detection on gel electrophoresis.

The densitometric analysis for zymography using either *o*-PDA or DCHBS-AAP are in the same order of magnitude, but the values of densitometric intensity (supplementary data) obtained by the image analysis showed that for similar quantities of proteins, the DCHBS-AAP substrate (supplementary data, figure 2.4B) gives a more sensitive determination and a better resolution than the *o*-PDA (supplementary data, figure 2.4A). Minor differences may be explained by a distinct molecular extinction

coefficient of the oxidized product of *o*-PDA (quinonimine) and of DCHBS-AAP (azo-aniline). The improved method with DCHBS-AAP, here presented, also showed (supplementary data, figure 2.4B) a better linearity ( $R^2$  0.9902) compared to the original one (supplementary data, figure 2.4A) with *o*-PDA ( $R^2$  0.9514) for dependency of the spots intensities with the DAO activity. It is worth to note that, as first proposed by Ahmadifar *et al.*, 2017 (Ahmadifar *et al.*, 2017), the zymographic approach presented in this report can also be used for the determination of real specific activity of either DAO or other oxidases releasing  $H_2O_2$ .

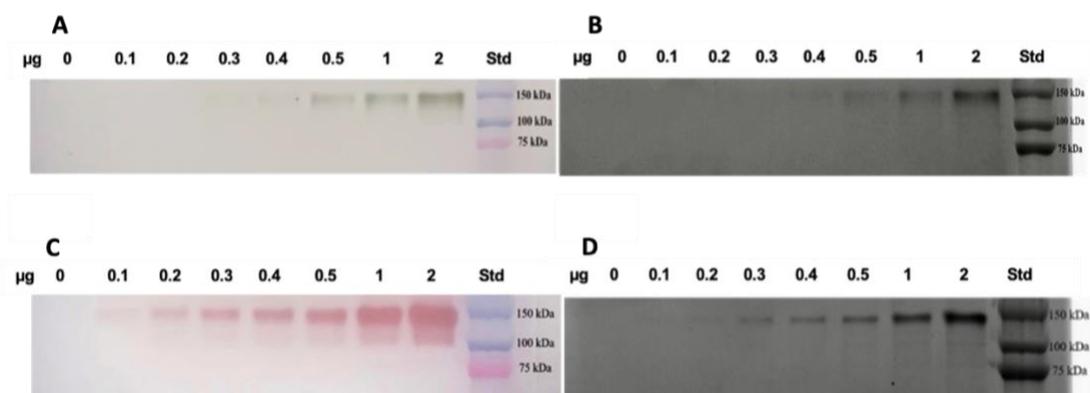


Figure 2.1 Detection of DAO activity with *o*-PDA or DCHBS-AAP method. Zymography of DAO (0-2 µg/well) developed with *o*-PDA (A) or with DCHBS-AAP (C) for DAO activity and respectively retained using Coomassie Brilliant Blue (B and D) on SDS-PAA (10%) gel electrophoresis (representative of  $n = 3$  runs).

As a control (supplementary data, figure 2.3), similar amounts of protein have been loaded on SDS-PAA gel (10%) with entrapped peroxidase, directly stained (without resolving substrates) and thus no evidence of enzymatic activity on the gel was found.

Moreover, this gel revealed a similar pattern of protein bands to that obtained after zymography, suggesting that the entrapped peroxidase had no effect on the electrophoretic migration properties of proteins and thus didn't affect the zymographic detection of protein bands.

Zymographic runs with Glucose oxidase using *o*-PDA (figure 2.2A) or DCHBS-AAP (figure 2.2C) as resolving substrates showed a detection limit lower ( $0.2 \times 10^{-2}$  U) with DCHBS-AAP, whereas with *o*-PDA the detection limit was of  $0.5 \times 10^{-2}$  U.

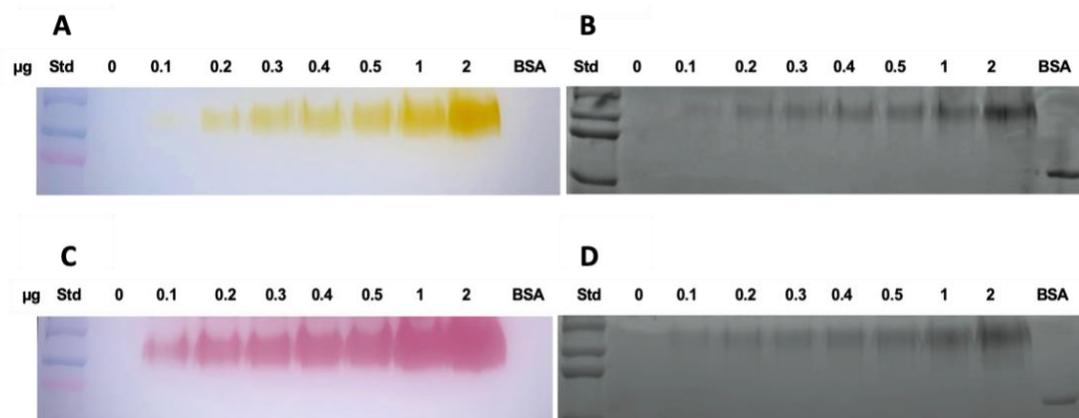


Figure 2.2 Detection of GoX activity with *o*-PDA or DCHBS-AAP method. Zymography of GoX (0-2 µg/well) developed with *o*-PDA (A) or with DCHBS-AAP (C) for GoX activity and respectively restained using Coomassie Brilliant Blue (B and D) on SDS-PAA (10%) gel electrophoresis (representative of  $n = 3$  runs).

An important aspect to note is that the DCHBS-AAP is less toxic for the laboratory staff and for the environmental media than the *o*-PDA (suspected to induce genetic defects or cancer (Matsumoto *et al.*, 2012)). For instance, the reported oral LD50 in rat

are respectively 1700 mg/Kg for AAP and 510 mg/Kg for *o*-PDA. At the same time, no acute toxicity information was found for DCHBS, which appears as environmentally friendly.

In conclusion, the main advantages of this improved zymography method are: a lower detection limit, a faster staining procedure and less environmental impact with the resolving DCHBS-AAP than with the *o*-PDA, as peroxidase substrate.

## 2.6 Appendices - Supplementary Data

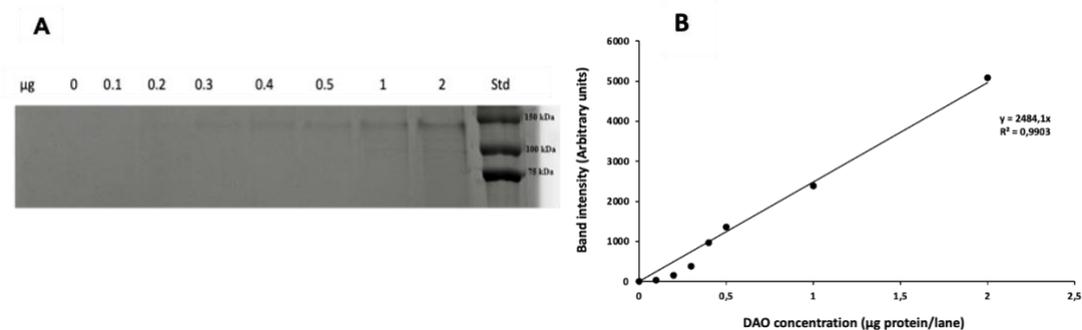


Figure 2.3 Electrophoretic pattern of DAO (0–2 µg/well) on non-resolving PAA gel. Electrophoretic pattern of DAO stained with Coomassie Brilliant Blue on SDS-PAA (10%) gel electrophoresis (A) and the corresponding densitometric analysis (B) by the ImageJ program (representative of  $n = 3$  runs).

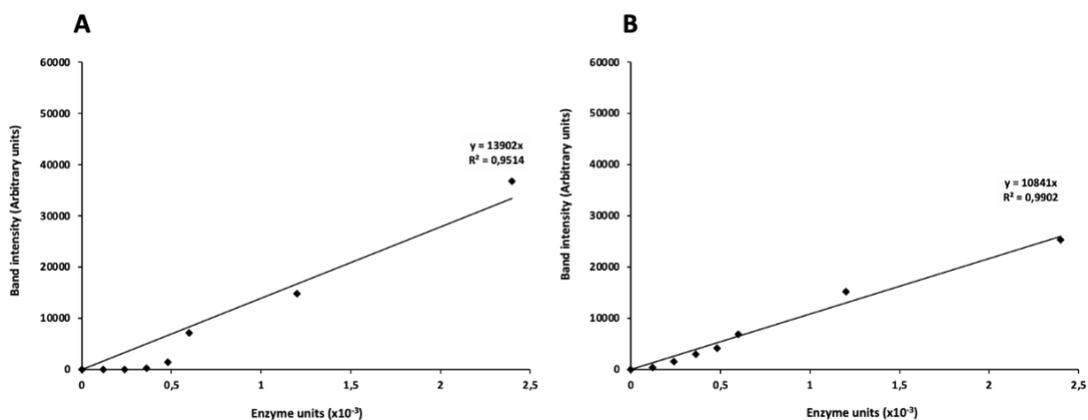


Figure 2.4 Images analysis of DAO zymography gel. Densitometric analysis of DAO run on SDS-PAA zymographic gels (10%) after staining procedure *o*-PDA (A) or with DCHBS-AAP (B). Each densitometric analysis was performed by the ImageJ program (representative of  $n = 3$  runs).

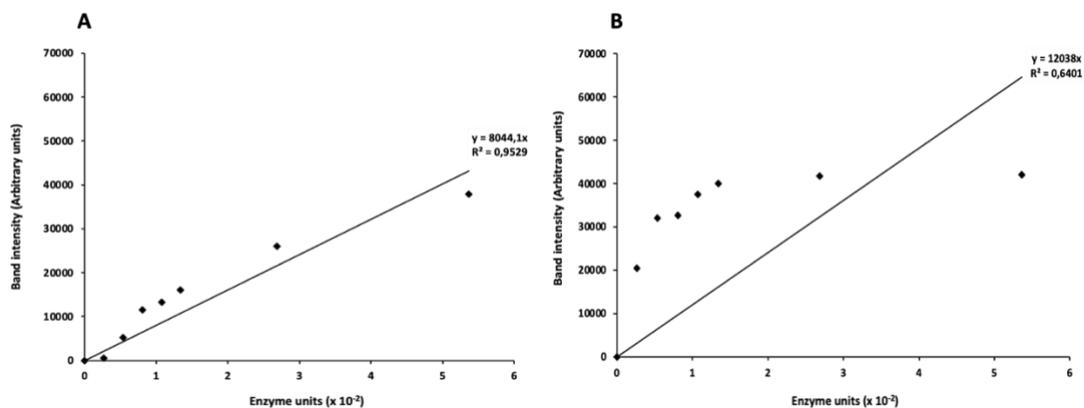


Figure 2.5 Images analysis of GoX zymography gel. Densitometric analysis of GoX run on SDS-PAA zymographic gels (10%) after staining procedure *o*-PDA (A) or with DCHBS-AAP (B). Each densitometric analysis was performed by the ImageJ program (representative of  $n = 3$  runs).

## 2.7 Acknowledgements

This project was supported by the “Fondation Courtois” (Québec, Canada), by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to MAM (grant number 06919) and by a joint collaborative project from the Ministère des Relations Internationales et de la Francophonie (MRIF, Québec, Canada) and Ministry of Foreign Affairs and International Cooperation (Italy) to MAM and LM. PCK was a holder of a scholarship from CRIPA/FRQNT (Fonds de recherche Nature et Technologies, Québec, Canada). ATN was a holder of a scholarship from the Fonds de la Recherche du Québec-Santé (Québec, Canada), and of a Mobility Fellowship from CRIPA/FRQNT (Québec, Canada).

## CHAPITRE III

### ARTICLE II

# ENRICHMENT OF VEGETAL DIAMINE OXIDASE BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OR BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY. A COMPARATIVE STUDY

Paul C. Kounga<sup>1</sup>, Armelle Tchoumi<sup>1</sup>, Paola Pietrangeli<sup>2</sup>, Lucia Marcocci<sup>2</sup>,  
Pompilia Ispas-Szabo, M. A. Mateescu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry & Centre CERMO-FC, Université du Québec à Montréal,  
CP 8888, Branch A, Montreal, Québec H3C 3P8, Canada

<sup>2</sup> Department of Biochemical Sciences, “Rossi-Fanelli”, University of Rome “La  
Sapienza”, 00185 Rome, Italy

\* Manuscrit en préparation pour soumission à la revue *Preparative Biochemistry & Biotechnology*.

---

\*Corresponding author

Mircea Alexandru Mateescu

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

Phone : --1 (514) 987 4319

e-mail : [mateescu.m-alexandru@uqam.ca](mailto:mateescu.m-alexandru@uqam.ca)

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

Paul Morrison Chomdom, a participé l'élaboration du concept; traitement des résultats; était responsable de la rédaction du corps du manuscrit et de toutes les parties expérimentales.

Armelle Tchoumi Neree, a participé à l'élaboration du concept et à la coordination des travaux.

Paola Pietrangeli, a participé l'élaboration du concept, à la rédaction et à la correction du manuscrit.

Lucia Marocci, a participé l'élaboration du concept, à la rédaction et à la correction du manuscrit.

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

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

### 3.1 Résumé

La diamine oxydase (DAO), l'enzyme qui catalyse la désamination oxydative de l'histamine et d'autres diamines, a été séparée par chromatographie échangeuse d'ions et par chromatographie d'affinité en utilisant respectivement les colonnes YMC BioPro s75 et Con A Sepharose dans le but de trouver une méthode simple et robuste pour la purification. Au cours de toutes les étapes de séparation, l'enzyme a présenté un profil chromatographique presque similaire et des facteurs de purification de 11 et 10 fois respectivement. En outre, l'enzyme purifiée qui migre aux mêmes positions a présenté une activité enzymatique proche sur le gel zymographique (contenant une peroxydase piégée). Ces observations sont utiles pour la purification soignée de la DAO végétale, car la chromatographie d'affinité, grâce à son interaction non ionique, semble être plus robuste dans des conditions rigoureuses.

Mots clés : Concanavoline A Sepharose résine; Diamine oxydase (DAO); Purification d'enzyme; Résine sulfonate; Zymographie.

### 3.2 Abstract

Diamine oxidase (DAO), the enzyme catalyzing the oxidative deamination of histamine and other diamines, was separated by ion exchange chromatography and by affinity chromatography using respectively YMC BioPro s75 and Con A Sepharose columns in need of a simple and robust method for the purification. During all purification steps, the enzyme showed almost similar chromatographic patterns and purification factors of 11 and 10-fold, respectively. In addition, the purified enzyme which migrates to the same positions exhibited a close enzyme activity on zymographic gel (containing an entrapped peroxidase). These findings may be relevant for the

meticulous purification of vegetal DAO as affinity chromatography due to its non-ionic interaction appears to be more robust under stringent conditions.

Keywords: Concanavalin A Sepharose resin; Diamine oxidase (DAO); Enzyme purification; Sulfonate resin; Zymography.

Abbreviations: AAP, 4-amino-antipyrine; Con A, Concanavalin A; DAO, diamine oxidase; DCHBS, 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate sodium; HRP, horseradish peroxidase; *o*-PDA, ortho-phenylenediamine; PAA, polyacrylamide gel; PBS, Phosphate-buffered saline; pkDAO, pig kidney diamine oxidase; PsDAO, *Pisum sativum* diamine oxidase; SDS, sodium dodecyl sulphate; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate; TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.

### 3.3 Introduction

Amine oxidases (AOs) are ubiquitous enzymes widely distributed among living organisms and represent a family of enzymes catalyzing the oxidation of mono-, di-, and polyamines into the corresponding aldehydes. These various sources of enzymes include microorganisms, animals and plants (particularly distributed throughout *Leguminosae* and *Gramineae*). The enzyme present in leguminous plants (copper-containing, CuAOs) has a broad specificity oxidizing mono-, di- and polyamines at the primary amino group whereas the enzyme present in *Gramineae* (FAD-containing, PAO) is specific for polyamines, also oxidizing them at the secondary amino group (Smith, 1985).

DAO was earlier considered to be a cytoplasmic enzyme due to its high extractability and high solubility (Takano *et al.*, 1970) but Federico *et al.*, 1985 (Federico *et al.*, 1985; Federico et Angelini, 1986) provided evidence that the enzyme is localised mainly in the membranes and cell wall. It has been also suggested that the enzyme may play a role in morphogenesis (Smith, 1985) and in providing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> required for lignification (Federico et Angelini, 1986) or mobilization of seed reserves (Flores et Filner, 1985; Macholám et Minář, 2008). It is well known that DAO is a globular homodimeric glycoprotein where each monomer contains a copper (II) ion and Topaquinone (TPQ) cofactor due to the tyrosine residue during the post-translation modification (Klinman et Mu, 1994). It catalyzes the oxidative deamination of primary biogenic amine group to corresponding aldehyde with equimolar consumption of oxygen and production of corresponding aldehyde, hydrogen peroxide and ammonia (Brazeau *et al.*, 2004).

The enzymes may be extracted from all living organism for analytical or biomedical applications (McGowan et Muir, 1971; Yang *et al.*, 2012). In the last decades, several reports have shown the potential of diamine oxidase (DAO, EC 1.4.3.22) to treat individuals with histamine intolerance condition (Comas-Basté *et al.*, 2020; Hrubisko *et al.*, 2021; Kovacova-Hanuszkova *et al.*, 2015; Mateescu *et al.*, 2017) and also present its beneficial effect against anaphylactic shock, circulatory and inflammatory disorders (Masini *et al.*, 2007). In fact, DAO supplements orally administered could help in the treatment of food histaminosis and other histamine-related dysfunctions caused by a defective histamine metabolism. As diverse commercial forms of DAO are available under different brand names as food supplements, no pharmaceutical treatment is yet available to control the level of intestinal histamine. The vegetal origin (extracted from pea) DAO has been proposed as a therapeutic agent to treat histamine-related

dysfunctions (Masini *et al.*, 2007; Mondovi *et al.*, 2013; Neree *et al.*, 2020). While exhibiting higher specific activity and due to its non-animal source, this extract maybe better accepted by consumers.

Several purification methods of different sources of DAO enzyme have been reported. Mondovi *et al.*, 1967 (Mondovì *et al.*, 1967) first proposed precipitation methods with ammonium sulfate followed by affinity chromatography on diethylaminoethyl cellulose to purify pig kidney DAO, the first exogenous supply of DAO enzyme to treat histamine intolerance in individuals. Then, from gel-filtration chromatography (Lee *et al.*, 2008) to more recently ion exchange chromatography (Yang *et al.*, 2012), several purification approaches have been suggested but without leading to a simple or efficient production of DAO of vegetal source. Although these methods have reduced the overall cost of DAO, a substantial fraction of the manufacturing cost still comes from purifications processes. Then, the necessity of purifications processes, to efficiently isolate DAO, is required in order to fill the production gap. Ion exchange chromatography which is a pH dependent method would potentially stress the enzyme purification process whereas affinity chromatography due to its non-ionic interaction appears to be more robust for purification under stringent conditions.

This report was aimed to develop an efficient, cost-effective and simplified approach for the chromatographic purification of DAO. The objective was to follow the singular behavior of DAO on ion exchange and on affinity chromatographic materials in order to compare the purification yields under various conditions. The results should provide valuable information for the accurate further purification of DAO from pea seedlings.

## 3.4 Experimental

### 3.4.1 Materials

Horseradish peroxidase (HRP, Type I, 96 U/mg solid), putrescine (1,4-diaminobutane dihydrochloride), ortho-phenylene diamine dihydrochloride (*o*-PDA), 4-amino-antipyrine (AAP), 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate:sodium salt (DCHBS), and the chromatographic material Con A Sepharose<sup>®</sup> 4B were from Sigma–Aldrich (St-Louis, MO, USA). Bradford reagent, Acrylamide/bis-acrylamide solution (29:1) and Precision plus Protein Kaleidoscope Standards were from Bio-Rad Laboratory (Mississauga, Ontario, Canada). Diamaze (1.2 U/mg protein) was from IBEX Pharmaceuticals, Inc., Canada. The chromatographic ion exchange resin YMC BioPro S75 was from YMC Co., Ltd. (Tokyo, Japan) and the columns were from Analytichem International (Harbor City, California, USA). For purification assays, *Pisum sativum* seeds were bought in a local market (Montreal, QC). All other chemicals were Reagent Grade and were used without further purification.

### 3.4.2 Methods

#### 3.4.2.1 DAO characterization

PsDAO (Diamaze 1.2 U/mg protein) used for the enrichment was from IBEX Pharmaceuticals, Inc (Montreal, Canada). The protein concentrations were determined by the Bio-Rad assay with bovine serum albumin as the standard. DAO catalytic activity was assayed by the rate of generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during the oxidation of putrescine in 0.1 M phosphate buffer at pH 7 (PBS at pH 7.2) by the DCHBS-AAP-HRP method (Pietrangeli *et al.*, 2007, 2012).

### 3.4.2.2 Study of chromatographic behavior of DAO on YMC BioPro s75 ion exchange and on Con A Sepharose<sup>®</sup> 4B affinity columns

#### *Preparation of column, equilibration, and conservation*

Volumes of 15 mL of each resin (gel bed) were loaded under the same conditions (at 25 °C) onto the chromatographic columns. Prior to loading, the resins were washed two times with 5 x column volumes of nanopure water (H<sub>2</sub>O) to remove storage solutions. Then, the packed columns were equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 5.5 for YMC-BioPro s75 or with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> for Con A Sepharose<sup>®</sup> 4B.

After use, YMC-BioPro resin was washed successively with 5 column volumes of the following solutions: 1 M NaCl, 0.1 M of NaOH, 1 M NaOH and nanopure water (H<sub>2</sub>O). For a long-term period, the resin was conserved in 20 % ethanol. Con A Sepharose resin: the resin was washed after use with 5 x column volumes of 0.1 M Tris, pH 8.5, containing 0.5 M NaCl followed by 0.1 M sodium acetate, pH 4.5, containing 1 M NaCl and then conserved in 0.1 M acetate buffer, pH 6, containing 1 M NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, with 20% ethanol as a preservative. Each resin has been stored according to the manufacturer's recommendations, at 4 °C.

#### *Chromatographic separation*

The protein solution: the commercial partially purified DAO (Diamaze 1.2 U/mg protein) was diluted (1:10) with the starting buffer (0.1 M PBS, pH 7.2) and loaded onto the column. A total amount of 8.6 U was loaded on each column. Then, after calculation of V<sub>0</sub>, each column was washed twice with the corresponding equilibration buffer until the absorbance (A<sub>280 nm</sub>) equivalent to that of the loading solution.

Finally, DAO was eluted from each resin with the appropriate elution buffer: 50 mM PBS, pH 5.5, containing 0.3 M NaCl for YMC-BioPro s75 or with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl and 0.3 M Glucose for Con A Sepharose. The eluted fractions (brown color) were collected for spectrophotometric analysis.

#### *Characterization of DAO obtained by both separation methods*

The protein content was estimated by Bradford method (Bradford, 1976) using BSA as the calibration standard. DAO catalytic activity was measured by evaluating the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation assuming an extinction coefficient of  $2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Pietrangeli *et al.*, 2007, 2012). DAO activity was expressed in enzymatic units and 1 unit corresponded to the amount of AO catalysing the oxidation of 1  $\mu\text{mol}$  putrescine per minute.

#### *Zymography of DAO for both methods on PAA gels*

*i) Preparation of SDS-PAA gel with entrapped peroxidase for zymography.* Separating polyacrylamide (PAA) gels containing SDS and entrapped HRP were prepared as previously reported (Calinescu *et al.*, 2010). Practically, to prepare the SDS-PAA gel (10%), the composition (approximately 5 mL) was the following: 1 mL of HRP (1 mg/mL) added to 1.7 mL of stock solution of 30% acrylamide/bis-acrylamide (29:1), 1.3 mL of Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 50  $\mu\text{L}$  of SDS (10%), 2  $\mu\text{L}$  of TEMED and 1 mL of water. Polymerization was started by the addition of 50  $\mu\text{L}$  of ammonium persulfate (10%). Stacking gels with SDS, but without HRP, were prepared by mixing 0.17 mL of 30% acrylamide/bis-acrylamide (29:1), 0.13 mL of Tris-HCl 1 M (pH 6.8), 10  $\mu\text{L}$  of SDS (10%), 0.68 mL of water, 1  $\mu\text{L}$  of TEMED and 10  $\mu\text{L}$  of ammonium persulfate (10%). All gel-forming solutions were normally degassed in the conventional PAGE

fashion (by briefly placing them under vacuum) in order to remove the loosely dissolved air, prior to use.

*ii) Sample loading and electrophoretic run.* A volume of 20  $\mu\text{L}$  of each sample (containing 0.5  $\mu\text{g}$  protein) and a volume of 10  $\mu\text{L}$  of molecular weight standards (Precision plus Protein Kaleidoscope) were loaded on the PAA gels and run for 2 h (at room temperature, 120 V) using a Mini-Protean<sup>®</sup> (Bio-Rad) electrophoresis system. The electrophoresis running buffer (pH 8.8) contained 0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, and 0.1% SDS.

*iii) Detection of the DAO activity bands on the gels.* After the electrophoretic run, the activity of DAO on the gel was detected by treating the gels for 15 min at 25 °C with a solution containing putrescine 30 mM (in PBS 50 mM, pH 7.2), 1.25 mM AAP and 1.25 mM DCHBS (improved procedure, chapter 2). As a blank, another gel was directly stained with Coomassie blue reagent (without previously treatment with the resolving substrates of DAO).

*iv) Assessment of the protein patterns of PAA gels after zymography.* To establish the protein pattern after zymography, the gels were destained with methanol 50% and restained directly with Coomassie blue solution containing (40:10:50, v/v/v) methanol-acetic acid-water and 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Chomdom Kounga *et al.*, 2022). To remove the excess of Coomassie reagent, the gels were washed with a solution of methanol:acetic acid:water (20:5:75, v/v/v).

#### 3.4.2.3 Study of the effect of Con A on DAO activity

Con A:enzyme complex was prepared as previously reported (Ishizaki & Yasunobu, 1980) with slight modification. Briefly, an excess of concanavalin A (up to 0.3 mg protein) and DAO enzyme (0.2 mg protein) was incubated in 2 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0 at 25 °C for several hours (up to 36 h). Then, the enzyme activity of the expected complex was measured by spectrophotometry, as described above.

All experiments were run with a minimum of three replicates. Where relevant, data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

### 3.5 Results and discussion: comparative data on DAO enriched using YMC BioPro s75 and Con A Sepharose<sup>®</sup> 4B

The current method of vegetal DAO purification consists in ion exchange chromatography on YMC BioPro s75 which allows the enzyme to be enriched (Blemur *et al.*, 2016). This ion exchange chromatographic procedure was used to purify DAO from *Lathyrus sativus*, but to the best of our knowledge, not from *Pisum sativum*.

The data here reported showed a PsDAO purification factor of ~11-fold with this chromatography material (Table 3.1), and a specific activity of enriched enzyme of 13.6 U/mg of protein. The sulfonate resin YMC-BioPro s75 used for the purification is charged with negative anion group  $-SO_3^-$  and the interaction with the amino groups ( $-NH_3^+$  *e.g.* from the Lysine residues) of the DAO allows its retention on the column. The affinity chromatography on Con A Sepharose has been previously used as a step for the purification of DAO from pig kidney: pkDAO (Mondovi *et al.*, 1967; Schwelberger *et al.*, 1997) but, as far as we know, it was not used to purify the vegetal

DAO. The result (Table 3.2) obtained on a Con A Sepharose in identical conditions as on YMC BioPro s75 column (same PsDAO samples, same gel bed volume, same elution rate) showed a similar purification factor of ~10-fold with a specific activity of 12.1 U/mg of protein. In both cases, almost similar chromatographic patterns were obtained (figure 3.1), with a major peak of the eluted PsDAO activity.

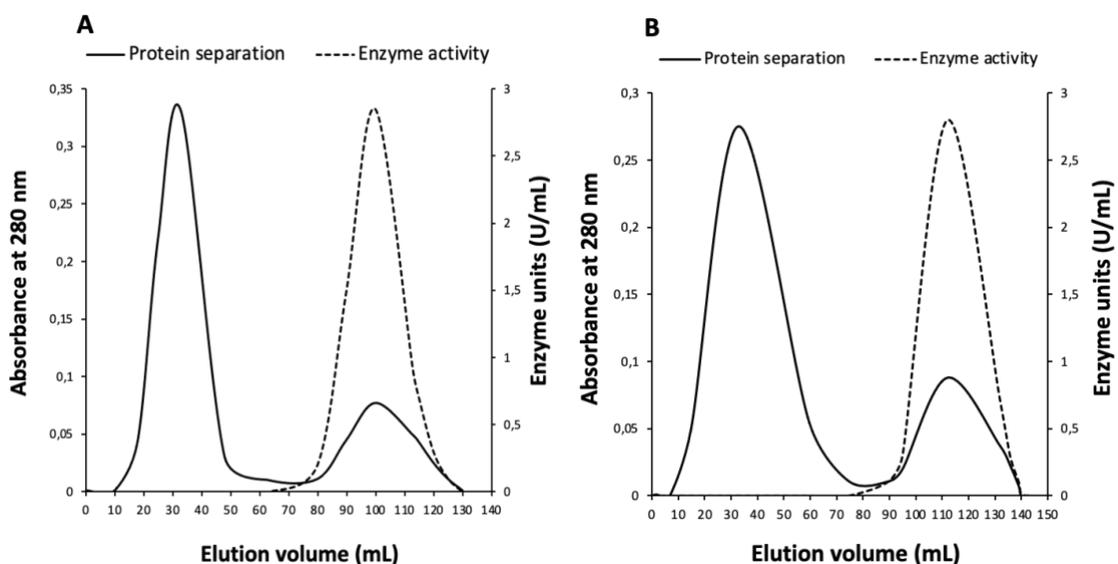


Figure 3.1 Chromatogram of purified DAO using BioPro s75 (A) and using Con A Sepharose 4B column (B).

The enzyme (7.15 mg, 1.2 U/mg) was applied onto each chromatographic column which had previously been equilibrated with their buffer. Each column was first washed with the equilibration buffer. Then, DAO enzyme was eluted with the corresponding elution buffer: 50 mM PBS, pH 5.5, containing 0.3 M NaCl for YMC-BioPro s75 (A) or 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl and 0.3 M Glucose for Con A Sepharose (B). Fractions (2.0 mL) were collected, and absorbance at 280 nm (—) and enzyme activity (---) were measured.

In terms of DAO retention (figure 3.2), anionic YMC BioPro s75 resin showed a retention of 76.6% while Con A Sepharose affinity resin showed a close retention of 72.3%. It is worth to note that the retention capacities (72% - 76%) is in line with other chromatographic methods (Kluetz *et al.*, 1980; McGuirl *et al.*, 1994) and that the specific activity of enriched DAO is comparable with these reported for DAO of other sources (Rinaldi *et al.*, 1982). For pkDAO the content of carbohydrate moiety in terms of neutral hexoses (glucose, mannose, etc.), N-acetylneuraminic acid, glucosamine and N-acetylglucosamine was established (Shah and Ali, 1988) as respectively 5.0, 0.25, 3.25, 2.61% (w/w). Moreover, DAO was showed to exert a high affinity for Con A with a stoichiometry of 1:4.6 (Shah and Ali, 1988) which may further explain the successful retention of DAO from Diamaze extract.

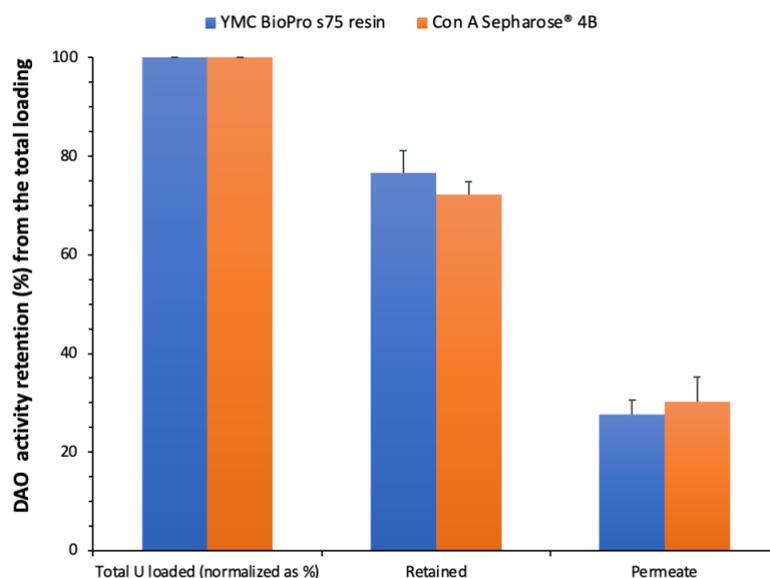


Figure 3.2 The retention of DAO on chromatographic columns. DAO on chromatographic YMC BioPro s75 (blue) and on Con A Sepharose® 4B (orange), expressed as percentage (%) of retained enzyme units (U) from the total number of loaded U of commercial Diamaze.

Tableau 3.1 Purification of DAO by ion exchange chromatography on YMC BioPro s75 anionic resin.

Samples	Enzyme activity (U/mL)	Protein conc (mg/mL)	Total Units (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Diamaze extract	0.86	0.712	8.60	1.21	1	100%
Permeate	0.01	0.588	0.11	0.02	0.02	1%
Washed	0.01	0.031	0.31	0.17	0.14	4%
Eluted	3.59	0.264	5.93	13.61	11.27	69%

Tableau 3.2 Purification of DAO by affinity chromatography on Con A Sepharose resin.

Samples	Enzyme activity (U/mL)	Protein conc (mg/mL)	Total Units (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Diamaze extract	0.86	0.712	8.60	1.21	1	100%
Permeate	0.01	0.488	0.12	0.03	0.02	1%
Washed	0.01	0.041	0.41	0.17	0.14	5%
Eluted	2.87	0.237	6.03	12.10	10.01	70%

Furthermore, the pooled eluted fractions of each column were examined in zymography for DAO activity (figure 3.3) and in SDS-PAGE for protein pattern (figure 3.4). Zymography of DAO was recently proposed as an analytical technique to evaluate DAO activity on polyacrylamide gel electrophoresis containing entrapped peroxidase via a coupled reaction based on measurement of hydrogen peroxide liberate *in situ* by DAO (Ahmadifar *et al.*, 2017; Chomdom Kounga *et al.*, 2022). Analysis of the purified products from each chromatographic run by the DCHBS-AAP zymography (figure 3.3) method showed certain similarities between the two materials.

It was found that DAO samples before and after the chromatographic runs exhibited as expected a single band around 150 kDa on the gels. This band corresponds to the reported molecular weight of *Pisum sativum* DAO (McGuirl *et al.*, 1994). It is worth to mention that the use of SDS (anionic detergent) denatures the proteins and allows their electrophoretic separation with a good resolution (due to negative charges conferred by SDS) but seems not inducing the separation of dimers.

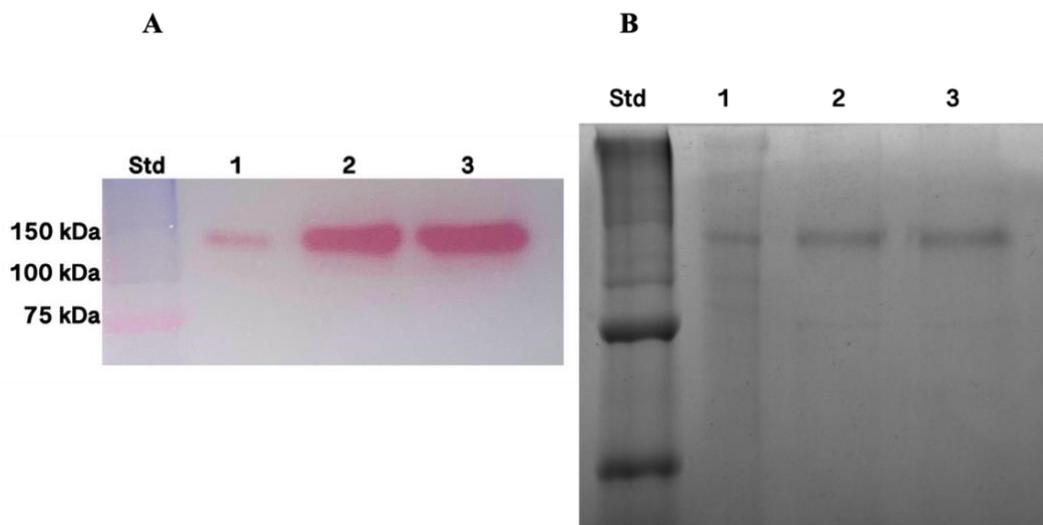


Figure 3.3 Zymography of the purified DAO.

An extract of 7.2 mg protein from Diamaze was chromatographed separately on two columns (YMC BioPro s75 and Con A Sepharose<sup>®</sup> 4B). Brownish fractions were pooled and analyzed. An amount of 0.5  $\mu$ g protein of each separated sample was assayed by zymography (A) followed by the gel destaining with methanol 50% prior to staining with Coomassie brilliant blue (B) with the lanes: Molecular weight standard (Std), Diamaze DAO extract (1), DAO fraction from YMC resin (2), DAO fraction from Con A Sepharose resin (3).

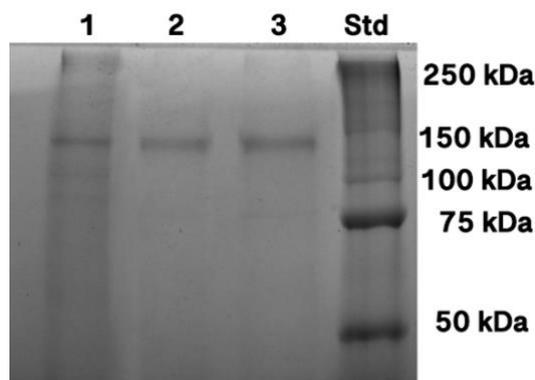


Figure 3.3 SDS-PAGE electrophoresis of the purified DAO

The purification of DAO from Diamaze was performed by ion exchange chromatography and affinity chromatography. An amount of 0.5  $\mu\text{g}$  protein of each purified sample was loaded into a PAA gel (10%) containing trapped peroxidase and stained directly with Coomassie brilliant blue without development (no resolving substrates). Standard (Std), Molecular weight standard Precision plus Protein Kaleidoscope; 1, Diamaze extract; 2, YMC resin eluted fraction; 3, Con A Sepharose resin eluted fraction.

Concanavalin A is a plant lectin reported to interact with various sugars and glycoproteins. It has demonstrated benefits in various enzyme isolation applications, and it based on the formation of a non-covalent link of carbohydrate moiety of the enzyme with the Con A that is easily reversible by competition of Con A-glycoenzyme with sugars that can be recognized by Concanavalin A. It was of interest to evaluate if there are some inhibitory effects of Con A on DAO activity. In order to investigate this aspect, Diamaze samples (2 mg/mL) were treated for up to 72 h at 25°C with increasing concentrations of Con A (up to 0.3 mg/mL). Then, the enzyme activity was assayed by the same procedure described by Pietrangeli *et al.*,

2012 with the DCHBS-AAP-HRP method (Pietrangeli *et al.*, 2012). No evidence was found for an effect of Concanavalin A on DAO activity (figure 4.1, Annexe A).

Plant DAO is a glycoprotein that contains various carbohydrates including mannose, galactose, sialic acid, etc. Concanavalin A is a glycoprotein reported as a tetramer. Each subunit has the ability to bind one molecule of glucose, mannose or other glycoproteins containing one of these carbohydrates to form a Con A-glycoprotein complex. We tested whether Con A once complexed to the enzyme would affect its catalytic activity. After incubation of Con A with DAO for 0-72 h, the residual enzymatic activity assayed with putrescine as substrate showed that the Con A:DAO complex remained fully active at 25 °C (Figure 4.1, Annexe A). An experiment with bovine serum amine oxidase (SAO) showed similar results and suggested that the carbohydrate moiety of the enzyme wasn't essential for catalytic activity since the Con A:enzyme complex was also fully active (Ishizaki & Yasunobu, 1980). Indeed, a reaction of Con A with DAO near the active site of the enzyme would have affected its catalytic activity. The non-inhibition of the enzyme after forming Con A:DAO complex (due to its carbohydrate moiety) may suggest that the glycosidic portion of the enzyme is at a certain distance from its active site.

In conclusion, the proposed purification schemes for both columns were quite similar considering their simplicity, their rapidity and their efficiency. A major advantage of the affinity chromatography purification is its robustness, *i.e.* lesser sensitivity to pH during the elution.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION GÉNÉRALE

Les amines oxydases sont des enzymes particulièrement intéressantes pour des applications analytiques (Mann et Smithies, 1955; Smith, 1985; Yang *et al.*, 2012) et biomédicales (McGowan et Muir, 1971). L'amine oxydase contenue dans les légumineuses (enzyme à Cuivre) a une plus large spécificité d'action en oxydant le groupe amine primaire des mono-, di- et polyamines. La diamine oxydase (DAO, EC 1.4.3.22) contenant du Cuivre a été étudiée de manière approfondie dans le pois (Federico et Angelini, 1986, 1988; Güvenilir et Deveci, 1996; McGowan et Muir, 1971; Srivastava et Prakash, 1977; Yanagisawa *et al.*, 1981) et la plante *Lathyrus sativus* (Ahmadifar *et al.*, 2017; Blemur *et al.*, 2016; Calinescu *et al.*, 2010, 2012; Jumarie *et al.*, 2017; Mateescu *et al.*, 2017; Mondovì *et al.*, 2013; Suresh et Adiga, 1979). Il s'agit d'une glycoprotéine globulaire homodimérique, chaque monomère contenant un ion Cuivre (II) et un cofacteur, Topaquinone, provenant d'un résidu tyrosine lors de la modification post-traductionnelle (Mu *et al.*, 1994).

La DAO végétale a été proposée comme agent thérapeutique visant à traiter les histaminoses alimentaires et des dysfonctions entériques liées à l'excès d'histamine. Contrairement à son homologue d'origine animale disponible sur le marché sous forme de complément alimentaire, l'enzyme végétale possède une meilleure affinité pour l'histamine et une activité spécifique plus élevée (Pietrangeli *et al.*, 2007; Comas-Basté *et al.*, 2019). Néanmoins, à la suite de la délivrance intestinale de l'enzyme, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré comme produit secondaire pourrait endommager les tissus ou encore aussi réduire son activité (Mondovì *et al.*, 1967; Pietrangeli *et al.*, 2004). La catalase a

été proposée pour une formulation bi-enzymatique administrable par voie orale en vue de neutraliser cet effet secondaire indésirable. Dès lors associée à la catalase en formulation bi-enzymatique, la DAO (Calinescu *et al.*, 2012; Jumarie *et al.*, 2017; Mateescu *et al.*, 2017) aurait un grand potentiel pour contrôler l'effet biologique de l'histamine exogène et par conséquent stabiliser l'état de santé de l'individu.

L'une des limites à l'utilisation thérapeutique de la DAO reste son processus de purification. Bien que des formes pharmaceutiques adéquates répondant aux exigences immunitaires et de biodisponibilité (comme compléments alimentaires d'origine animale commercialisés) aient été formulées pour la libération intestinale de l'enzyme, le faible rendement avec les méthodes conventionnelles de purification rend difficile sa production (Rinaldi *et al.*, 1982). En outre, les quelques méthodes de purification de la DAO végétale présentées dans la littérature auparavant (chromatographie d'affinité, chromatographie échangeuse d'ion, gel filtration, électrophorèse préparative, précipitation au sulfate d'ammonium, etc.) sont quelquefois longues, coûteuses avec de faibles rendements. Aussi, la purification des enzymes en général est un enjeu crucial pour la biotechnologie. Leur application répandue dans les industries à la fois biomédicales et alimentaires réclame des méthodes de purifications biocompatibles, économiques, efficaces à grande échelle. Les méthodes de purifications moins coûteuses et à l'utilisation à plus large échelle montrent donc leur importance pour répondre aux problèmes des industries.

Une grande majorité des oxydases (dont la DAO) sont des enzymes catalysant l'oxydation de leurs substrats avec libération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces enzymes sont actuellement déterminées par une réaction couplée avec la peroxydase et un substrat chromogène oxydé par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libéré. Ici, la DAO est préparée pour être administrée par voie orale, en association avec la catalase dont le rôle est de décomposer le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libéré par la

DAO. Dans ces conditions d'association DAO:catalase, l'activité enzymatique ne peut pas être déterminée par le taux de génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De même, la résistance à la protéolyse et d'autres études de stabilité ne peuvent être évaluées par les méthodes spectrophotométriques courantes en présence de catalase. Une méthode de zymographie avait été précédemment développée en réponse à ce problème par l'équipe Mateescu (Ahmadifar *et al.*, 2017; Calinescu *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2018) mais celle-ci se montre limitée en raison principalement de sa relativement faible sensibilité et de sa limite de détection assez élevée. Les études de Ahmadifar *et al.*, 2017 ont aussi montré que la cinétique de libération du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution et l'intensité des bandes en zymographie n'avaient pas de différence significative et la dépendance linéaire se conserverait jusqu'à un plateau en raison de l'épuisement du substrat ou de l'inhibition par le produit. Dans ce contexte, le projet actuel se voulait développer une approche de purification de DAO végétale plus robuste pour répondre aux problèmes d'industries mentionnés ci-dessus. Un autre objectif majeur consistait à optimiser la méthode de zymographie pour la détermination de l'activité enzymatique de la DAO applicable également pour la détermination des autres oxydases libérant du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (glucose oxydase, alcool oxydase, urate oxydase) comme produit de réaction.

La DAO végétale est une glycoprotéine qui contient divers carbohydrates incluant le mannose, le galactose, l'acide sialique, etc. Dans l'intention d'utiliser la colonne d'affinité Con A Sepharose<sup>®</sup> 4B pour purifier la DAO, nous avons vérifié si la Con A, une fois complexée à l'enzyme, exercerait une quelconque action sur son activité catalytique. Après incubation 0 – 72h de Con A avec la DAO, le dosage de l'activité enzymatique résiduelle avec la putrescine comme substrat permettait de constater que: le complexe Con A:DAO était totalement actif (figure 4.1, Annexe A). Une expérience aux résultats comparables avec l'amine oxydase du plasma bovin

(SAO) suggérait que la fraction carbohydate de l'enzyme ne semblait pas indispensable à l'exercice de l'activité catalytique puisque le complexe Con A:enzyme était lui aussi pleinement actif (Ishizaki et Yasunobu, 1980). En effet, une réaction de la Con A avec la DAO proche du site actif de l'enzyme aurait une incidence sur son activité catalytique. De même, s'agissant de la stœchiométrie de liaison du complexe Con A:DAO, il a été prouvé par Ishizaki et Yasunobu, 1980, qu'un seul site de liaison sur quatre de la Con A intervenait dans la formation de ce complexe.

Les échangeurs d'ions sont largement utilisés en industries pour l'analyse et la purification des biomolécules. S'agissant des procédés de production de protéines à l'échelle industrielle, les méthodes chromatographiques avec une capacité élevée et un débit rapide, sont privilégiées. Les résultats de test de rétention de la DAO (figure 3.1) sur la résine anionique YMC BioPro s75 ont montré une rétention de 76.6%. La colonne Con A Sepharose® 4B avec Concanavalline A immobilisée comme matériau de chromatographie d'affinité a fourni un rendement de 72.3% comparable à celui obtenu par chromatographie échangeuse d'ions. Nos résultats en parallèle de l'élution des protéines de chacune des colonnes (figures 3.2A et 3.2B) laissent entrevoir des capacités semblables pour ce qui est de la purification de la DAO végétale. De même, les facteurs de purifications respectifs très proches (facteur 10 pour l'affinité et 11 pour l'échange ionique) ainsi que les profils zymographiques et SDS-PAGE (figures 3.3 et 3.4) suggèrent l'utilisation de l'une ou l'autre des méthodes pour l'isolement de l'enzyme. Il est connu que les contenus en hexoses neutres (glucose, mannose, etc.), acide N-acétylneuraminique, glucosamine et N-acétylglucosamine sont respectivement de 5.0, 0.25, 3.25, 2.61% (p/p). Du fait de la grande affinité de la DAO pour la Con A avec une stœchiométrie de 1 : 4.6 (Shah et Ali, 1988), le succès de l'isolement de la DAO dans l'extrait Diamaze par chromatographie d'affinité se positionne comme une

méthode de choix pour la purification de la diamine oxydase végétale. En outre, les procédés de purification élaborés se montrent nécessaires pour la préparation d'enzymes à haute pureté, pour des études de structures ainsi que la mise en place d'outils analytiques comme les biocapteurs ampérométriques d'histamine et pour les analyses d'aliments ou le diagnostic humain.

Durant ce projet, nous avons optimisé la détection zymographique de la diamine oxydase ainsi que celle d'autres oxydases générant du peroxyde d'hydrogène. La méthode zymographique originale permettant de déterminer la DAO sous forme de bandes avec l'*o*-PDA (Ahmadifar *et al.*, 2017) comme substrat de la peroxydase a été appliquée afin d'être comparée à la nouvelle procédure plus performante utilisant le DCHBS-AAP (chapitre II). Des seuils de sensibilité différents ont été expérimentalement établis en fonction de la méthode (*o*-PDA ou DCHBS-AAP) utilisée.

Nos résultats ont indiqué par zymographie avec l'*o*-PDA comme substrat chromogène (figure 2.1A) des bandes brunes manifestes qui, après analyse d'image, ont montré une limite de détection de  $0.60 \times 10^{-3}$  U (correspondant à 0.5  $\mu$ g de protéine chargée sur le gel). En utilisant la nouvelle procédure zymographique en conditions identiques mais avec DCHBS-AAP comme substrat HRP (figure 2.1C), des bandes roses très visibles ont été obtenues, montrant (par analyse d'image) une limite de détection de  $0.12 \times 10^{-3}$  U (équivalente à 0.1  $\mu$ g de protéine DAO).

Les bandes de DAO ont été identifiées dans le gel PAA comme le résultat d'une réaction locale bi-enzymatique impliquant la DAO et la HRP. En effet, lorsqu'elle est piégée dans le gel PAA, la HRP ne migre pas pendant l'électrophorèse (Calinescu *et al.*, 2010; Ugarova *et al.*, 1976). Cette immobilisation permet l'interaction *in situ* entre

le  $\text{H}_2\text{O}_2$  (le produit de dégradation de la putrescine par le DAO), et les substrats chromogènes de la HRP (*o*-PDA ou DCHBS-AAP) sous la catalyse de cette dernière, au niveau de la bande électrophorétique. Comme preuve expérimentale, aucune migration de HRP n'a été trouvée dans le gel de PAA. Ceci a été confirmé en soumettant à l'électrophorèse un gel contenant uniquement de la peroxydase piégée (toutefois à une concentration plus élevée, de manière à être détectée par le Bleu Brillant de Coomassie). Le résultat a été que le gel était d'un bleu homogène, ce qui suggère l'absence de migration de la HRP. Notre explication est que la peroxydase serait impliquée dans la copolymérisation de l'acrylamide et du bis-acrylamide. En effet, le groupe prosthétique de la peroxydase (protoporphyrine encore appelée protohémine IX) possède deux groupements vinyloxy  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ . Ces deux groupes vinyloxy peuvent être impliqués dans la polymérisation radicalaire de l'acrylamide et c'est pourquoi l'enzyme est fortement immobilisée par « piégeage covalent » sur le gel.

Les produits colorés azo-aniline (à partir de *o*-PDA) ou quinoneimine (à partir de DCHBS-AAP) avec des intensités proportionnelles à la quantité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  libérée (résultant de l'activité DAO) sont visibles sur le gel de zymographie sous forme de bandes uniques. Leurs intensités sont liées à l'activité de l'enzyme dans une dépendance linéaire comme le montrent les données sur la densitométrie des gels (figures 2.4A et 2.4B) fournies par le logiciel d'analyse Image J. La version améliorée avec le DCHBS-AAP pour la détermination de l'enzyme par zymographie a également montré (figure 2.4B) une meilleure linéarité ( $R^2$  0.9902) par rapport à la méthode originale (figure 2.4A) avec *o*-PDA ( $R^2$  0.9514) pour la corrélation entre l'intensité des spots et l'activité DAO (Chomdom Kouna *et al.*, 2022).

La zymographie de la Glucose oxydase en utilisant l'*o*-PDA (figure 2.2A) ou le DCHBS-AAP (figure 2.2C) comme substrats de résolution a montré des résultats similaires mais avec des différences mineures. La principale différence réside dans la coloration des bandes zymographiques obtenues à la suite de l'utilisation de l'*o*-PDA comme substrat de résolution. Ici, une coloration jaune plutôt que brune résulte de la présence du cofacteur FAD de la GoX à la place du Cuivre pour la DAO.

Tous ces résultats ont indiqué que la procédure de zymographie nouvellement développée à partir de DCHBS-AAP présente une limite de détection plus basse et une meilleure résolution. Pour davantage de clarté, il est supposé que, contrairement à la réaction d'oxydation de l'*o*-PDA par la HRP, la réaction de la HRP avec le DCHBS-AAP se ferait d'abord via une oxydation du DCHBS, et ensuite par la condensation du DCHBS oxydé avec l'AAP pour aboutir à un produit coloré rose, stable (Artiss et Entwistle, 1981), plus facile à détecter et mieux résolu sur le gel d'électrophorèse.

Les principaux avantages de cette méthode de zymographique améliorée sont: une limite de détection plus basse, une procédure de coloration plus rapide et un impact environnemental moindre avec le DCHBS-AAP plutôt que l'*o*-PDA, comme substrat de la peroxydase. En effet, l'*o*-PDA induirait des malformations congénitales et des cancers (Matsumoto *et al.*, 2012). Les DL50 orales reportées chez le rat sont respectivement de 1700 mg/Kg pour l'AAP et 510 mg/Kg pour l'*o*-PDA (Thermo Fisher Scientific, 2021). À ce jour, aucune étude n'a montré la toxicité aiguë du DCHBS, faisant de lui un meilleur choix de réactif pour les dosages.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nos investigations ont suggéré que la chromatographie d'affinité représente une alternative intéressante comme procédure analytique pour la purification de la DAO de *Pisum sativum*. Cette production de l'enzyme végétale de façon simplifiée pourrait réduire certaines étapes de maturation commerciale et les coûts associés. En comparaison avec la méthode courante de purification (chromatographie échangeuse d'ions), cette approche offre quelques avantages : (i) elle est rapide avec un échantillonnage automatisé, (ii) elle est simple à mettre à l'échelle, (iii) elle est indépendante des fluctuations de pH.

La nouvelle méthode de zymographie proposée dans ce mémoire est susceptible d'évaluer l'activité de la DAO dans un cocktail de différentes enzymes de type oxydases dont la réaction libère le  $H_2O_2$  même en présence de la catalase (qui décompose le  $H_2O_2$ ). La mise au point de cette approche, plus sensible que la version originale, a permis non seulement d'abaisser la limite de détection mais aussi d'accélérer le processus d'évaluation.

Les progrès récents dans notre connaissance et notre compréhension de la pharmacologie de l'histamine allant du diagnostic de l'intolérance à l'histamine à la compréhension des acteurs majeurs impliqués nous ont permis d'entreprendre de meilleures pistes de traitement. L'approche de purification de la DAO par chromatographie (affinité ou échange ionique) ici proposée se veut être un passeport vers la mise en place d'un traitement thérapeutique et préventif pour les patients. Il serait intéressant d'établir la composition en carbohydrates de la DAO végétale en vue d'une meilleure appréciation de leur fonctionnalité. Aussi, plusieurs études importantes restent à pourvoir afin de réaliser de façon sécuritaire cet objectif.

Les études de la stabilité et de la libération contrôlée des agents bioactifs (DAO végétale et catalase) dans les milieux gastriques et intestinaux simulés pourront être suivies d'études *in vivo* pour évaluer l'efficacité du médicament chez des animaux de laboratoire à l'exemple des cochonnets.

ANNEXE A : EFFET DE LA CONCANAVALINE A SUR L'ACTIVITÉ DE LA  
DAO

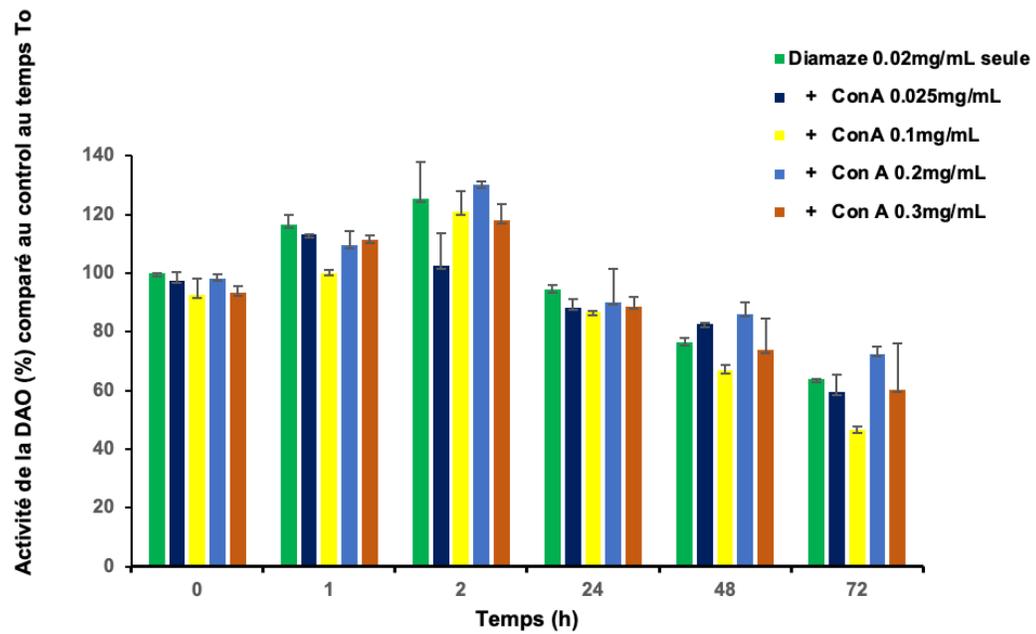


Figure 4.1 Activité du complexe lectine:enzyme  
L'influence de la Con A sur l'activité enzymatique de la DAO a été mesurée 25 °C.

## ANNEXE B : EFFET DU PLP SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA DAO

Mireille Djatougbevi Koudoufio<sup>1</sup>, Paul C. Kounga<sup>1</sup>, Tien Canh Le<sup>1</sup>, Paola Pietrangeli<sup>2</sup>, Lucia Marcocci<sup>2</sup>, M. A. Mateescu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry & Centre CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Branch A, Montreal, Québec H3C 3P8, Canada

<sup>2</sup> Department of Biochemical Sciences, “Rossi-Fanelli”, University of Rome “La Sapienza”, 00185 Rome, Italy

### *Expérimentation*

Le dosage zymographique de l'activité de la PsDAO a été réalisé en utilisant la méthode améliorée avec le DCHBS-AAP comme substrat de la peroxydase. En bref, une quantité de 2.5 µg de protéine PsDAO a été chargée sur le gel de résolution SDS-PAGE à 10% contenant la peroxydase piégée. Les échantillons ont été séparés à 120 V pendant 1.5 h et l'activité DAO a été déterminée en traitant le gel avec une solution préchauffée (5 min à 37 °C) de 50 mM PBS, pH 7.2, contenant 140 mM d'histamine, 1.25 mM d'AAP et 1.25 mM de DCHBS pendant 15 min à 25 °C (Chomdom Kounga *et al.*, 2022). Les intensités des bandes de DAO ont été quantifiées à l'aide du logiciel Image J et normalisées en soustrayant le signal de fond du gel (zone sans bande du gel). Pour révéler le profil protéique, le gel de zymographie a été décoloré par incubation avec une solution de méthanol à 50 % (v/v) pendant 15 minutes et coloré par incubation dans une solution de bleu brillant de Coomassie R-250 à 0.5 % dans du méthanol, de l'acide acétique et de l'eau (40, 10, 50, v/v/v). Pour éliminer l'excès de réactif de Coomassie, les gels ont été lavés avec une solution de méthanol:acide acétique:eau (20:5:75, v/v/v).

### Résultat et discussion

Le potentiel d'un antioxydant non-enzymatique tel que le phosphate de pyridoxal (PLP) pour moduler l'activité de la DAO a été évalué. L'activité enzymatique en présence ou en absence de PLP a été détectée par la méthode de zymographie avec des concentrations croissantes de PLP (de 0.1 à 5 mM). Après la procédure de coloration avec la méthode DCHBS-AAP (Chomdom Kouna *et al.*, 2022) mais avec de l'histamine (comme substrat de la DAO), la DAO a montré une amélioration (figure 4.2, Annexe B) de son activité ~6 fois avec la quantité la plus élevée de PLP (5 mM). Le profil de séparation a montré une quantité similaire de protéine de PsDAO chargée sur le gel.

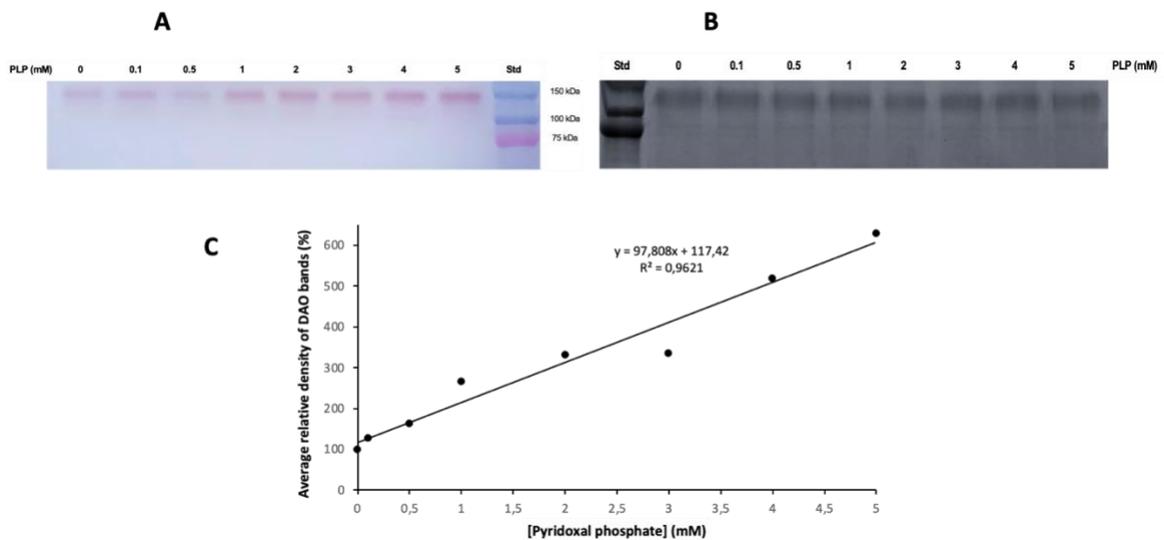


Figure 4.2 Analyse de l'activité DAO en fonction de la concentration de PLP. Gel zymographique (A) et analyse densitométrique correspondante (B) de l'activité DAO à différentes concentrations de PLP. Coloration de Coomassie (C) du gel de zymographie à une charge égale (2,5 $\mu$ g) de DAO de *P. sativum* (150 kDa) selon le standard de poids moléculaire Precision Plus Protein Standards (std). (n=3)

Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (produit de la désamination oxydative de l'histamine par la DAO) peut induire l'oxydation du principal cofacteur Topaquinone (TPQ) de l'enzyme et ainsi, conduire à une inhibition de l'activité enzymatique (Pietrangeli *et al.*, 2004). Il est supposé que l'association du PLP avec le DAO peut réduire la quantité de produit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et ainsi optimiser l'activité de l'enzyme dégradant l'histamine. Cette hypothèse est en accord avec les différents travaux réalisés sur le sujet; en effet, l'idée d'utiliser le PLP avec la DAO est apparue après plusieurs études désignant le PLP comme un groupe prosthétique de la DAO sans que cela ne soit confirmé (Blaschko et Buffoni, 1965; Mondoví *et al.*, 1967). De plus, la découverte de la TPQ comme cofacteur de la DAO et d'autres Cu-AOs a écarté la susdite hypothèse bien que le PLP ait été associé à une préparation de DAO de rein de porc. Ici, nos résultats montrent que l'ajout de PLP pourrait potentialiser l'effet du DAO pour réduire la toxicité de l'histamine. Par ailleurs, la combinaison de PLP et de DAO a permis d'atténuer la contraction des muscles du côlon induite par l'histamine en dégradant l'histamine des cellules intestinales de souris (Neree *et al.*, 2020). Les résultats de la présente étude soutiennent fortement l'association de suppléments exogènes de PLP avec le DAO végétal pour traiter les maladies liées à l'histamine.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aarsen, P. N. et Kemp, A. (1964). Rapid Spectrophotometric Micromethod for Determination of Histaminase Activity. *Nature* 1964 204 : 4964, 1195-1195.
- Abell, C. W. et Kwan, S. W. (2001). Molecular characterization of monoamine oxidases A and B. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 65, 129-132.
- Agostinelli, E., Tempera, G., Molinari, A., Salvi, M., Battaglia, V., Toninello, A. et Arancia, G. (2007). The physiological role of biogenic amines redox reactions in mitochondria. *New perspectives in cancer therapy. Amino acids*, 33, 175-187.
- Ahmadifar, S., Le, T. C., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M. A. (2017). Zymographic approach to determine the intrinsic enzyme specific activity of diamine oxidase in presence of interfering enzymes. *Analytica Chimica Acta*, 975, 78-85.
- Andersson, A.-C., Henningsson, S., Persson, L. et Rosengren, E. (1978). A new approach to the determination of diamine oxidase activity in tissues. *Agents and Actions*, 8, 380-381.
- Angelini, R., Rea, G., Federico, R. et D'Ovidio, R. (1996). Spatial distribution and temporal accumulation of mRNA encoding diamine oxidase during lentil (*Lens culinaris Medicus*) seedling development. *Plant Science*, 119, 103-113.
- Ansari, Z., Karimi, A., Ebrahimi, S. et Emami, E. (2016). Improvement in ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium* cultures by glucose oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 332-338.
- Artiss, J. D. et Entwistle, W. M. (1981). The application of a sensitive uricase-peroxidase coupled reaction to a centrifugal fast analyser for the determination of uric acid. *Clinica Chimica Acta*, 116, 301-309.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S. et Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances*, 27, 489-501.

- Barbry, P., Champe, M., Chassande, O., Munemitsu, S., Champigny, G., Llingueglia, E., ... Lazdunski, M. (1990). Human kidney amiloride-binding protein: cDNA structure and functional expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 7347-7351.
- Barthomeuf, C. (1989). Application of enzyme purification processes to proteolytic enzymes. *Journal of Chromatography A*, 473, 1-26.
- Bäumer, W. et Roßbach, K. (2010). Histamine as an immunomodulator. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 8, 495-504.
- Befani, O., Sabatini, S., Mateescu, M. A. et Mondoví, B. (1989). Peculiar effects of temperature and polyvinylalcohol on the activity of bovine serum amine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 163, 1168-1174.
- Behl, T., Kaur, D., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Zengin, G., ... Bumbu, A. G. (2021). Role of Monoamine Oxidase Activity in Alzheimer's Disease: An Insight into the Therapeutic Potential of Inhibitors. *Molecules*, 26,3724
- Best, C. H. (1929). The disappearance of histamine from autolysing lung tissue. *The Journal of physiology*, 67, 256-263.
- Billett, E. E. (2004). Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *Neurotoxicology*, 25, 139-148.
- Binda, C., Mattevi, A. et 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.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1, 41-55.
- Blaschko, H. et Buffoni, F. (1965). Pyridoxal Phosphate as a constituent of the histaminase, Benzylamine. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers*, 163, 45-60.
- Blemur, L., Le, T. C., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M. A. (2016). Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63, 344-353.

- Bradford, 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.
- Brazeau, B. J., Johnson, B. J. et Wilmot, C. M. (2004). Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428, 22-31.
- Bruun, L. et Houen, G. (1996). In Situ Detection of Diamine Oxidase Activity Using Enhanced Chemiluminescence. *Analytical Biochemistry*, 233, 130-136.
- Buffoni, F. (1966). Histaminase and Related Amine Oxidases. *Pharmacological Reviews*, 18, 1163-1199
- Buffoni, F. et Ignesti, G. (2000). The copper-containing amine oxidases: Biochemical aspects and functional role. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71, 559-564.
- Calinescu, C., Federico, R., Mondovi, B. et 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. et Mateescu, M. A. (2012). Carboxymethyl starch: Chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 428, 48-56.
- Checkoway, H., Farin, F. M., Costa-Mallen, P., Kirchner, S. C. et Costa, L. G. (1998a). Genetic polymorphisms in Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, 19, 635-644.
- Checkoway, H., Franklin, G. M., Costa-Mallen, P., Smith-Weller, T., Dilley, J., Swanson, P. D. et Costa, L. G. (1998b). A genetic polymorphism of MAO-B modifies the association of cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology*, 50, 1458-1461.
- Chomdom Kouna, P., Neree, A. T., Pietrangeli, P., Marcocci, L. et Mateescu, M. A. (2022). Faster and sensitive zymographic detection of oxidases generating hydrogen peroxide. The case of diamine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 648, 114676.

- Cohen, S. S. (1998). A Guide to the Polyamines. *The quarterly review of biology*, 74, 342-343.
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M.L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.D.C. (2019). Histamine and other biogenic amines in food. From scombroid poisoning to histamine intolerance. *Biogenic amines*, 1.
- Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T. et 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.
- Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. et Vidal-Carou, M. D. C. (2020). Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*, 10, 1181, 1-26.
- Cooper GM. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. ISBN-10: 0-87893-106-6.
- De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D. E. et Mattevi, A. (2005). Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 12684-12689.
- Dijkman, W. P., De Gonzalo, G., Mattevi, A. et Fraaije, M. W. (2013). Flavoprotein oxidases: Classification and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 5177-5188.
- Dubey, M. K., Zehra, A., Aamir, M., Meena, M., Ahirwal, L., Singh, S., ... Bajpai, V. K. (2017). Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): Current updates. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN).
- Edmondson, D. E. et Newton-Vinson, P. (2001). The Covalent FAD of Monoamine Oxidase: Structural and Functional Role and Mechanism of the Flavinylation Reaction. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3, 789-806.
- Englard, S. et Seifter, S. (1990). Precipitation techniques. *Methods in Enzymology*, 182, 285-300.

- Federico, R. et Angelini, R. (1986). Occurrence of diamine oxidase in the apoplast of pea epicotyls. *Planta*, 167, 300-302.
- Federico, R. et Angelini, R. (1988). Distribution of polyamines and their related catabolic enzyme in etiolated and light-grown *leguminosae* seedlings. *Planta*, 173, 317-321.
- Federico, R., Di Lisi, F. et Angelini, R. (1985). Purification of diamine oxidase from *lens culinaris* by affinity chromatography. *Plant Science*, 38, 9-12.
- Flores, H. E. et Filner, P. (1985). Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regulation*, 3, 277-291.
- Floris, G. et Mondovì, B. (2009). Copper amine oxidases: Structures, catalytic mechanisms and role in pathophysiology. ISBN: 978-142007681-3; 978-113811175-2, 1-333.
- Fossati, P., Prencipe, L. et Berti, G. (1980). Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical Chemistry*, 26, 227-231.
- Franz, H., Ziska, P. et Mohr, J. (1982). Lectins — definition and classification. *Acta Histochemica*, 71, 19-21.
- Gabius, H. J. (1997). Animal Lectins. *European Journal of Biochemistry*, 243, 543-576.
- Gliszczynska-Swiglo, A. (2006). Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*, 96, 131-136.
- Glover, V., Sandler, M., Owen, F. et Riley, G. J. (1977). Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature*, 265, 80-81.
- Gludovacz, E., Maresch, D., Lopes de Carvalho, L., Puxbaum, V., Baier, L. J., Sützl, L., ... Boehm, T. (2018). Oligomannosidic glycans at Asn-110 are essential for secretion of human diamine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 1070-1087.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. et Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285, 66-66.

- Goldstein, I. J., Winter, H. C. et Poretz, R. D. (1997). Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates. *New comprehensive biochemistry*, 29, 403-474.
- Güvenilir, Y. A. et Deveci, N. (1996). The isolation and purification of diamine oxidase of pea seedlings and pig liver. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56, 235-241.
- Hoet, P. H. M. et Nemery, B. (2000). Polyamines in the lung: Polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278,417-433
- Holmstedt, B., Larsson, L. et Tham, R. (1961). Further studies of a spectrophotometric method for the determination of diamine oxidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 48, 182-186.
- Hrubisko, M., Danis, R., Huorka, M. et Wawruch, M. (2021). Histamine Intolerance-The More We Know the Less We Know. A Review. *Nutrients*, 13, 2228
- Huetz, G.-N. et Schwelberger, H. G. (2003). Simultaneous purification of the histamine degrading enzymes diamine oxidase and histamine N-methyltransferase from the same tissue. *Inflammation Research*, 52, 65-66.
- Ilett, K. F., George, C. F. et Davies, D. S. (1980). The effect of monoamine oxidase inhibitors on « first-pass » metabolism of tyramine in dog intestine. *Biochemical pharmacology*, 29, 2551-2556.
- Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis: principles and applications*. Dordrecht: Springer Netherlands. ISBN: 978-1-4020-8361-7, 253-273
- Ishizaki, H. et Yasunobu, K. T. (1980). Bovine plasma amine oxidase interactions with concanavalin A in solution and with concanavalin A-Sepharose. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology*, 611, 27-34.
- Jalkanen, S. et Salmi, M. (2001). Cell surface monoamine oxidases: enzymes in search of a function. *The EMBO Journal*, 20, 3893.
- Johansson Göte. (1984). Affinity partitioning. *Methods in Enzymology*, 104, 356-364.

- Jumarie, C., Séide, M., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M. A. (2017). Diamine Oxidase from White Pea (*Lathyrus sativus*) Combined with Catalase Protects the Human Intestinal Caco-2 Cell Line from Histamine Damage. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182, 1171-1181.
- Kamra, A. et Gupta, M. N. (1987). Crosslinked concanavalin A-O-(diethylaminoethyl)-cellulose-An affinity medium for concanavalin A-interacting glycoproteins. *Analytical Biochemistry*, 164, 405-410.
- Kaufman, P. B., William Wu, Donghern Kim, Leland J. Cseke (1995). *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. ISBN: 0-8493-2511-0, 484,
- Kettner, L., Seitzl, I. et Fischer, L. (2020). Evaluation of porcine diamine oxidase for the conversion of histamine in food-relevant amounts. *Journal of Food Science*, 85, 843-852.
- Khatami, S. H., Vakili, O., Ahmadi, N., Soltani Fard, E., Mousavi, P., Khalvati, B., ... Movahedpour, A. (2022). Glucose oxidase: Applications, sources, and recombinant production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69, 939-950.
- Khurshid, S., Kafiat, T., Hanif, U., Ulfat, M., Qureshi, M. Z., Bashir, T., ... Ismayil, T. (2016). Application of glucose oxidase for the production of metal gluconates by fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 12, 6766-6775.
- Klinman, J. P. et Mu, D. (1994). Quinoenzymes in biology. *Annual review of biochemistry*, 63, 299-344.
- Kluetz, M. D., Adamsons, K. et Flynn, J. E. (1980). Optimized Preparation And Determination Of Pea Seedling Diamine Oxidase. *Preparative Biochemistry*, 10, 615-631.
- Kohlmeier, M. (2003). Riboflavin. *Nutrient Metabolism*, 1, 561-570.
- Komericki, P., Klein, G., Reider, N., Hawranek, T., Strimitzer, T., Lang, R., ... Aberer, W. (2011). Histamine intolerance: lack of reproducibility of single symptoms by oral provocation with histamine: a randomised, double-blind, placebo-controlled cross-over study. *Wiener klinische Wochenschrift*, 123, 15-20.

- Kovacova-Hanuszkova, E., Buday, T., Gavliakova, S. et Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et immunopathologia*, 43, 498-506.
- Lackner, S., Malcher, V., Enko, D., Mangge, H., Holasek, S. J. et Schnedl, W. J. (2019). Histamine-reduced diet and increase of serum diamine oxidase correlating to diet compliance in histamine intolerance. *European journal of clinical nutrition*, 73, 102-104.
- Le, T. C., Mateescu, M. A., Ahmadifar, S., Marcocci, L. et Pietrangeli, P. (2018). Zymographic determination of intrinsic specific activity of oxidases in the presence of interfering proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1853, 207-221.
- Lee, H.-I., Kim, Y. M. et Ro, Y. T. (2008). Purification and Characterization of a Copper-Containing Amine Oxidase from Mycobacterium Sp. Strain JC1 DSM 3803 Grown on Benzylamine. *The Journal of Biochemistry*, 144, 107-114.
- Lefèvre, S., Astier, C. et Kanny, G. (2017). Intolérance à l'histamine ou fausses allergies alimentaires de mécanisme histaminique. *Revue Française d'Allergologie*, 57, 24-34.
- Leonida, M., Belbekhouche, S., Adams, F., Bijja, U. K., Choudhary, D. A. et Kumar, I. (2019). Enzyme nanovehicles: Histaminase and catalase delivered in nanoparticulate chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 557, 145-153.
- Lis, H. et Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical reviews*, 98, 637-674.
- Macholám, L. et Minář, J. (2008). The depression of the synthesis of pea diamine oxidase due to light and the verification of its participation in growth processes using competitive inhibitors. *Biologia Plantarum*, 16, 86-93.
- Maintz, L. et Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, 85, 1185-96.
- Mann, P. J. et Smithies, W. R. (1955). Plant enzyme reactions leading to the formation of heterocyclic compounds. 1. The formation of unsaturated pyrrolidine and piperidine compounds. *The Biochemical journal*, 61, 89-100.

- Masini, E., Bani, D., Marzocca, C., Mateescu, M. A., Mannaioni, P. F., Federico, R. et Mondovì, B. (2007). Pea Seedling Histaminase as a Novel Therapeutic Approach to Anaphylactic and Inflammatory Disorders. *The Scientific World Journal*, 7, 888-902.
- Mateescu, M. A., Koudoufio, M. D., Neree, A. T., et B. Mondovi. (2017). Plant Histaminase as Bioactive Agent to Lower the Histamine Level: A Mini-Review. *Journal of Gastroenterology Research*, 1, 34-41.
- Mateescu, M. A., Calinescu, C., Ispas-Szabo, P., Mondovi B., Federico, R. (2018). Oral enzyme compositions for intestinal delivery. U.S. Patent No. 9878020.
- Matsumoto, M., Suzuki, M., Kano, H., Aiso, S., Yamazaki, K. et Fukushima, S. (2012). Carcinogenicity of ortho-phenylenediamine dihydrochloride in rats and mice by two-year drinking water treatment. *Archives of toxicology*, 86, 791-804.
- Matsumoto, T., Furuta, T., Nimura, Y. et Suzuki, O. (1982). Increased sensitivity of the fluorometric method of Snyder and Hendley for oxidase assays. *Biochemical Pharmacology*, 31, 2207-2209.
- McGowan, R. E. et Muir, R. M. (1971). Purification and Properties of Amine Oxidase from Epicotyls of *Pisum sativum*. *Plant Physiology*, 47, 644-648.
- McGuirl, M. A., McCahon, C. D., McKeown, K. A. et Dooley, D. M. (1994). Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies. *Plant Physiology*, 106, 1205.
- Mizuguchi, H., Imamura, I., Takemura, M. et Fukui, H. (1994). Purification and Characterization of Diamine Oxidase (Histaminase) from Rat Small Intestine. *The Journal of Biochemistry*, 116, 631-635.
- Moinard, C., Cynober, L. et de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24, 184-197.
- Mojsov, K. (2019). Enzymatic desizing, bioscouring and enzymatic bleaching of cotton fabric with glucose oxidase. *Journal of the Textile Institute*, 110, 1032-1041.
- Mondovi, B., A. Fogel, W., Federico, R., Calinescu, C., A. Mateescu, M., C. Rosa, A. et Masini, E. (2013). Effects of amine oxidases in allergic and histamine-mediated conditions. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 7, 20-34.

- Mondovi, B., Befani, O., Gerosa, P. et Mateescu, M. A. (1992). Specific temperature dependence of diamine oxidase activity and its thermal stability in the presence of Polyvinylalcohol. *Agents and Actions*, 37, 220-226.
- Mondoví, B., Costa, M. T., Agrò, A. F. et Rotilio, G. (1967). Pyridoxal phosphate as a prosthetic group of pig kidney diamine oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 119, 373-381.
- Mondovì, B. et Finazzi Agrò, A. (1982). Structure and Function of Amine Oxidases. *Advances in experimental medicine and biology*, 148, 141-153.
- Mondovì, B., Rotilio, G., ... M. C.-J. of B. et 1967, undefined. (1967). Diamine Oxidase from Pig Kidney Improved Purification and Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 1160-1167.
- Mondoví, B., Rotilio, G., Finazzi-Agrò, A. et Costa, M. T. (1967). Diamine oxidase inactivation by hydrogen peroxide. *BBA - Enzymology*, 132, 521-523.
- Mu, D., Medzihradzky, K. F., Adams, G. W., Mayer, P., Hines, W. M., Burlingame, A. L., ... Klinman, J. P. (1994). Primary structures for a mammalian cellular and serum copper amine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 9926-9932.
- Murray, J. M., Saysell, C. G., Wilmot, C. M., Tambyrajah, W. S., Jaeger, J., Knowles, P. F., ... McPherson, M. J. (1999). The Active Site Base Controls Cofactor Reactivity in *Escherichia coli* Amine Oxidase: X-ray Crystallographic Studies with Mutational Variants. *Biochemistry*, 38, 8217-8227.
- Nakamura, T., Itadani, H., Hidaka, Y., Ohta, M. et Tanaka, K. (2000). Molecular Cloning and Characterization of a New Human Histamine Receptor, HH4R. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279, 615-620.
- Neree, A. T., Pietrangeli, P., Szabo, P. I., Mateescu, M. A. et Marcocci, L. (2018). Stability of Vegetal Diamine Oxidase in Simulated Intestinal Media: Protective Role of Cholic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 12657-12665.
- Neree, A. T., Soret, R., Marcocci, L., Pietrangeli, P., Pilon, N. et Mateescu, M. A. (2020). Vegetal diamine oxidase alleviates histamine-induced contraction of colonic muscles. *Scientific Reports*, 10, 1-13

- Okuyama, T. et Kobayashi, Y. (1961). Determination of diamine oxidase activity by liquid scintillation counting. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 242-250.
- Padiglia, A., Cogoni, A. et Floris, G. (1991). Characterization of amine oxidases from *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus* and *Cicer*. *Phytochemistry*, 30, 3895-3897.
- Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W. L. S., ... Haas, H. L. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 67, 601-655.
- Pietrangeli, P., Bellelli, A., Fattibene, P., Mondovì, B. et Morpurgo, L. (2012). *Lathyrus cicera* copper amine oxidase reactions with tryptamine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 109, 33-39.
- Pietrangeli, P., Federico, R., Mondovì, B. et Morpurgo, L. (2007). Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 997-1004.
- Pietrangeli, P., Nocera, S., Fattibene, P., Wang, X., Mondovì, B. et Morpurgo, L. (2000). Modulation of bovine serum amine oxidase activity by hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267, 174-178.
- Pietrangeli, P., Nocera, S., Federico, R., Mondovì, B. et Morpurgo, L. (2004). Inactivation of copper-containing amine oxidases by turnover products. *European Journal of Biochemistry*, 271, 146-152.
- Rani, V., Asthana, S., Vadhera, M., Yadav, U. C. S. et Atale, N. (2015). Tools and techniques to measure oxidative stress. *Free Radicals in Human Health and Disease*. ISBN, 978-813222035-0, 43-56.
- Reese, I., Ballmer-Weber, B., Beyer, K., Fuchs, T., Kleine-Tebbe, J., Klimek, L., ... Worm, M. (2017). German guideline for the management of adverse reactions to ingested histamine: Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the German Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Association of Allergologists (AeDA), and the Swiss Society for Allergology and Immunology (SGAI). *Allergo Journal International*, 26, 72.

- Rinaldi, A., Floris, G. et Finazzi - Agrò, A. (1982). Purification and Properties of Diamine Oxidase from Euphorbia Latex. *European Journal of Biochemistry*, 127, 417-422.
- Roeser, H. P., Lee, G. R., Nacht, S. et Cartwright, G. E. (1970). The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 49, 2408-2417.
- Sablin, S. O., Yankovskaya, V., Bernard, S., Cronin, C. N. et Singer, T. P. (1998). Isolation and characterization of an evolutionary precursor of human monoamine oxidases A and B. *European Journal of Biochemistry*, 253, 270-279.
- Salmi, M. et Jalkanen, S. (2019). Vascular Adhesion Protein-1: A Cell Surface Amine Oxidase in Translation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30, 314.
- Saura, J., Luque, J. M., Cesura, A. M., Prada, M. Da, Chan-Palay, V., Huber, G., ... Richards, J. G. (1994). Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. *Neuroscience*, 62, 15-30.
- Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *The American journal of psychiatry*, 122, 509-522.
- Schnedl, W. J., Schenk, M., Lackner, S., Enko, D., Mangge, H. et Forster, F. (2019). Diamine oxidase supplementation improves symptoms in patients with histamine intolerance. *Food Science and Biotechnology*, 28, 1779.
- Schwelberger, H. G. et Bodner, E. (1997). Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1340, 152-164.
- Seiler, N., Delcros, J. G. et Moulinoux, J. P. (1996). Polyamine transport in mammalian cells. An update. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28, 843-861.
- Seiler, N. et Raul, F. (2005). Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 623.

- Shah, M. A. et Ali, R. (1988). The glycoprotein nature of pig kidney diamine oxidase. Role of disulphide groups and arginine residues in the concanavalin A-diamine oxidase interaction. *Biochemical Journal*, 253, 103.
- Sharon, N. et Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 246, 227-234.
- Shieh, J. J., Tamaye, R. et Yasunobu, K. T. (1975). A purification procedure for the isolation of homogeneous preparations of bovine aorta amine oxidase and a study of its lysyl oxidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 377, 229-238.
- Slominska-Wojewodzka, M. et Sandvig, K. (2015). The role of lectin-carbohydrate interactions in the regulation of ER-associated protein degradation. *Molecules*, 20, 9816-9846.
- Smith, T. A. (1985). Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology*, 36, 117-143.
- Snyder, S. H. et Hendley, E. D. (1968). A Simple And Sensitive Fluorescence Assay For Monoamine Oxidase And Diamine Oxidase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 163, 386-392.
- Snyder, S. H., Hendley, E.D. (1971). Sensitive Fluorometric and Radiometric Assays for Monoamine Oxidase and Diamine Oxidase. *Methods in Enzymology*, 17, 741-746.
- Srivastava, S. K. et Prakash, V. (1977). Purification and properties of pea cotyledon and embryo diamine oxidase. *Phytochemistry*, 16, 189-190.
- Suresh, M. R. et Adiga, P. R. (1979). Diamine oxidase of *Lathyrus sativus* seedlings. Purification and properties. *Journal of Biosciences*, 1, 109-124.
- Takahashi, T. et Kakehi, J. I. (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of botany*, 105, 1-6.
- Takano, K., Suzuki, T. et Yasuda, K. (1970). Localization of Diamine Oxidase and D-amino acid Oxidase in kidney, demonstrated by means of immunohistochemical method. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 3, 105-113.

- Tavladoraki, P., Cona, A., Federico, R., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., ... Agostinelli, E. (2012). Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino acids*, 42, 411-426.
- Thurmond, R. L., Gelfand, E. W. et Dunford, P. J. (2008). The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nature reviews. Drug discovery*, 7, 41-53.
- Toribio, F., Martínez-Lara, E., Pascual, P. et López-Barea, J. (1996). Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 684, 77-97.
- Tsujikawa, T., Uda, K., Ihara, T., Inoue, T., Andoh, A., Fujiyama, Y. et Bamba, T. (1999). Changes in serum diamine oxidase activity during chemotherapy in patients with hematological malignancies. *Cancer letters*, 147, 195-198.
- Tuck, C. J., Biesiekierski, J. R., Schmid-Grendelmeier, P. et Pohl, D. (2019). Food Intolerances. *Nutrients*, 11, 1684.
- Turini, P., Sabatini, S., Befani, O., Chimenti, F., Casanova, C., Riccio, P. L. et Mondovi, B. (1982). Purification of bovine plasma amine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 125, 294-298.
- Twomey, P. J., Viljoen, A., House, I. M., Reynolds, T. M. et Wierzbicki, A. S. (2005). Relationship between Serum Copper, Ceruloplasmin, and Non-Ceruloplasmin-Bound Copper in Routine Clinical Practice. *Clinical Chemistry*, 51, 1558-1559.
- Ugarova, N. N., Kershengol'ts, B. M., Artamonov, I. D. et Berezin, I. V. (1976). [Catalytic properties and stability of horseradish peroxidase immobilized in polyacrylamide gel]. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, 41, 1662-70.
- Verma, N., Sisodiya, L., Gahlaut, A., Hooda, V. et Hooda, V. (2020). Novel approach using activated cellulose film for efficient immobilization of purified diamine oxidase to enhance enzyme performance and stability. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50, 468-476.
- Wagner, N., Dirk, D., Peveling-Oberhag, A., Reese, I., Rady-Pizarro, U., Mitzel, H. et Staubach, P. (2017). A Popular myth - low-histamine diet improves chronic spontaneous urticaria - fact or fiction? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31, 650-655.

- Walter, N. G. et Engelke, D. R. (2002). Ribozymes: Catalytic RNAs that cut things, make things, and do odd and useful jobs. *Biologist*, 49, 199-203.
- Wang, H. C. et Lee, A. R. (2015). Recent developments in blood glucose sensors. *Journal of food and drug analysis*, 23, 191-200.
- Wantke, F., Hemmer, W., Haglmüller, T., Götz, M. et Jarisch, R. (1996). Histamine in wine. Bronchoconstriction after a double-blind placebo-controlled red wine provocation test. *International archives of allergy and immunology*, 110, 397-400.
- Weis, W. I. et Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual review of biochemistry*, 65, 441-473.
- Wilflingseder, D. et Schwelberger, H. G. (2000). Highly efficient purification of porcine diamine oxidase. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 737, 161-166.
- Wimmerovd, M., Glatz, Z., Janiczek, O. et Macholdn, L. (1993). Improved Chromatographic Purification of Pea Seedlings Diamine Oxidase. *Preparative Biochemistry*, 23, 303-319.
- Windaus, A. et Vogt, W. (1907). Synthese des Imidazolyl-äthylamins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 40, 3691-3695.
- Wiseman, A. (1975). *Handbook of enzyme biotechnology*. Chichester; New York : Ellis Horwood; Halsted Press. ISBN: 470956178.
- Yacoub, M. R., Ramirez, G. A., Berti, A., Mercurio, G., Breda, D., Saporiti, N., ... Colombo, G. (2018). Diamine Oxidase Supplementation in Chronic Spontaneous Urticaria: A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Study. *International archives of allergy and immunology*, 176, 268-271.
- Yagodina, O. V., Nikol'skaya, E. B., Khovanskikh, A. E. et Kormilitsyn, B. N. (2002). Amine Oxidases of Microorganisms. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 38, 251-258.
- Yanagisawa, H., Hirasawa, E. et Suzuki, Y. (1981). Purification and properties of diamine oxidase from pea epicotyls. *Phytochemistry*, 20, 2105-2108.

Yang, R., Chen, H., Han, Y. et Gu, Z. (2012). Purification of diamine oxidase and its properties in germinated fava bean (*Vicia faba L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1709-1715.

4-Aminoantipyrine; CAS RN: 83-07-8; AC103155000; rev. 5; Fisher Scientific, One Reagent Lane, Fair Lawn, NJ, December 24, 2021. <https://www.fishersci.com/store/msds/AC103155000.pdf> (consulté le 04 juillet 2022).

*o*-Phenylenediamine, 98%; CAS RN: 95-54-5; BP2537-250; rev. 4; Fisher Scientific, One Reagent Lane, Fair Lawn, NJ, December 24, 2021. <https://www.fishersci.com/store/msds/BP2537-250.pdf> (consulté le 04 juillet 2022).

3,5-Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acidsodium salt, 98%; CAS RN: 54970-72-8; A10732; rev. 2; Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific: Fair Lawn, NJ, January 7, 2021. <https://www.fishersci.com/store/msds/A10732.pdf> (consulté le 04 juillet 2022).