

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

NOUVELLE APPROCHE ZYMOGRAPHIQUE POUR DÉTERMINER  
L'ACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE LA DIAMINE OXYDASE EN PRÉSENCE DE  
LA CATALASE DANS DES FORMULATIONS BI-ENZYMATIQUES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
SAMANEH AHMADIFAR

MARS 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le professeur Mircea Alexandru Mateescu de m'avoir accueilli dans son laboratoire, son soutien scientifique et pour la confiance qu'il a eu en moi tout durant mes études à la maîtrise.

Je voudrais aussi remercier le Dr Tien Canh Le. Ses conseils, sa disponibilité, son grand soutien et sa gentillesse m'ont permis d'aller vers l'avant durant ma maîtrise.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire pour leur aide et soutien ainsi que pour les bons moments passés ensemble. Ils ont su me motiver pour m'aider à finir ma maîtrise. Un gros merci particulier pour Lindsay Blemur, Kouadio Victorien et Omid Abadi.

J'adresse mes remerciements au groupe du professeur Lucia Marcocci de l'Université de Rome pour la préparation de l'enzyme et les conseils avisés.

Je remercie ma famille pour leur soutien et leur amour tout au long de mes études, à ma mère et mon père de tout mon cœur pour m'offrir l'espoir et le soutien psychologique nécessaire et m'avoir motivé de poursuivre mes études.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
RÉSUMÉ.....	X
CHAPITRE I	
GÉNÉRALITÉS SUR LES AMINE OXYDASES À CUIVRE.....	1
1.1 Les protéines à cuivre et leurs fonctions métaboliques.....	1
1.1.1 Céruloplasmine .....	2
1.1.2 Hémo-cyanine .....	5
1.2 Les amine oxydases.....	7
1.2.1 Les amine oxydases, leurs fonctions catalytiques et le rôle métabolique.....	7
1.2.2 Mécanisme catalytique des amine oxydases à cuivre.....	11
1.2.3 Les amine oxydases à cuivre, leur action sur les amines biogènes et leur rôle métabolique.....	13
CHAPITRE II	
LES AMINE OXYDASES À CUIVRE D'ORIGINE VÉGÉTALE.....	15
2.1 Aspects structuraux .....	16
2.2 Mécanisme catalytique et applications thérapeutiques des diamine oxydases.....	17
2.2.1 La diamine oxydase comme agent antihistaminique et anti-allergène .....	20
2.2.2 Le stress oxydatif.....	23
2.3 Modalités de la détermination des activités enzymatiques de la DAO .....	24
CHAPITRE III	
EXCIPIENTS POLYCARBOXYLIQUES POUR LA LIVRAISON D'AGENT BIOACTIF AU NIVEAU INTESTINAL .....	31
3.1 Le carboxyméthylamidon.....	32
3.2 L'alginat.....	36

3.3 La formation de gel : la gélification ionotropique .....	39
CHAPITRE IV	
PRÉSENTATION DU PROJET .....	42
CHAPITRE V	
UNE NOUVELLE APPROCHE ZYMOGRAPHIQUE POUR DÉTERMINER L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE INTRINSÈQUE DES OXYDASES EN PRÉSENCE DES ENZYMES INTERFÉRENTES: LE CAS DE LA DIAMINE OXYDASE.....	49
CHAPITRE VI	
DISCUSSIONS ET CONCLUSION .....	76
BIBLIOGRAPHIE .....	84

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Représentation tridimensionnelle de la CP humaine.....	2
Figure 1.2 Activité ferroxidasique de la CP et la réaction de Fenton.....	5
Figure 1.3 Structures des amine oxydases à cuivre provenant d' <i>Escherichia coli</i> et de l'humain.....	10
Figure 1.4 Schéma du mécanisme catalytique des CuAO-TPQ avec la benzylamine comme substrat.....	12
Figure 2.1 Structure tridimensionnelle de l'amine oxydase du <i>Pisum Sativum</i> .....	16
Figure 2.2 Site actif de PSAO.....	17
Figure 2.3 Métabolisme de l'histamine.....	20
Figure 2.4 Absorbance du NAD <sup>+</sup> et du NADH, H <sup>+</sup> en fonction de la longueur d'onde.....	27
Figure 2.5 Dosages enzymatiques couplés en utilisant le réactif Amplex® Red.....	28
Figure 2.6 Principales étapes de la zymographie.....	30
Figure 3.1 Schéma de la synthèse du carboxyméthylamidon.....	32
Figure 3.2 Schéma de la structure d'amylose et d'amylopectine.....	33
Figure 3.3 Structure partielle de l'alginate arrangée dans une séquence intercalée (...GGMMGM...) de guluronate et mannuronate.....	37
Figure 3.4 Interactions entre les unités M.....	38
Figure 3.5 Interactions entre unités G.....	38
Figure 3.6 Gélification de l'alginate par des ions calcium, selon le modèle "boite d'oeufs".....	40
Figure 4.1 Procédure d'immobilisation de la DAO dans des microbilles par gélification ionotrope et d'échantillonnage durant l'incubation dans SIF pour déterminer l'activité enzymatique de la DAO.....	43
Figure 4.2 Le principe de la méthode zymographique modifiée.....	45

Figure 4.3 Présentation schématique de différents volets du projet de maîtrise.....	47
Figure 4.4 Résumé graphique (soumis, en révision pour publication dans <i>Analytica Chimica Acta</i> ).....	48
Figure 5.1 Oxidative deamination of histamine catalyzed by diamine oxidase.....	54
Figure 5.2 Electrophoresis of diamine oxidase and glucose oxidase on non-denaturing polyacrylamide (8 %) gel with entrapped peroxidase .....	63
Figure 5.3 Standard curve of hydrogen peroxide.....	64
Figure 5.4 Comparative dependency of intensity of DAO bands in zymography and of concentration of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in solution in function of DAO quantities .....	65
Figure 5.5 Zymography and Coomassie overstaining on SDS-Polyacrylamide gel with the standard curve of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	67
Figure 5.6 Electrophoretic pattern of BSA on SDS-PAA (10 %) gels and the calibration curve of BSA .....	68
Figure 5.7 Optimal percentage of catalase introduced in the DAO formulation .....	70
Figure 5.8 Electrophoretic patterns of DAO extracted at various intervals from alginate/CMS microbeads incubated in SIF .....	71
Figure 5.9 Retained activity of entrapped DAO in association with catalase in microbeads at various incubation times in SIF .....	73
Figure 5.10 FTIR spectral analysis of the DAO/catalase entrapped in alginate/CMS-based microbeads .....	74

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ISA	Activité spécifique intrinsèque
AO	Amine oxydase
AS	Activité spécifique
ASR	Activité spécifique réelle
CMA	Carboxyméthylamidon
CP	Céruloplasmine
CuAO	Amine oxydase à cuivre
DAO	Diamine oxydase
DS	Degré de substitution
ECAO	Amine oxydase à cuivre provenant d' <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Éthylène Diamine Tétra Acétate
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ERO	Espèces réactives d'oxygène
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAD-AO	Amine oxydases à flavine adénine dinucléotide

FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
G	Guluronate
GABA	Acide <i>gamma</i> -aminobutyrique
GDH	L-glutamate déshydrogénase
HC	Hémocyanine
HNMT	Histamine N-méthyltransférase
HO·	Radical hydroxyle
HPAO	Amine oxydase d' <i>Hansenula polymorpha</i>
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleukines
IMAO	Inhibiteurs de monoamine oxydases
KGA	Acide $\alpha$ -cétoglutarique
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LTQ	Lysine tyrosylquinone
M	Manuronate
MAO	Monoamine oxydase
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxyde
$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
<i>o</i> -PDA	<i>ortho</i> -phénylènediamine
PAA	Polyacrylamide
<i>p</i> -PDA	<i>para</i> -phénylènediamine
PO	Phénoloxydase
PSAO	Amine oxydase à cuivre provenant du <i>Pisum Sativum</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SIF	Milieu intestinal simulé
SOD	Superoxyde dismutase
SSAO	Amine oxydases sensibles à semicarbazide
TPQ	2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone
VAP	Protéines d'adhésion-vasculaire

## RÉSUMÉ

La diamine oxydase (DAO, *EC 1.4.3.22*) est une enzyme à cuivre présente dans les règnes animal et végétal. Elle est impliquée surtout dans le processus de dégradation des amines biogènes dont l'histamine. Un déséquilibre entre la production et la dégradation de l'histamine peut causer des effets indésirables tels que des réactions allergiques, des dysfonctionnements gastro-intestinaux, notamment dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin (*i.e.* maladie de Crohn). La DAO d'origine végétale a été proposée comme un agent antihistaminique naturel administré par voie orale. Afin de protéger la DAO face à la dégradation par des protéases pancréatiques durant le transit intestinal, elle a été immobilisée dans des microbilles à base d'alginate et de carboxyméthyl amidon (CMA) obtenues par gélification ionotropique avec l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ . La DAO, en catalysant l'oxydation de l'histamine en imidazole-acétaldéhyde, génère également du peroxyde d'hydrogène qui est toxique. Pour neutraliser ses effets néfastes, la catalase a été ajoutée dans la formulation de DAO.

Dans ce projet de Maîtrise, les objectifs principaux étaient: i) déterminer la DAO en présence de la catalase (enzyme hautement interférente dans le dosage de la DAO à cause de la décomposition du  $\text{H}_2\text{O}_2$ ); ii) réaliser l'inclusion de la DAO dans des microsphères à base de carboxyméthyl amidon et alginate; iii) évaluer la stabilité de la DAO dans des microsphères suite à l'incubation en conditions simulant le tractus intestinal; iv) déterminer l'activité spécifique intrinsèque de la DAO en présence des enzymes interférentes comme la catalase ou dénaturantes comme des protéases pancréatique. Il est important de mentionner que l'ajout de la catalase dans la formulation DAO ne permet donc pas de mesurer l'activité de DAO par les méthodes usuelles via le dosage de peroxyde d'hydrogène. Dans ce contexte, l'élaboration d'une nouvelle méthode pour déterminer l'activité de la DAO en présence d'autres protéines bioactives a constitué le point central du projet. Ainsi une nouvelle méthode basée sur la zymographie a été élaborée. La DAO et la glucose oxydase ont été soumis à la zymographie dans des conditions dénaturantes (en présence de SDS), mais non réductrices (en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol). La DAO et des protéines contaminantes (catalase et protéase) ont été séparées par électrophorèse sur gel polyacrylamide (PAA) contenant la peroxydase. Suite à l'électrophorèse, le gel a été incubé dans une solution de révélation composée de putrescine (substrat de la DAO) et d'*ortho*-phénylènediamine (*o*-PDA, co-substrat de la peroxydase). Afin de calculer l'activité spécifique intrinsèque, une courbe standard a été établie avec des quantités connues de DAO. Les résultats ont aussi montré que les microbilles à base d'alginate/CMA génèrent une bonne protection des enzymes face à la dégradation des protéases pancréatiques. Cette nouvelle approche est une des premières méthodes permettant de déterminer l'activité spécifique intrinsèque de la DAO en présence d'autres enzymes et de protéines interférentes.

**MOTS CLÉS:** Diamine oxydase, Catalase, Microbilles à base d'Alginate et de Carboxyméthyl amidon, Détermination de l'activité spécifique intrinsèque par zymographie.

## CHAPITRE I

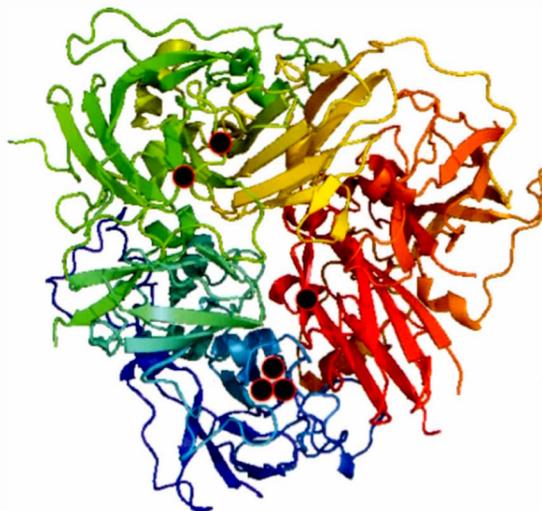
### GÉNÉRALITÉS SUR LES AMINE OXYDASES À CUIVRE

#### **1.1 Les protéines à cuivre et leurs fonctions métaboliques**

Le cuivre est nécessaire au bon fonctionnement de certaines enzymes ayant un rôle dans la protection contre diverses substances toxiques appelées radicaux libres. Il entre également dans la composition de plusieurs enzymes et est essentiel à l'utilisation normale du fer (Roeser *et al.*, 1970). La carence en cuivre (moins de 2 mg/jour) s'accompagne d'anémie résultant de l'incapacité des réticulocytes à obtenir le fer de la transferrine et à synthétiser l'hème à partir du fer (III) (Williams *et al.*, 1976). En ce qui concerne les systèmes enzymatiques composés avec du cuivre, la lysyl oxydase est essentielle à l'entretien du tissu conjonctif dans les poumons, les os et de l'élastine de l'appareil cardio-vasculaire; la cytochrome c oxydase intervient dans le métabolisme oxydatif, le fonctionnement du cerveau, la synthèse de l'hème et la synthèse des phospholipides; la superoxyde-dismutase est nécessaire à la destruction des radicaux superoxydes (Davis *et al.*, 1987). L'hémocyanine serve au transport de l'oxygène chez certains invertébrés tels que les arthropodes et les mollusques (Van Holde et Miller, 1995); la laccase utilise l'oxygène pour oxyder de nombreux composés phénoliques par le biais d'un mécanisme radicalaire; l'ascorbate oxydase catalyse l'oxydation du L-ascorbate en déshydroascorbate; l'azurine est un transporteur d'électrons du complexe cytochrome bc1 vers les cytochromes oxydases ou réductases terminales; la monoamine-oxydase est nécessaire à la pigmentation et à la régulation des neurotransmetteurs et des neuropeptides.

### 1.1.1 Céruloplasmine

La céruloplasmine (CP, *EC 1.16.3.1*) est une glycoprotéine du groupe des  $\alpha$ -2 globulines avec une masse moléculaire d'environ 132 kDa (Qian et Ke, 2001). Elle est principalement synthétisée dans le foie. La cristallographie aux rayons-X de la CP humaine, à une résolution de 3,1 Å, révèle qu'une molécule de CP se compose de six domaines arrangés en deux triades, l'une composée des domaines pairs et l'autre des domaines impairs, formant deux pyramides emboîtées et permutées l'une par rapport l'autre (Vachette *et al.*, 2002). L'arrangement des pyramides est similaire bien que les structures des domaines pairs et impairs se ressemblent peu (Figure 1.1). La conformation tridimensionnelle est assurée entre autres par la présence de cinq ponts de type disulfure situés à la base des domaines 1 à 5 (Patel *et al.*, 2002).



**Figure 1.1 Représentation tridimensionnelle de la CP humaine**

Les six domaines de la CP sont représentés par six couleurs différentes, rouge (D1), bleu (D2), vert (D3), bleu pale (D4), jaune (D5) et blanc (D6). La localisation des six atomes de cuivre permanents est mentionnée par des cercles (Lindley *et al.*, 1997)

Une caractéristique importante de la CP est qu'elle possède six atomes de cuivre qui

sont permanents, ainsi que deux sites de liaison supplémentaires occupés de manière partielle par des atomes de cuivre labiles (Lindley *et al.*, 1997 ; Zaitseva *et al.*, 1996). Les six atomes de cuivre (permanents), retrouvés sous forme  $\text{Cu}^{2+}$ , sont répartis dans les domaines pairs de la protéine ainsi qu'à l'interface des domaines 1 et 6.

La CP a différents rôles biologiques, ce qui fait d'elle une protéine multifonctionnelle. Certains de ces rôles sont liés à ses activités oxydasique (*e.g.* régulation des amines biogènes) et ferroxidasique (*e.g.* régulation du métabolisme du fer et enzyme antioxydante), ainsi qu'à sa capacité de transporter le cuivre (*e.g.* régulation du métabolisme du cuivre et angiogénèse) (Linder *et al.*, 1979).

*Activité catalytique de la CP:* La CP est une oxydase qui catalyse l'oxydation de plusieurs produits phénoliques et amines aromatiques tels que les aminophénols et les diamines aromatiques comme la *para*-phénylènediamine (*p*-PDA) (Sunderman et Nomoto, 1970). Contrairement aux oxydases dites «classiques» qui libèrent du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), la CP fait partie d'un type particulier d'oxydases puisqu'elle ne génère pas du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mais elle génère de l'eau. La fonction oxydase de la CP lui confère un rôle de régulateur de certaines amines biogènes comme des hormones et des neurotransmetteurs. En plus de son rôle connu dans la conversion oxydative de la dopamine en mélanine (Rosei *et al.*, 1998), des études réalisées à l'aide de tranquillisants et d'antidépresseurs ont révélé un effet sur l'oxydation de différentes catécholamines (de Mol, 1985 ; Løvstad, 2006). Des sites de liaison potentiels pour ces amines biogènes ont d'ailleurs été identifiés à l'intérieur de la structure protéique de la CP (Zaitsev *et al.*, 1999). La présence de CP dans le cerveau appuie également l'hypothèse d'un rôle dans la régulation de la neurotransmission (Shepherd, 1994).

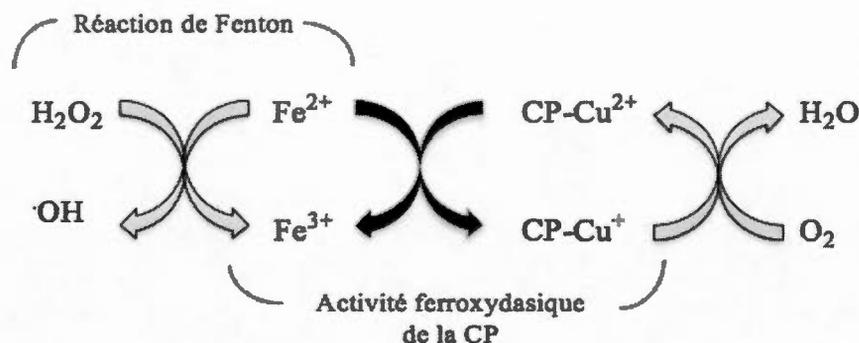
*Activité ferroxidasique:* Le fer est un oligoélément de première importance dans l'organisme. L'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est la seule espèce à pouvoir être transportée par la transferrine (Anderson et Vulpe, 2009) alors que l'ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) dans la structure

de l'hème lié à chacune des quatre sous-unités dans la structure de l'hémoglobine, est l'espèce qui sert à lier l'oxygène ( $O_2$ ) à l'hémoglobine (Wilson et Reeder, 2007). Cependant, sous sa forme libre, le  $Fe^{2+}$  est toxique car il est un oxydant nocif. En effet, il est oxydé en  $Fe^{3+}$  par le  $H_2O_2$  pour former du  $\cdot OH$  et du  $HO\cdot$  (la réaction de Fenton), une EOR dévastatrice (Kruszewski, 2003). La CP fait compétition à la réaction de Fenton en oxydant dix fois plus rapidement le  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  par réduction d'un de ses  $Cu^{2+}$  en  $Cu^+$ .

*Propriétés antioxydantes:* L'activité antioxydante de la CP a été montrée à plusieurs reprises, *in vitro* comme *ex vivo*. (Goldstein *et al.*, 1979; Galdston *et al.*, 1984; Dumoulin *et al.*, 1996; Atanasiu *et al.*, 1998; Aouffen *et al.*, 2001). Elle est probablement l'antioxydant le plus important dans le sang, jouant un rôle critique durant la réponse inflammatoire (Texel *et al.*, 2011). Les cellules fonctionnant selon un mode aérobie sont, en conditions normales, aptes à contrer les dommages provoqués par des espèces réactives oxygénées (ERO) telles que des radicaux superoxydes ( $\cdot O_2^-$ ), des radicaux hydroxyles ( $\cdot OH$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), etc. Ces ERO produites en excès survenus lors d'un stress oxydatif, sont neutralisées par des enzymes intracellulaires spéciales comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion-péroxydase. Également, l'organisme dispose des molécules antioxydantes extracellulaires pour contrer ou réduire les effets pro-oxydants tels que la peroxydation des lipides membranaires et la dégradation de l'ADN (Rikans et Hornbrook, 1997).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle de la CP dans la prévention des dommages causés par le stress oxydatif. L'un de ces mécanismes implique une compétition entre l'activité ferroxidasique de la CP et la réaction de Fenton pour l'utilisation d'ions ferreux et leur conversion en ions ferriques. La réaction de Fenton consiste en la génération de radicaux hydroxyle ( $\cdot OH$ ) à partir du  $H_2O_2$  en présence de  $Fe^{2+}$ . En transformant le  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ , la CP diminue la

disponibilité de  $\text{Fe}^{2+}$  et réduit ainsi la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton (Paquin *et al.*, 2002) (Figure 1.2).



**Figure 1.2** Activité ferroxidasique de la CP et la réaction de Fenton. En oxydant le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ , la CP réduit la disponibilité du  $\text{Fe}^{2+}$  et empêche la formation de  $\cdot\text{OH}$  par la réaction de Fenton (Fenton, 1894).

La CP présente des propriétés cardioprotectrices contre le stress oxydatif dans le modèle du cœur isolé de rat en ischémie-reperfusion (Davis *et al.*, 1987). La CP, par ses propriétés antioxydantes, réduit les dommages cardiaques causés par la génération d'ERO qui conduisent les cellules à un état de stress oxydatif (Chahine *et al.*, 1991).

### 1.1.2 Hémocyanine

L'hémocyanine (HC) est une protéine de la famille des métalloprotéines à cuivre (Makino, 1985), responsable du transport de l'oxygène dans les tissus de certains invertébrés, dont les arthropodes et les mollusques (Van Holde et Miller, 1995). Il s'agit de la principale protéine retrouvée dans le liquide physiologique ayant un rôle similaire au sang chez les vertébrés (Markl, 1986 ; Sanchez *et al.*, 1998). Elle peut atteindre jusqu'à 90% de la teneur en protéines totales (Salvato et Beltramini, 1990).

*Structure et biodiversité de l'hémocyanine:* Parmi les diverses métalloprotéines connues, l'HC se distingue par la présence de 2 atomes de cuivre liés par coordination à une chaîne polypeptidique (Beltramini *et al.*, 2005). Ces atomes responsables de la

liaison réversible de l'oxygène moléculaire où la forme oxygénée du site de liaison sont responsables de la couleur bleue de l'HC. Chaque chaîne polypeptidique comportent un site de liaison à l'oxygène. Bien que l'HC soit présente chez les mollusques et les arthropodes, la structure protéique est totalement différente entre ces deux embranchements (Salvato et Beltramini, 1990).

Parmi les HCs les plus étudiées à ce jour, celle du mollusque marin *Megathura crenulata*, aussi connu sous le nom de «Keyhole Limpet Hemocyanin» (ou KLH), où la forme native est un didécamère ayant un poids total d'environ 8,000 kDa formé de l'assemblage de 10 sous unités d'environ 340 kDa et 400 kDa (Gatsogiannis et Markl, 2009).

*Activité phénoloxidasique et mélanisation:* L'hémocyanine peut agir comme une phénoloxydase (PO). Cette activité de l'HC est responsable de l'oxydation de substances phénoliques en mélanine noire (Kusche *et al.*, 2002 ; Sanchez *et al.*, 1998). De plus, il a été montré chez les arthropodes que l'HC, initialement sous forme d'une prophénoloxydase, peut être fonctionnellement convertie en PO (oxydoréductase, *EC 1.10.3.1*), via une activation en présence de trypsine, pour donner de la mélanine (Salvato *et al.*, 1998 ; Zlateva *et al.*, 1996). C'est la raison pour laquelle la mélanine pourrait être un élément clé de la réponse immunitaire primaire (Söderhäll et Cerenius, 1998), aussi bien qu'un élément structurel de la cicatrisation des arthropodes (Lai-Fook, 1966; Sugumaran, 1996).

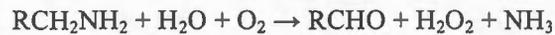
L'hémocyanine est aussi utilisée comme le transporteur d'haptène dans des thérapies antimicrobiennes, le contrôle immunologique des hormones reproductives, et le traitement des maladies auto-immunes (Harris et Markl, 1999).

La forte capacité immunogénique de la KLH est expliquée par sa très grande taille moléculaire impliquant des états d'agrégation de l'ordre de  $4.5 \times 10^3$  kDa (Van Holde *et al.*, 1982 ; 1992).

## 1.2 Les amine oxydases

### 1.2.1 Les amine oxydases, leurs fonctions catalytiques et le rôle métabolique

Les amine oxydases (AO) sont des enzymes largement distribuées (Mondovi et Riccio, 1984) chez les organismes vivants (bactéries, plantes ou animaux). Les AO catalysent la déamination oxydative des amines biogènes (putrescine, cadavérine, spermine, spermidine et histamine), consommant de l'oxygène (O<sub>2</sub>) pour générer l'aldéhyde correspondant, le NH<sub>3</sub> et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Mondovi et Finazzi-Agrò, 1982):



Elles sont généralement classées en deux groupes en fonction de la nature du cofacteur organique impliqué dans le mécanisme d'action catalytique : i) les amine oxydases à flavine adénine dinucléotide (FAD-AO, *i.e.* la monoamine oxydase et la polyamine oxydase); ii) les amine oxydases à cuivre (CuAO, *i.e.* les diamine oxydases (DAO), la lysine-amine oxydase et les amine oxydases sensibles au semicarbazide (SSAO));

Les MAOs à FAD (*EC 1.4.3.4*) sont des enzymes très conservées chez les eucaryotes et sont localisées, au niveau sub-cellulaire, sur la membrane mitochondriale externe. Il existe deux isoenzymes de MAO-FAD: la MOA-A et la MAO-B qui montrent une préférence de substrat: la MAO-A métabolise la sérotonine tandis que la MAO-B a une préférence pour la β-phényléthylamine. L'adrénaline, la noradrénaline et la tyramine sont métabolisées par les deux isoenzymes (Glover *et al.*, 1977).

Chez l'homme les deux isoenzymes de la MAO sont localisées dans différents tissus comme dans le cerveau, le foie, le placenta, etc. (d'après Billett, 2004).

Les MAOs à FAD sont formées de deux sous unités liées par un pont disulfure, associées à un groupement FAD (flavine adénine dinucléotide) jouant le rôle de cofacteur de type groupement prosthétique (De Colibus, 2005).

### **Fonction des MAOs-FAD**

Les MAOs sont impliquées dans la déamination oxydative de monoamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine, sérotonine, tryptamine, tyramine). Elles jouent donc un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie des monoamines et catécholamines en contrôlant leurs concentrations, surtout au niveau des vésicules synaptiques (système nerveux). Elles interviennent également dans la détoxification, notamment par le métabolisme des monoamines alimentaires (Ilett *et al.*, 1980).

*Rôle au niveau du système nerveux central:* Au niveau du système central, les MAOs-FAD participent au *turnover* (l'inactivation) des catécholamines et de la sérotonine, mais également à la détoxification de certains xénobiotiques. Ainsi, le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine ou MPTP, un puissant neurotoxique provenant de molécules thérapeutiques synthétiques (mépéridine), est métabolisé par la MAO-B en MPP<sup>+</sup> (1-Methyl-4-phenylpyridinium), un métabolite capté spécifiquement par les neurones dopaminergiques, provoquant des symptômes ressemblant à ceux de la maladie de Parkinson (Berry *et al.*, 1994).

Certaines maladies dues à la destruction progressive des cellules nerveuses provoquant un défaut dans la synthèse de monoamines (maladie de Parkinson et d'Alzheimer) sont soignées par des inhibiteurs de monoamine oxydases (IMAOs). La maladie d'Alzheimer est, semble-t-il, associée à une augmentation de l'activité MAO-B (Saura *et al.*, 1994b).

Les MAOs-FAD interviennent dans le développement et la maturation de certaines zones du cerveau (Nicotra *et al.*, 2004) et également dans les processus de vieillissement cérébral (Benedetti et Dostert 1989; Cadenas et Davies 2000). De

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

Les amine oxydases à cuivre (CuAO, *EC 1.4.3.6*) sont des oxydoréductases sous forme de dimères avec une masse moléculaire de 70-95 kDa par sous-unité (Cogoni *et al.*, 1990; ; Vianello *et al.*, 1993; McGuirl *et al.*, 1994; Kivirand et Rincken, 2007).

Elles contiennent un cofacteur: le 2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (TPQ) lié par une liaison covalente. Le TPQ provient de la modification d'un résidu de tyrosine endogène (Klinman et Mu, 1994).

Chez les mammifères, trois types d'amine oxydase à cuivre ont été classifiées comme *EC 1.4.3.21* (Buffoni, 2009).

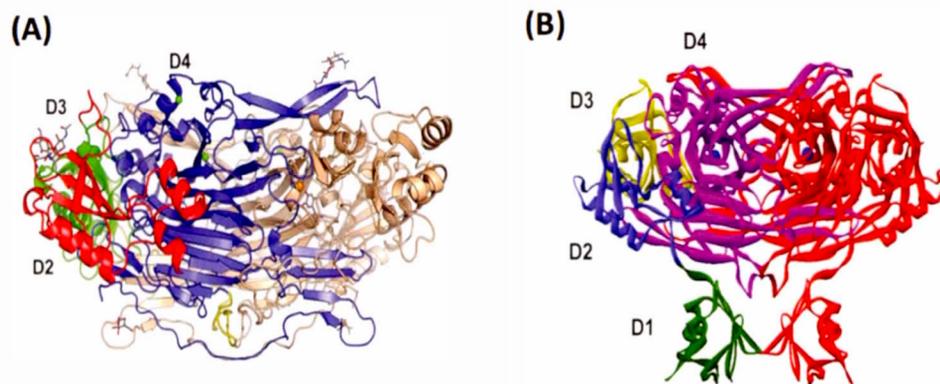
Le premier type, l'oxydase des monoamines, est une enzyme qui oxyde les monoamines primaires, mais pas d'activité pour les diamines. Elles sont sensibles à l'inhibition par les réactifs des groupes carbonyles comme le semicarbazide et possèdent un segment transmembranaire (Yu *et al.*, 2003).

Le deuxième type est représenté par une CuAO soluble que l'on retrouve dans le plasma sanguin (Morris *et al.*, 1997). Cette enzyme, la sérum amine oxydase (*EC 1.4.3.21*) ou l'amine oxydase sérique ou encore la benzylamine oxydase, catalyse l'oxydation d'une grande variété de monoamines et est probablement synthétisée dans le foie (Mu *et al.*, 1994).

Le troisième type correspond à la diamine oxydase (DAO) qui se retrouve au niveau de la muqueuse intestinale, des reins et du placenta (Argento-Cerù et Autuori, 1985). L'enzyme intestinale se retrouve, plus précisément au niveau des villosités, ce qui suggère que l'activité de l'enzyme peut servir d'indicateur sur l'intégrité de la muqueuse de l'intestin (Fogel *et al.*, 2009; Honzawa *et al.*, 2011). En effet, chez les

humains, l'activité de la DAO dans le plasma augmente durant la grossesse ou sous des conditions pathologiques comme différents types de cancer (Agostinelli *et al.*, 2009) ou des maladies inflammatoires de l'intestin (Fogel et Lewinski, 2006).

Des CuAOs ont été investiguées chez diverses sources, telles que: *Escherichia coli*, *Arthrobacter globiformis*, *Aspergillus nidulans* et *Pisum Sativum* (Parsons *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2002; McGrath *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 1996). La diamine oxydase d'origine humaine a été aussi abordée à l'aide des ADN recombinants dans les cellules S2 de drosophile (McGrath *et al.*, 2010). Les CuAO sont des homodimères composés de sous-unités d'environ 700 résidus dont la structure s'apparente à celle de l'amine oxydase provenant de l'*E. coli* (ECAO, Figure 1.3). La ECAO possède quatre domaines parmi lesquels, un domaine N-terminal D1 est relié aux trois autres domaines (D2 à D4). Le domaine D1 est présent seulement dans quatre espèces bactériennes dont *E. coli* (Guss *et al.*, 2009). Les trois autres domaines sont assemblés de manière semblant à la partie supérieure d'un champignon (Figure 1.3).



**Figure 1.3 Structures des amine oxydase à cuivre provenant d'*Escherichia coli* (A) (Brazeau *et al.*, 2004) et de l'humain (B) (McGrath *et al.*, 2010). Pour l'ECAO, une sous unité est colorée en rouge et l'autre colorée par ses domaines D1 (vert), D2 (bleu), D3 (jaune) et D4 (violet). Pour l'amine oxydase humaine (B) les sous-unités sont colorées selon les domaines D2 (rouge), D3 (vert) et D4 (bleu).**

Le D4 est composé de feuilletts *bêta* d'environ 450 résidus et héberge le site actif de l'enzyme qui contient l'ion de cuivre et la TPQ. Le domaine D4 est le domaine prédominant et il contribue à la structure de l'homodimère. En effet, le domaine D4 d'une sous-unité de l'homodimère est imbriqué dans le domaine D4 de la sous-unité opposée. Le dimère est aussi stabilisé par deux brins *bêta* antiparallèles en «épingle à cheveux» qui garde les sous-unités entrelacées et le site actif caché à l'intérieur de la protéine. Les deux autres domaines, D2 et D3, sont situés en périphérie de l'assemblage en forme de «tête de champignon». Ses domaines contiennent à peu près 100 résidus et possèdent une structure et une séquence d'acides aminés semblable (Parsons *et al.*, 1995).

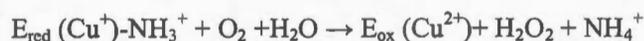
### 1.2.2 Mécanisme catalytique des amine oxydases à cuivre

Le mécanisme des Cu-AO est représenté par deux réactions:

1) la déamination oxydative de l'amine biogène en générant l'enzyme réduite avec la libération de l'aldéhyde

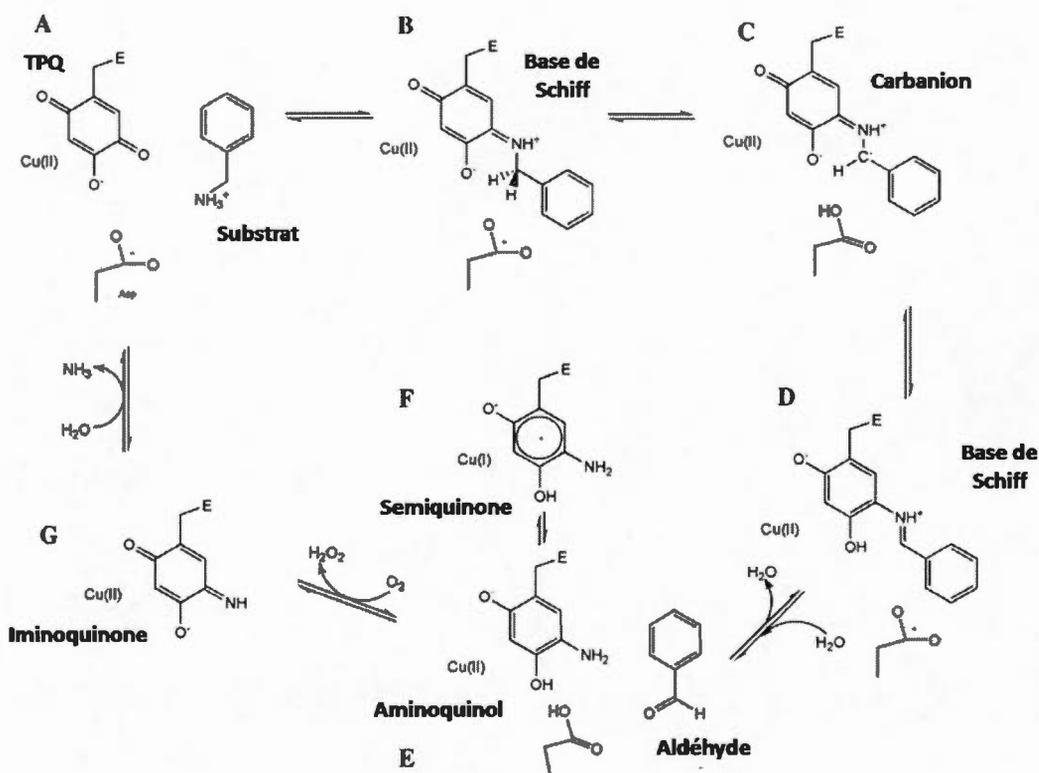


2) la réoxydation de l'enzyme (réduite) avec de l'oxygène en libérant du NH<sub>3</sub> et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



L'étape initiale de la réaction de réduction de l'enzyme débute par une attaque nucléophile sur le carbone C5 de la quinone TPQ par une amine primaire (Figure 1.4-A). La liaison covalente entre les deux molécules produit un intermédiaire de type base de *Schiff* (Figure 1.4-B). Ensuite, un résidu d'aspartate extrait un proton du carbone C1 du substrat (Figure 1.4-C), ce qui produit une seconde base de *Schiff* (Figure 1.4-D) par un intermédiaire carbanion (Figure 1.4-C). L'hydrolyse de la base de *Schiff* libère l'aldéhyde, laissant la TPQ sous forme d'aminoquinol réduit (Figure

1.4-E). En solution, l'intermédiaire aminoquinol/ $\text{Cu}^{2+}$  (Figure 1.4-E) existe en équilibre avec l'intermédiaire semiquinone/ $\text{Cu}^+$  (Figure 1.4-F). La réoxydation de l'enzyme suit avec une molécule d'oxygène pour générer une iminoquinone (Figure 1.4-G) oxydée et du peroxyde d'hydrogène. Pour finir, l'hydrolyse de l'iminoquinone produit la TPQ (Figure 1.4-A) en libérant un ion ammonium.



**Figure 1.4** Schéma du mécanisme catalytique des CuAO-TPQ (d'après Brazeau *et al.*, 2004) avec la bezylamine comme substrat.

Les CuAO, indépendamment de la source, réagissent avec une grande variété d'amines primaires. Par exemple, les CuAO extraites de la levure *Hansenula polymorpha* (HPAO-1 et HPAO-2) montrent une préférence pour certains substrats, de telles sortes que HPAO-1 favorise l'oxydation des petites amines aliphatiques

(méthylamine) tandis que la HPAO-2 préfère les amines aromatiques (benzylamine, Chang *et al.*, 2010).

### **1.2.3 Les amine oxydases à cuivre, leur action sur les amines biogènes et leur rôle métabolique**

Les CuAO étaient considérées comme formant une seule classe *EC 1.4.3.6* attribuée uniquement au cofacteur commun (TPQ). Toutefois, comme deux activités enzymatiques différentes (sur les monoamines et sur les diamines) étaient exercées pour le même regroupement d'enzymes, cette classification a été remplacée par l'amine oxydase des amines primaires *EC 1.4.3.21* (qui peut être aussi nommée: monoamine-oxydase à cuivre / CuMOA, ex. l'amine oxydase sérique) et la diamine oxydase *EC 1.4.3.22*. La sous-sous classe d'amine oxydases des monoamines représente un groupe de CuAO qui oxyde les monoamines primaires mais, ont une faible affinité pour les diamines comme la putrescine, la cadavérine, la spermidine ou l'histamine ou les amines secondaires. Les CuAO se différencient des amine oxydases à flavine adénine dinucléotide (*EC 1.4.3.4*), car les AO à cuivre sont sensibles à l'inhibition des fonctions carbonylées par la semicarbazide. De plus, AO à cuivre possède une homologie proche de la protéine d'adhésion-vasculaire (VAP-1) et est généralement trouvée dans le sérum, l'endothélium, ainsi que le muscle lisse des mammifères (Stolen *et al.*, 2004).

### **Propriétés antitumorales des amine oxydases cuivriques**

Les amine oxydases (*EC 1.4.3.6*) sont des enzymes impliquées dans le métabolisme des amines biogènes et avec une action potentielle antitumorale. L'amine oxydase sérique bovine catalyse la désamination oxydative de polyamines contenant des groupes amines primaires (la spermidine, la spermine et putrescine) en formant des produits cytotoxiques, le peroxyde d'hydrogène et l'aldéhyde correspondant. L'activité anti-tumorale des amine oxydases a été démontré *in vivo* (Lord-Fontaine *et al.*, 2001) avec le système enzymatique spermine/amine oxydase, à la suite des

résultats prometteurs qui ont été précédemment obtenues *in vitro* dans plusieurs lignées de cellules tumorales (Agostinelli *et al.*, 1994; Agostinelli *et al.*, 1996; Calcabrini *et al.*, 2002; Averill-Bates *et al.*, 1993; Averill-Bates *et al.*, 1994). La spermine oxydée est connue pour inhiber la croissance de diverses bactéries (Hirsch et Dubos, 1952; Fletcher *et al.*, 1953; Rosenthal et Tabor, 1956).

Les polyamines sont présentées à des niveaux élevés dans de nombreux tissus tumoraux (cancers du sein, du côlon, du mélanome, du cerveau et du rein, Heby et Persson, 1990). Pour profiter des niveaux plus élevés de polyamines dans la tumeur par rapport à des tissus normaux (Heby et Persson, 1990) des produits toxiques tels que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de l'aldéhydes peuvent être générés *in situ* en introduisant les amine oxydases dans les tumeurs pour induire une cytotoxicité (Averill-Bates *et al.*, 1993; Lord-Fontaine *et al.*, 2001).

Les amine oxydases à cuivre ont des intérêts thérapeutiques potentiels. Les amine oxydases d'origine de sérum bovin ont été montré des propriétés antioxydantes (Atanasiu *et al.*, 1998) et cardioprotection (Mateescu et Nadeau, 2009).

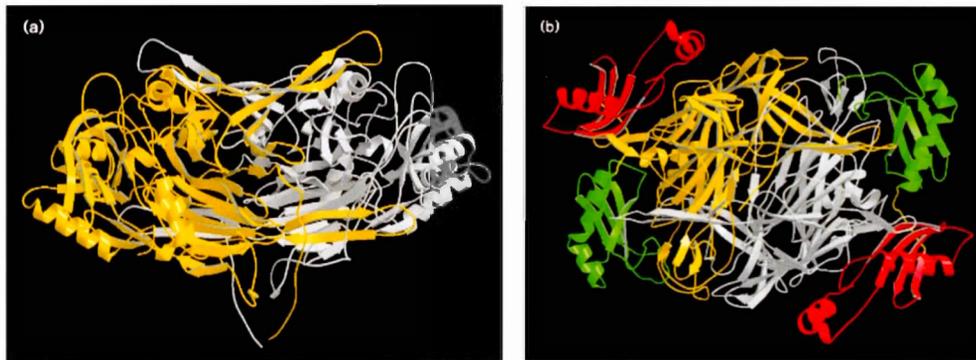
## CHAPITRE II

### LES AMINE OXYDASES A CUIVRE D'ORIGINE VEGETALE

La DAO (EC 1.4.3.22) aussi connue sous le nom d'histaminase peut provenir de plusieurs sources végétales comme *Pisum Sativum*, *Lathyrus Sativus*, *Lathyrus Cicera*, etc. Elle est impliquée dans la croissance et le développement de la plante (Cona *et al.*, 2006), car durant la germination l'activité de DAO augmente dans l'embryon et une quantité élevée d'activité est retrouvée dans les dicotylédones des légumineuses (Scoccianti *et al.*, 1990). La putrescine, une diamine aliphatique, est dégradée par l'enzyme et produit le 4-aminobutanal qui peut être transformé en acide gamma-aminobutyrique (GABA) en présence d'un aldéhyde déshydrogénase. Le GABA est un composé impliqué dans plusieurs processus physiologiques tels que la régulation du pH cytosolique, la protection contre le stress oxydatif et surtout la signalisation. Il intervient dans la régulation des concentrations de  $Ca^{2+}$  endogène et agit aussi comme neurotransmetteur (Yu *et al.*, 2006). Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), un autre produit de la réaction de la DAO, joue un rôle important dans la mort cellulaire ainsi que dans le développement et dans la défense des plantes. Par exemple, un équilibre entre la production de  $H_2O_2$  intracellulaire ou au niveau de la paroi cellulaire pourrait contrôler le taux de croissance cellulaire (Cona *et al.*, 2006). Les amine oxydases, de type DAO, contribuent donc à des processus physiologiques importants chez les plantes à travers leurs produits de réaction. Les DAOs de la *Lathyrus cicera* et de la *Pisum sativum* sont plus réactives et possèdent une meilleure affinité pour les diamines aliphatiques et l'histamine que celle provenant du sérum bovin (Pietrangeli *et al.*, 2007). On peut donc supposer que l'utilisation de la diamine oxydase végétale comme agent thérapeutique est envisageable.

## 2.1 Aspects structuraux

L'amine oxydase issue du *Pisum Sativum* (PSAO) a été cristallisée en par Vignevich *et al.* (1993). Les dimensions moléculaires sont d'environ  $100 \times 63 \times 42$  Å. Chaque sous-unité comprend trois domaines D2, D3 et D4 (Figure 2.1). Ces domaines sont similaires à trois des quatre domaines dans la structure de l'ECAO. Le domaine N-terminal supplémentaire, D1, d'ECAO est absent du gène PSAO. Si la molécule de ECAO est en forme de champignon (Parsons *et al.*, 1995), les deux sous-unités de PSAO forment le chapeau d'un champignon sans la tige.



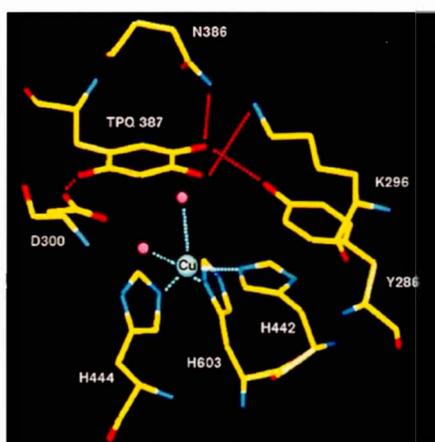
**Figure 2.1** Structure tridimensionnelle de l'amine oxydase du *Pisum Sativum* (PSAO).

(a) Les deux sous-unités sont en orange et blanc. Les deux bras de brins  $\beta$  qui vont de la sous-unité orange le long de la surface de la sous-unité blanche apparaissent clairement. (b) La molécule PSAO. Le grand domaine D4 sandwich  $\beta$  est en orange pour une sous-unité et blanc pour l'autre, comme dans (a). Les domaines D2 et D3 des deux sous-unités sont indiqués en rouge et vert, respectivement. Un domaine N-terminal supplémentaire trouvé dans ECAO n'est pas codé dans le gène PSAO. A partir de chaque domaine D4, un bras de brin  $\beta$  (jaune) se prolonge au long de la surface de la molécule vers le domaine D3 de l'autre sous-unité (Kraulis, 1991).

Le domaine D4 est le domaine prédominant, car il contribue à la structure de l'homodimère. En effet, le domaine D4 d'une sous-unité de l'homodimère est imbriqué dans le domaine D4 de la sous-unité opposée. Le dimère est aussi stabilisé par deux brins bêta antiparallèles qui gardent les sous-unités entrelacées et le site actif

caché à l'intérieur de la protéine. Les deux autres domaines, D2 et D3, sont situés en périphérie de l'assemblage en forme de « tête de champignon» (Vignevich *et al.*, 1993).

Le site actif a plusieurs propriétés remarquables (Figure 2.2). Le site actif de chaque sous-unité est situé vers un bord du domaine D4. L'atome de Cu est lié par les groupes imidazole de trois résidus histidine (His 442, His 444, et His 603) et par deux molécules d'eau, une «équatoriale» et une «axiale».



**Figure 2.2 Site actif de PSAO** montrant l'atome Cu (sphère bleue), les deux molécules d'eau en coordination (sphères magenta), les résidus Cu-liés (His 442, His 444 et His 603), le cofacteur (TPQ387), et autres résidus du site actif. Les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes rouges en pointillées (Kumar *et al.*, 1996).

## 2.2 Mécanisme catalytique et applications thérapeutiques des diamine oxydases

L'atome de Cu et le cofacteur TPQ sont à proximité mais non liés les uns aux autres. L'atome d'oxygène de TPQ se trouve à environ 3 Å de l'atome Cu et un petit mouvement du groupe aromatique TPQ serait nécessaire pour faciliter le transfert extrêmement rapide d'électrons du TPQ à Cu (II) qui se produit dans PSAO (Turowski *et al.*, 1993). Le mécanisme a été illustré dans la figure 1.4.

L'activité de la DAO pour dégrader l'histamine peut être utilisée pour des applications thérapeutiques dans le traitement des troubles intestinaux liés à des amines biogènes dont l'histamine. En effet, la DAO (Histaminase) est la principale enzyme responsable dans la dégradation de l'histamine dans le tractus intestinal et également dans la dégradation de l'histamine extracellulaire par désamination oxydative (Biegański *et al.*, 1983; García-Martín *et al.*, 2009).

Les propriétés thérapeutiques de la diamine oxydase sont liées à son rôle dans le catabolisme de l'histamine. En effet, l'histamine est une amine endogène distribuée à travers les organismes. Elle est générée par la décarboxylation de la L-histidine par l'enzyme histidine décarboxylase (Figure 2.3). L'histamine peut être produite par différentes cellules comme les mastocytes, les granulocytes basophiles, les cellules entérochromaffines ainsi que par les neurones histaminergiques. Elle est ensuite conservée dans les vésicules intracellulaires et libérée par différents *stimuli* (cytokines, lipoprotéines et anticorps) qui participent à la dégranulation des vésicules et à sa libération (Vlieg-Boerstra *et al.*, 2005). L'histamine est aussi produite par les lymphocytes T Helper de type 2 (Th2) et les cellules dendritiques qui agissent par des mécanismes autocrine et paracrine sur la différenciation et sur la prolifération des lymphocytes (Jutel *et al.*, 2002). La synthèse de l'histamine par ces cellules est régulée par les cytokines (Szeberenyi *et al.*, 2001; Jutel *et al.*, 2002). L'utilisation de souris «knock-out» pour le gène de l'histidine décarboxylase a permis de confirmer le rôle de l'histamine dans des modèles de pathologies allergiques (Ohtsu et Watanabe, 2003). L'histamine est impliquée dans les fonctions neurologiques (Hu et Chen, 2012), les fonctions gastriques (Coruzzi *et al.*, 2001) et l'inflammation de la muqueuse intestinale (Smolinska *et al.*, 2014). Les effets de l'histamine sont contrôlés par quatre récepteurs (H1-H4) présents à la surface d'une multitude de cellules, entre autres sur les cellules musculaires, endothéliales, épithéliales ou sur les neurones intestinaux (Fogel *et al.*, 2005).

Les récepteurs H1 sont exprimés au niveau des organes périphériques (muscles lisses) et du système nerveux central. La stimulation de ces récepteurs par l'histamine peut provoquer une vasodilatation et une extravasation des protéines plasmatiques, une bronchoconstriction, une hypersécrétion du mucus et une stimulation des terminaisons nerveuses sensibles. L'activation du récepteur H1 peut donc être responsable de l'hypotension artérielle et de la réponse inflammatoire et allergique, incluant le choc anaphylactique. Le récepteur H2 est exprimé sur la muqueuse gastrique, les muscles lisses vasculaires, les adipocytes et les cellules immunitaires. Dans le système gastro-intestinal, le récepteur H2 est impliqué dans la régulation de la motilité gastrique ainsi que des sécrétions gastriques et intestinales (Jones et Keams, 2010). Le rôle des récepteurs H2 dans la réponse inflammatoire est d'induire la production d'interleukines (IL-6) qui participent au recrutement des lymphocytes T Helper (Gantner *et al.*, 2002; Jutel *et al.*, 2001). Le récepteur H3 est exprimé majoritairement par les fibres nerveuses du cerveau et sa stimulation inhibe la libération d'histamine et autres neurotransmetteurs. Finalement, les récepteurs H4 sont généralement exprimés sur de nombreux tissus (rate, thymus) et les mastocytes (Xie et He, 2005). Ils sont impliqués dans la production de facteurs proinflammatoires induites par des interleukines IL-16 des lymphocytes T (CD8) (Gantner *et al.*, 2002) et IL-10 des monocytes (Takeshita *et al.*, 2003; Dunford *et al.*, 2006).

Le métabolisme de l'histamine est présenté dans la figure 2.3. Elle peut être métabolisée par deux voies distinctes, la déamination oxydative par la DAO ou la méthylation par l'histamine N-méthyltransférase (HNMT, EC 2.1.1.8) dépendamment de l'endroit où se trouve l'histamine. En effet, contrairement à la DAO, la HNMT est une enzyme cytosolique exprimée dans le foie, le côlon et le rein (Schwelberger, 2004). L'histamine extracellulaire est dégradée par la DAO et l'histamine intracellulaire est métabolisée par la HNMT. Ces enzymes sont régulées par leurs produits de réactions, l'imidazole acétaldéhyde et la N-méthylhistamine. La

N-méthylhistamine peut être métabolisée en N-méthylimidazole acétaldéhyde par la monoamine oxydase B ou la DAO.

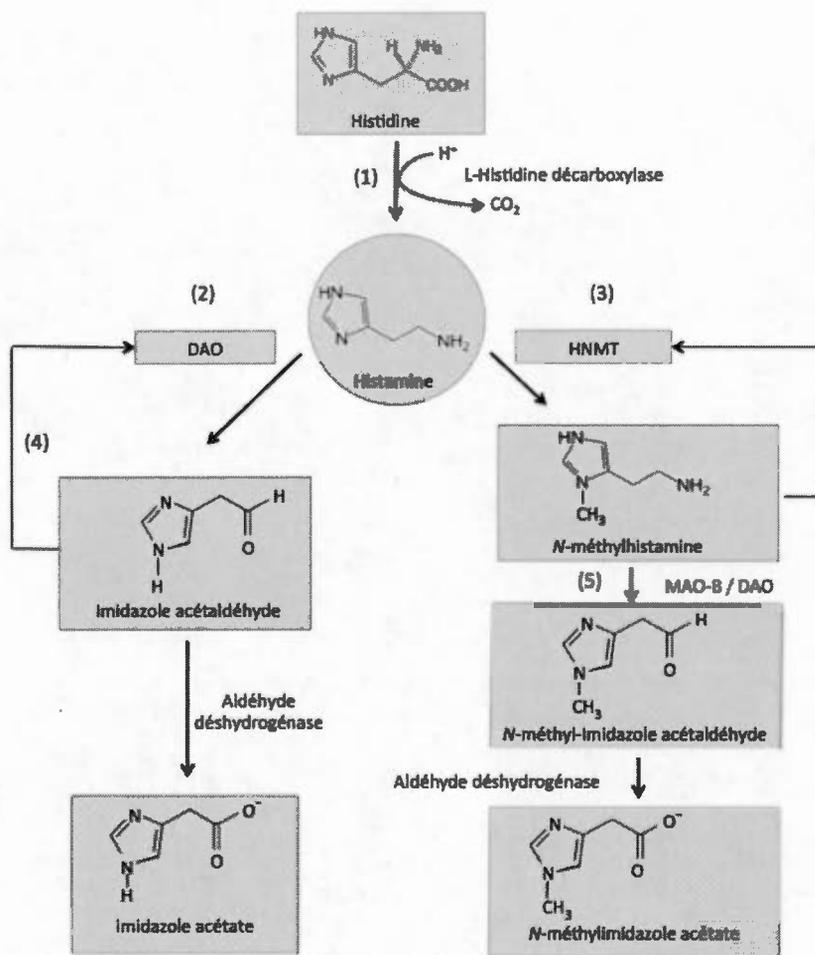


Figure 2.3 Métabolisme de l'histamine (d'après Maintz *et al.*, 2007).

### 2.2.1 La diamine oxydase comme agent antihistaminique et anti-allergène

L'histamine joue un rôle fondamental dans l'anaphylaxie. Grâce à son rôle dans le catabolisme de l'histamine extracellulaire, la diamine oxydase pourrait être impliquée comme agent antihistaminique pour traiter les réactions allergiques et pseudo-allergiques. De plus, l'activité de la diamine oxydase n'est pas directement contrôlée

par l'histamine endogène sécrétée. Ainsi, l'activité de la diamine oxydase plasmatique augmente lors d'un choc anaphylactique, mais n'est pas induite par la libération de l'histamine puisqu'elle ne varie pas lorsque l'histamine est injectée (Masini *et al.*, 2007). Une étude *in vivo* sur les effets antihistaminiques de la DAO d'origine végétale a montré qu'elle présente des effets bénéfiques contre l'anaphylaxie cardiaque (Masini *et al.*, 2002).

L'histaminose alimentaire est une intolérance alimentaire, due à l'augmentation de la présence de l'histamine au niveau de l'intestin liée à des facteurs exogènes, comme des aliments riches en histamine. De plus, une trop faible dégradation enzymatique de l'histamine pourrait être due à une déficience de la diamine oxydase. Les symptômes varient beaucoup, mais ils incluent des maux de tête, malaises gastro-intestinaux (coliques, flatulence, diarrhée) et, dans des cas extrêmes, des crises d'asthme (Maintz *et al.*, 2007). Il existe, sur le marché, la DAO d'origine animale (rein de porc) présentement commercialisée sous les noms de Daosin® et Histame® comme supplément alimentaire visant à soulager les symptômes de l'intolérance alimentaire. Une étude randomisée en double aveugle sur des individus souffrant d'intolérance alimentaire a été conduite afin de vérifier la reproductibilité des symptômes liés à ce malaise. Malgré une variabilité trop élevée pour établir une reproductibilité des symptômes, une diminution des signes a été observée chez les patients qui ont consommé des capsules de DAOSin® ou Histame® (Komericki *et al.*, 2011).

L'asthme allergique est une maladie respiratoire majeure dont l'incidence ne cesse d'augmenter dans le monde entier. Les mécanismes impliqués sont très complexes et sont, à ce jour, peu compris. Toutefois, il existe un consensus que l'histamine est un médiateur essentiel de l'inflammation et du bronchospasme, deux éléments clés de l'asthme allergique (Page *et al.*, 2001). Masini et collab. (2004) ont effectué une étude sur les effets de la diamine oxydase sur des cobayes dont une réaction similaire à l'asthme allergique a été induite. La diamine oxydase libre ou immobilisée sur BrCN-

Sepharose a été administrée par voie intra péritonéale. Un pré-traitement par la diamine oxydase par voie intrapéritonéale ou sous forme d'aérosol a montré une diminution des anomalies respiratoires et une prévention d'un arrêt respiratoire. De plus, le traitement à la DAO a montré un effet contre la bronchoconstriction. Enfin, le traitement à la DAO réduit les lésions au tissu pulmonaire causées par l'inflammation (Masini *et al.*, 2004).

Chez les patients qui souffrent de maladies inflammatoires de l'intestin, les modifications au niveau de la muqueuse intestinale sont corrélées avec les changements de l'activité de la DAO et/ou du contenu en histamine. Ainsi, des concentrations élevées en histamine et des activités réduites en DAO ont été enregistrées au niveau de la muqueuse intestinale chez des patients atteints de colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn (Schmidt *et al.*, 1990). Dans ce contexte, une activité réduite de la DAO peut être un indicateur potentiel des dommages survenus à la muqueuse intestinale dans les maladies inflammatoires de l'intestin. L'activité de la DAO au niveau de la muqueuse enflammée chez les patients souffrant de colite ulcéreuse est inférieure comparativement au tissu normal (Schmidt *et al.*, 1990). Chez les patients souffrant de la maladie de Crohn, la diminution de l'activité de la DAO a été corrélée avec la sévérité des modifications histologiques au niveau de la muqueuse intestinale. Les patients avec des valeurs très basses de la DAO étaient prédisposés à une réapparition de la maladie. Ces observations ont suggéré que des mesures de l'activité de la DAO peuvent être utiles pour prévoir le risque de réapparition de la maladie ou des possibles complications après une résection intestinale (Thompson *et al.*, 1988). Raithel *et al.* (1995) ont montré que les niveaux d'histamine peuvent rester dans des limites normales, même si l'activité de la DAO était réduite, à cause d'une possible augmentation du catabolisme de l'histamine par la voie de méthylation. Ainsi, l'excrétion urinaire du N-méthylhistamine est augmentée chez les patients avec la maladie de Crohn (Winterkamp *et al.*, 2002) et peut aussi représenter un marqueur de l'activité de la maladie.

### 2.2.2 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les molécules pro-oxydantes et celles anti-oxydantes en faveur des premières, ce qui peut conduire à des dommages cellulaires (Sies, 1997). Parmi les espèces réactives d'oxygène (ERO) on retrouve les radicaux libres (l'anion superoxyde,  $\cdot\text{O}_2^-$ , et le radical hydroxyle,  $\text{HO}\cdot$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ). Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent conduire à des dégâts cellulaires irréversibles au niveau des lipides, protéines, enzymes, carbohydrates et acide désoxyribonucléique (ADN), ainsi que des dégâts aux membranes cellulaires (i.e. la peroxydation des lipides membranaires). Le stress oxydatif est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques, tels que les états inflammatoires aigus, le vieillissement, le cancer, les maladies auto-immunes, cardio-vasculaires ou neurodégénératives (Ratnam *et al.*, 2006).

Il y a de nombreuses oxydases (i.e. monoamine oxydase, MAO, diamine oxydase, DAO, polyamine oxydase) qui utilisent l'oxygène moléculaire comme substrat pour former le  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'élimination du  $\text{H}_2\text{O}_2$  est très importante pour les tissus, car son excès peut contribuer à l'oxydation de différents composés cellulaires. En ce qui concerne le catabolisme du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , deux enzymes du système de défense cellulaire, la catalase et la peroxydase, participent principalement à sa décomposition (Chance *et al.*, 1979; Bai *et al.*, 1999).

La catalase (EC 1.11.1.6) est une protéine hémique représentée par quatre sous-unités identiques, avec une masse moléculaire d'environ 240 kDa. Chaque sous-unité de catalase contient un ion de fer (III) dans un noyau de protoporphyrine. La catalase se trouve à une concentration élevée dans plusieurs organes comme le foie, les reins, en étant localisée principalement au niveau des peroxysomes, mais elle peut aussi se trouver au niveau du cytosol dans les érythrocytes. La catalase se trouve dans une quantité moins importante au niveau de l'intestin. Sa fonction principale est la

transformation du  $H_2O_2$  en eau et oxygène. Pour les concentrations élevées de  $H_2O_2$ , la catalase est la principale enzyme qui intervient dans sa décomposition, tandis que pour les traces, d'autres enzymes avec une fonction peroxydasique (*i.e.* GSH peroxydase) peuvent intervenir (Agostinelli et Seiler, 2006).

### **2.3 Modalités de la détermination des activités enzymatiques de la DAO**

Un dosage enzymatique pour être «adapté à l'objectif», il devrait être spécifique, sensible, quantitatif et idéalement, simple et rapide à effectuer. Il devrait également permettre le dosage de l'activité enzymatique dans des préparations enzymatiques brutes et purifiées. Il existe deux grandes approches de base pour mesurer l'activité enzymatique: méthodes en cinétique et méthodes à temps fixe.

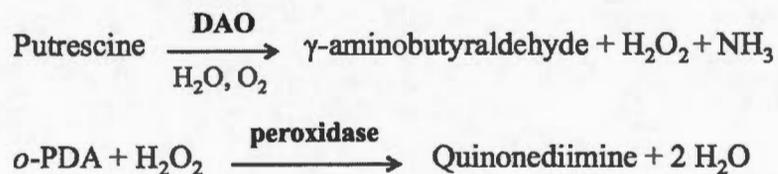
Le dosage d'une enzyme en cinétique consiste à suivre en continu la quantité du composé choisi, soit la disparition de substrat ou la formation du produit. Les méthodes spectrométriques (colorimétrique, spectrophotométrique, spectrofluorométrique, etc.), électrochimiques (ampérométrique, potentiométrique) et radiométriques sont souvent employées (Beisson *et al.*, 2000). En effet, elles peuvent fournir des valeurs en continu. Les dosages en cinétique sont préférentiellement utilisés si possible, car ils permettent de s'assurer que la réaction se déroule dans la partie linéaire initiale.

Une autre approche souvent utilisée est celle du dosage à temps fixe. Elle consiste essentiellement à mélanger les composantes de la réaction et ensuite à les incuber durant un certain temps de réaction. Généralement, on arrête la réaction au bout du temps fixé soit par action de la chaleur soit par un changement de pH (entre autres). À la fin de cette incubation pour un temps déterminé, la quantité de substrat restant ou de produit formé est mesurée. Le dosage du composé choisi peut se faire par des méthodes spectroscopiques, radio-isotopiques ou autres. La principale faiblesse de cette approche est qu'elle ne permet pas de savoir avec certitude si le prélèvement des

échantillons est réalisé à un point où la réaction se trouve dans la portion linéaire initiale.

*Méthode cinétique en un temps fixé*

Dans le cas de la diamine oxydase, la mesure de son activité se réalise par spectrophotométrie. Cette méthode utilise comme substrat la putrescine (1,4-diaminobutane) qui est transformée par la diamine oxydase en aldéhyde en produisant du peroxyde d'hydrogène, la peroxydase comme deuxième enzyme et un co-substrat de la peroxydase, ex. l'ortho-phenylenediamine (*o*-PDA) qui est oxydée en quinonediimine, par la peroxydase en présence du peroxyde d'hydrogène. Après quelques minutes (Ex : dix minutes), la réaction est arrêtée par l'addition d'un puissant inhibiteur, par exemple la guanidine.

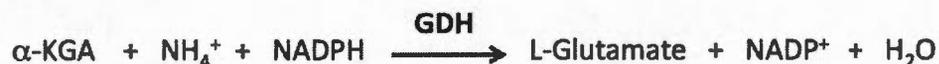


La quinonediimine, le produit de la deuxième réaction, est un composé coloré (jaune-brun) qui absorbe à 484 nm. Elle est mesurable par son coefficient d'extinction moléculaire. Les conditions sont établies en utilisant une courbe standard préparée avec une série de concentrations du peroxyde d'hydrogène. La concentration du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (le produit de la première réaction) sera mesurée étant donné que le nombre de moles de quinonediimine est égal à celui de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Bolmstedt et Tham, 1959).

Dans le cas de l'association de la DAO avec la catalase, le dosage enzymatique de la DAO par la peroxydase ne peut pas s'appliquer en raison de la décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la catalase associée. Dans ces cas, l'activité enzymatique de la DAO peut également être évaluée en utilisant un kit de dosage de l'ammoniac (Sigma-Aldrich).

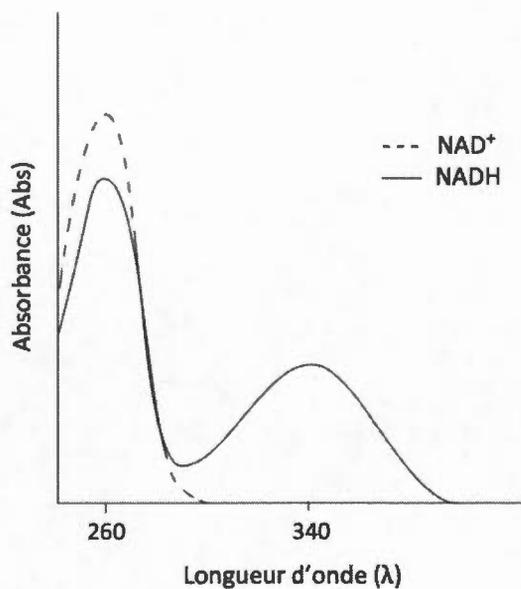
*Le dosage de l'ammoniac par la méthode enzymatique avec la L-glutamate déshydrogénase (GDH)*

Le kit de dosage de l'ammoniac permet la détermination enzymatique de l'ammoniac dans les aliments et les échantillons biologiques. L'ammoniac (le produit de la première réaction catalysée par la DAO) réagit avec l'acide  $\alpha$ -cétooglutarique (KGA) et la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), en présence de L-glutamate déshydrogénase (GDH), pour former le L-glutamate et la forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) de la manière suivante:



Dans cette technique qui est basée sur la variation d'absorbance (densité optique) en fonction du temps (dA/dt), le substrat (NADPH) et le produit (NADP<sup>+</sup>) absorbent à des longueurs d'onde différentes et distinctes (Figure 2.5). On suit par conséquent la diminution de l'absorbance du substrat NADPH.

La variation de NADPH (ou NADH), puisqu'il interagit mole à mole avec le substrat, est directement utilisable pour mesurer la vitesse de la réaction. Le spectre d'absorption (Figure 2.5) présente un maximum d'absorbance à 340 nm pour le NADH alors que le NAD<sup>+</sup> (ou NADP<sup>+</sup>) n'absorbe pas à cette longueur d'onde (Cheuk et Finne, 1984).



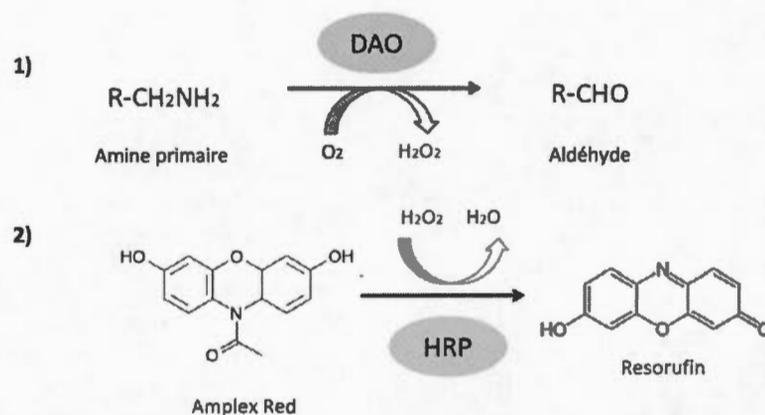
**Figure 2.4** Absorbance du  $\text{NAD}^+$  et du NADH en fonction de la longueur d'onde

La diminution de l'absorbance à 340 nm, due à l'oxydation de NADPH, est proportionnelle à la concentration d'ammoniac. La L-Glutamate déshydrogénase réagit spécifiquement avec l'ammoniac formé. Le problème qui limite l'emploi de cette méthode dans le cas des matrices de type alginate est que l'ammoniac ou  $\text{NADP}^+$  peuvent être retenus par des groupes carboxyliques d'alginate.

#### *Méthode fluorimétrique*

Les méthodes fluorimétriques sont des techniques simples et sensibles pour déterminer l'activité enzymatique de la monoamine et de la diamine oxydase *in vitro* par le dosage du peroxyde d'hydrogène libéré en utilisant un substrat fluorogène. Cette méthode est basée sur la formation d'un produit fluorescent à partir du peroxyde d'hydrogène libéré en tant que produit secondaire lors de la désamination oxydative des amines primaires. Le peroxyde d'hydrogène génère l'oxydation d'un substrat fluorogène comme l'acide homovanillique (Snyder *et al.*, 1968; Matsumoto *et al.*, 1982) ou Amplex® Red (Mayer *et al.*, 2007) transformé en résorufine, une réaction

catalysée par la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase) (Figure 2.6). L'oxydation de l'Amplex nonfluorescent donne la résorufine fortement fluorescente avec une longueur d'onde d'excitation à 570 nm et d'émission à 585 nm (Mayer *et al.*, 2007).



**Figure 2.5 Dosages enzymatiques couplés en utilisant le réactif Amplex® Red.** L'oxydation d'une amine primaire par la diamine oxydase se traduit la production de  $H_2O_2$  (1) qui est couplée à la conversion du réactif fluorescent Amplex® Red à résorufine par HRP (2).

Ces analyses sont en général beaucoup plus sensibles que les analyses spectrophotométriques (jusqu'à 100 fois plus sensibles), mais elles peuvent subir des interférences causées par le pH de la solution d'échantillon, ou par des impuretés et de l'instabilité de nombreux composés fluorescents lorsqu'ils sont exposés à la lumière.

#### *Méthode oxymétrique*

L'autre méthode pour suivre la cinétique de la réaction enzymatique est l'oxymétrie. Puisque la présence d'oxygène dans la réaction catalysée par diamine oxydase est nécessaire, la mesure de la consommation d'oxygène au moyen d'un oxymètre est une méthode couramment utilisée (Befani *et al.*, 1989), en sachant que la consommation d'une mole d' $O_2$  correspond la disparition d'une mole de putrescine (substrat) et donc correspond la formation d'une mole de *gamma*-

aminobutyraldehyde. Cette technique est basée sur la mesure de la disparition de l'oxygène du milieu, à l'aide d'une sonde oxymétrique, en fonction du temps. Elle présente une bonne sensibilité et les solutions troubles ne provoquent pas d'interférences. Le seul problème pouvant se poser est l'utilisation de l'oxygène par d'autres réactions non désirables.

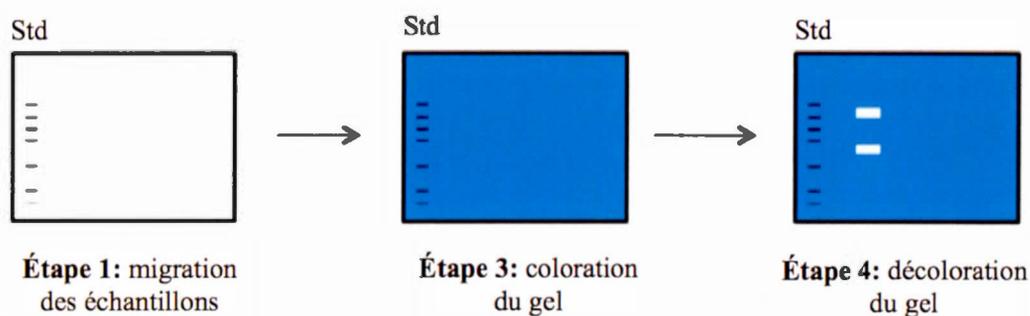
#### *Chimiluminescence*

L'enzyme couramment utilisée pour luminescence est la peroxydase. Cette enzyme peut être utilisée avec les systèmes chimiluminescents en différents dosages. Le substrat approprié pour la peroxydase dans cette technique est le luminol. Il est oxydé dans la réaction avec du  $H_2O_2$  (catalysée par peroxydase) et génère une chimiluminescence proportionnelle à l'activité enzymatique (Kondo *et al.*, 1994). Bruun et Houen (1996) ont développé la méthode chemiluminescence pour détecter l'activité de la diamine oxydase en utilisant putrescine (comme substrat) et Horseradish peroxydase et luminol pour la détection du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) produit par la diamine oxydase.

#### *Méthode zymographique*

L'une des premières techniques développées permettant de mesurer l'activité des protéases est la zymographie (Overall et Limeback, 1988). La zymographie est une technique d'électrophorèse particulière qui consiste à faire migrer des protéases dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) contenant un substrat protéique de type protéoglycanes (Barrett *et al.*, 1966), gélatine (Itoh *et al.*, 1998) ou caséine (Leber et Balkwill, 1997) sont utilisés pour la zymographie. Sous l'action du SDS, les protéases vont perdre leur conformation tridimensionnelle pour adopter une conformation linéaire. Ainsi, les protéases deviennent dénaturées. Le SDS empêche le repliement des protéases et leur confère une charge négative. La séparation électrophorétique des protéases se fait en fonction de leur tailles et donc de leur masse moléculaire. Après la migration, les protéases vont dégrader le substrat

protéique. Le gel est ensuite coloré avec le bleu de Coomassie. Il apparaîtra une coloration bleue sur les surfaces où le substrat protéique n'a pas été dégradé dans le gel. Après la décoloration à l'aide d'une solution d'acide acétique à 10 % (v/v) et de méthanol à 20 % (v/v), les bandes blanches indiqueront la présence de protéinases (Figure 2.7). L'intensité de ces bandes est proportionnelle à la quantité de protéinase qui a réussi à hydrolyser le substrat (Overall et Limeback, 1988).



**Figure 2.6** Principales étapes de la zymographie

#### *Zymographie des amine oxydases*

Cette approche est basée sur une réaction couplée à la peroxydase immobilisée dans les gels de polyacrylamide (Calinescu *et al.*, 2010 ; Mateescu *et al.*, 2012). L'activité de la DAO peut être déterminée directement sur des gels d'électrophorèse de polyacrylamide contenant de la peroxydase immobilisée, avec putrescine comme substrat de la DAO et l'*ortho*-phénylène diamine (*o*-PDA) comme co-substrat pour la peroxydase (Mateescu *et al.*, 2012). L'accumulation de quinonediimine, comme produit d'oxydation de la réaction catalysée par la peroxydase, a conduit à l'apparition des bandes jaunes-brunes bien-définies sur gels. L'intensité de ces bandes a été corrélée avec l'activité enzymatique de la DAO. (Calinescu *et al.*, 2010). Cette technique également peut déterminer l'activité de la DAO en présence de plusieurs protéines bioactives interférents comme catalase, protéases, etc., tel que décrit au chapitre 5 du mémoire.

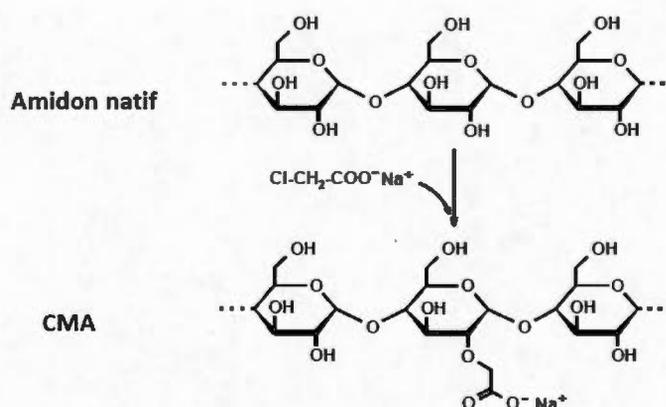
## CHAPITRE III

### EXCIPIENTS POLYCARBOXYLIQUES POUR LA LIVRAISON D'AGENTS BIOACTIFS AU NIVEAU INTESTINAL

La recherche pharmaceutique est principalement centrée sur l'élaboration de principes actifs plus efficaces, plus spécifiques ou moins toxiques, mais le rôle de l'excipient est également fondamental. Non seulement, il doit permettre le transport du principe actif jusqu'à son lieu d'action, mais aussi le protéger afin de conserver au mieux ses propriétés thérapeutiques. Un bon excipient permet de réduire les quantités des principes actifs utilisés, diminuant ainsi les effets secondaires et le coût du médicament. Dans ce mémoire des polymères polycarboxyliques qui présentent l'avantage de pouvoir adapter leur structure et leur fonctionnalité dépendamment des valeurs du pH du tractus gastro-intestinal (Mulhbacher *et al.*, 2004; Demande de Brevet américain US 2014/0212492 A1, 2012b) seront utilisés comme excipients. Plusieurs polymères naturels (amidon, cellulose, alginate) et leurs dérivés, (carboxyméthylamidon et carboxyméthylcellulose) ainsi que des polymères synthétiques (*e.g.* dérivés d'acide acryliques comme le polyacrylate de méthyle connu sous le nom commercial d'Eudragit®) ont été évalués et utilisés pour le transport et la livraison des principes actifs au niveau des différents segments de l'intestin. Les polymères synthétiques dans les formulations pharmaceutiques permettent d'adapter leurs caractéristiques au but visé tandis que les polymères naturels sont plus utilisés grâce à leurs caractéristiques de biocompatibilité et biodégradabilité.

### 3.1 Le carboxyméthylamidon

Le carboxyméthylamidon (CMA) a été synthétisé à partir de l'amidon par l'éthérisation des groupes hydroxyles (OH) au moyen d'une substitution nucléophile bimoléculaire (SN2) avec de l'acide monochloroacétique (Schell *et al.*, 1978) ou du monochloroacetate de sodium (Figure 3.1) dans des conditions basiques (Khalil *et al.*, 1990 ; Sangseethong *et al.*, 2005 ; Tijssen *et al.*, 2001).



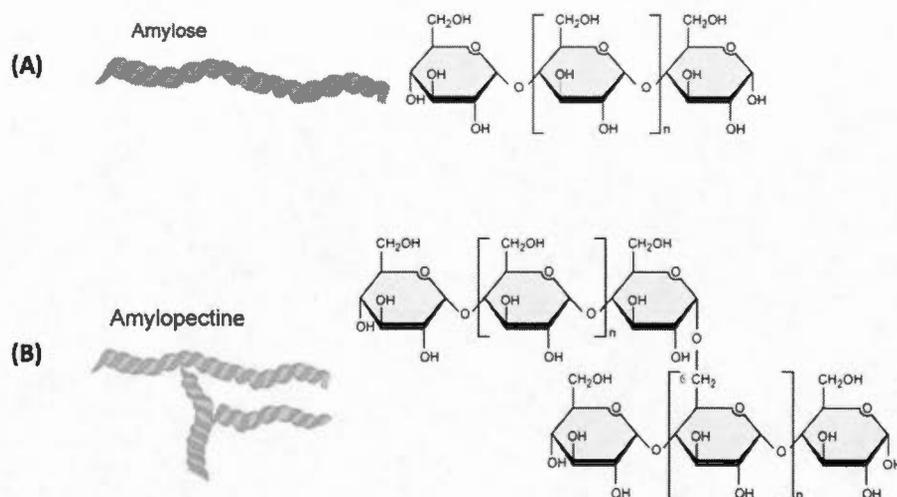
**Figure 3.1** Schéma de la synthèse du carboxyméthylamidon

#### *Structure et caractéristiques de l'amidon: la matière première*

L'amidon est un polysaccharide naturel provenant de la photosynthèse et permettant le stockage du glucose chez les plantes. Les principales sources d'amidon sont les graines de céréales (blé, maïs, orge), certains tubercules (pommes de terre) et grains de légumineuses, mais aussi des algues. Ce polysaccharide est composé de l'amylose et de l'amylopectine (Néel, 1965).

L'amylose est un polysaccharide non-ramifié, formé d'unités de D-glucopyranose liées les unes aux autres par des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques (Alger *et al.*, 1997). Dans cette structure, le carbone C-1 de chaque unité de glucose adopte une configuration stérique  $\alpha$ . Dans l'amidon, l'amylose peut être associé à l'amylopectine,

un polysaccharide ramifié (Figure 3.2) qui présente des liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6-glucosidiques.



**Figure 3.2** Schéma de la structure d'amylose (A) et d'amylopectine (B) (Buleon *et al.*, 1998).

L'amidon est la principale source de glucides humaine (Robyt, 2008) et est largement utilisé dans l'industrie alimentaire dû à son faible coût et à ses propriétés fonctionnelles. Il est aussi utilisé dans les autres industries, entre autre, dans l'industrie papetière comme agents floculant et d'adhésion (Maurer et Kearney, 1998). L'amidon est très utilisé dans l'industrie pharmaceutique et à divers niveaux. Il peut servir, grâce à sa capacité de former des complexes avec les acides gras, ex. la formulation de la vitamine A palmitate (Brevet américain US3666557 A, 1972). Il peut aussi être utilisé, lorsque complexé avec l'iode, comme agent bactéricide.

De plus, l'amidon réticulé a été introduit, il y a quelques années, comme matrice pour la libération contrôlée de médicaments par voie orale (Lenaerts *et al.*, 1991). Cet nouvel excipient, produit depuis 1995 par la société Labopharm Inc., a été développé en partenariat avec l'équipe de recherche du Pr. Mateescu est enregistré sous le nom

de Contramid®. Un faible taux de réticulation de l'excipient permettant une bonne flexibilité des chaînes et une forte association par des liaisons d'hydrogène, le rend approprié pour la libération lente de certains principes actifs, car la matrice est plus stable. Un système de libération contrôlée sous forme de comprimés basé sur la compression directe de l'amidon riche en amylose réticulé et des principes actifs avec un trop long temps de libération a été amélioré par l'ajout de l' $\alpha$ -amylase (Dumoulin *et al.*, 1999) dans les comprimés. L' $\alpha$ -amylase hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques de l'amidon ce qui peut moduler le temps de libération du principe actif. L'utilisation de dérivés d'amidon comme excipients pharmaceutiques permet non seulement d'administrer des médicaments classiques, mais également d'envisager des traitements à base de principes actifs d'origine biologique, comme des bactéries ou des enzymes. L'amidon peut être physiquement ou chimiquement modifié afin d'améliorer ses fonctions. Une caractéristique commune de plusieurs de ces dérivés d'amidon est qu'ils possèdent une plus grande résistance à la dégradation par l' $\alpha$ -amylase que les amidons natifs (Calinescu *et al.*, 2005; Copinet *et al.*, 2001; Dumoulin *et al.*, 1999). Des différents dérivés de l'amidon comme le carboxyméthylamidon ou le succinylamidon, obtenus par fonctionnalisation, offrent une bonne gastroprotection. Ainsi leur utilisation est possible pour la formulation des enzymes pancréatiques (Massicotte *et al.*, 2008).

Le CMA comme les autres amidons substitués est défini et caractérisé en termes de degré de substitution (DS) (Newman *et al.*, 1996 ; Wurzburg, 1986). Le DS du CMA est exprimé par le nombre de groupements carboxyméthyle par unité de glucose. Il varie entre zéro et trois, car chaque unité de glucose ne possède que trois groupes hydroxyle, un primaire et deux secondaires (Tijssen *et al.*, 2001). Le DS peut être évalué par plusieurs méthodes telles que la titrimétrie (Stojanovic *et al.*, 2005), la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Massicotte *et al.*, 2008). Récemment, une nouvelle méthode de dosage du DS par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) semble une méthode facile et rapide (Liu *et al.*, 2012). Plusieurs

études ont été consacrées à la synthèse du CMA et à l'optimisation de son rendement et de son DS (Stojanovic *et al.*, 2005; Lazik *et al.*, 2002; Heinze *et al.*, 2004; Lemieux *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). En général, plus le DS est élevé, plus longue sera la libération de l'agent actif (Lemieux *et al.*, 2009).

#### *Applications pharmaceutiques*

Le CMA était utilisé comme additif pour des applications alimentaires, agent de chélation des métaux lourds, agent épaississant et d'agent gélifiant. Également, le CMA est utilisé comme excipient dans l'industrie pharmaceutique. Le CMA a été synthétisé à partir d'amidon réticulé (Mulhbacher *et al.*, 2001) comme excipients pour la libération lente de médicaments et aussi synthétisé à partir d'amidon natif (non réticulé) (Mulhbacher *et al.*, 2004; Calinescu *et al.*, 2005; Mulhbacher *et al.*, 2001). De plus, CMA a été utilisé pour la libération de petites molécules (Mulhbacher *et al.*, 2004; Lemieux *et al.*, 2010; Friciu *et al.*, 2013) mais aussi d'agents bioactifs comme des peptides, des protéines et des microorganismes (Calinescu *et al.*, 2005; Calinescu et Mateescu, 2010). Sous forme de comprimés pour administration orale, le CMA offre dans l'estomac une protection des agents actifs face à l'acidité gastrique grâce à la protonation des groupements carboxyliques, ce qui provoque un compactage de la matrice et limite la pénétration du fluide gastrique (acide) dans le comprimé. Lorsque le comprimé continue son transit dans le milieu intestinal (neutre), il y a la déprotonation et l'ionisation des groupements carboxyliques par l'échange des protons pour des cations (ex.  $\text{Na}^+$ ). Le comprimé s'hydrate et cette hydratation facilite le gonflement de la matrice dans le milieu intestinal contenant de la pancréatine suivi de l'érosion du CMA dépendante de l' $\alpha$ -amylase (présente dans la pancréatine) et du degré de substitution (DS). L'agent actif est ainsi libéré dans l'intestin.

Le CMA possède des bonnes propriétés pour la libération de principes actifs au niveau de l'intestin mais sa capacité de livrer des agents actifs au niveau de l'intestin

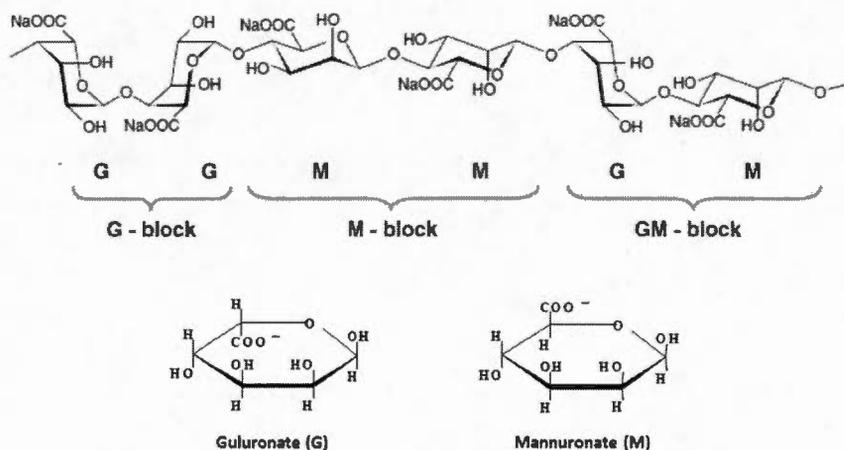
gros est limitée, car il peut être solubilisé dans l'intestin grêle avant d'arriver dans le côlon, en plus d'être sensible à l'amylolyse. Afin de surmonter ce problème, le CMA a été associé au chitosane pour la libération contrôlée au niveau du côlon (Calinescu et Mateescu, 2008). En effet, le chitosane est un polymère cationique naturel qui est biocompatible et biodégradable. Dans le milieu gastrique, les comprimés de chitosane (Knapczyk, 1993; Sabnis *et al.*, 1997; Kawashima *et al.*, 1985) forment un hydrogel lié à la protonation des groupements amines. Par contre, différemment du CMA, le chitosane est insoluble dans le milieu intestinal. L'association du CMA (charges négatives) et du chitosane (charges positives) offre une stabilité mutuelle des polymères grâce aux interactions ioniques qui assurent une double protection face à l'acidité pour les principes actifs sensibles au pH gastrique. De plus, dans le milieu intestinal, il y a formation d'un hydrogel grâce au chitosane, qui assure une protection contre les enzymes pancréatiques et retarde la libération du principe actif (Calinescu et Mateescu, 2008). Les charges opposées de ces deux polymères permettent la formation d'un complexe polyélectrolyte plus stable et favorable à la libération contrôlée de médicament (Assaad *et al.*, 2011).

Une alternative à l'utilisation du chitosane (qui n'est pas encore approuvé par FDA à cause des risques de contamination avec des endotoxines microbiennes) (Davydova *et al.*, 2000) est le renforcement du CMA avec de l'alginate. En effet, lors des passages gastrique et intestinal, il y a une certaine perte d'agent actif à cause des propriétés du CMA. Afin de pallier cet inconvénient, le CMA comme matrice pourrait être amélioré en l'associant avec l'alginate par complexation avec les ions bivalents (*i.e.* calcium) pour éviter la migration des agents bioactifs des microbilles vers le milieu extérieur.

### **3.2 L'alginate**

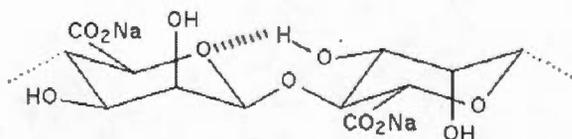
L'alginate est un polysaccharide anionique, hydrosoluble et naturel ou produit par les algues de la classe des *Phaeophyceae*. Il est extrait des ces algues par une solution de

carbonate de sodium. Il représente à peu près 40% du poids sec des algues et se trouve sous forme de sels avec des cations  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  ou  $Na^+$  dans la matrice intracellulaire (Gombotz *et al.*, 2012). L'alginate commercial est principalement extrait des algues brunes (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* et *Macrocystis pyrifera*) et est principalement commercialisé sous la forme d'alginate de sodium. La structure de l'alginate est celle d'un polymère carboxylique non-ramifié composé de blocs M (blocs MM) et G (blocs GG) à base de résidus d'acide  $\beta$ -D-mannuronique (mannuronate; M) et d'acide  $\alpha$ -L-gulonique (guluronate; G) dans des séquences intercalées tout le long de la chaîne séparées par des zones aux structures alternées (blocs MG). La conformation des cycles des monomères peut être déterminée par diffraction de rayons X (Atkins, 1973a, 1973b). L'étude des alginates riches en mannuronate et en guluronate a montré que les blocs guluronate ont une conformation chaise  ${}^1C_4$  (les carbones 1 et 4 étaient respectivement au-dessus et en dessous du plan moyen de la molécule) alors que les blocs mannuronate ont une conformation chaise  ${}^4C_1$  (Gacesa, 1988) (Figure 3.3).



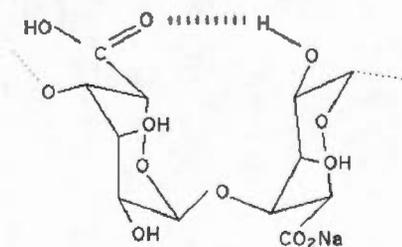
**Figure 3.3** Structure partielle de l'alginate arrangée dans une séquence intercalée (...GGMMGM...) de guluronate et mannuronate

La structure des segments polyacide mannuronique est proche de celle de la cellulose. Les liaisons diéquatoriales entre unités M donnent à ces segments une structure aplatie, de type ruban. Cette structure est stabilisée grâce à des liaisons hydrogène (Figure 3.4). Par exemple, le groupement hydroxyle en C3 du monomère M+1 interagit avec l'atome d'oxygène du cycle du monomère M.



**Figure 3.4** Interactions entre les unités M

La liaison diaxiale (GG) est très différente de la liaison (MM) car sa structure n'est pas plate et adopte l'arrangement plus rigide d'une boucle. Cette structure est aussi stabilisée par différentes liaisons hydrogènes (Figure 3.5). Par exemple, le groupe hydroxyle en C2 du monomère G et le groupe carboxyle du monomère G+1 interagissent par ce même type de liaison.



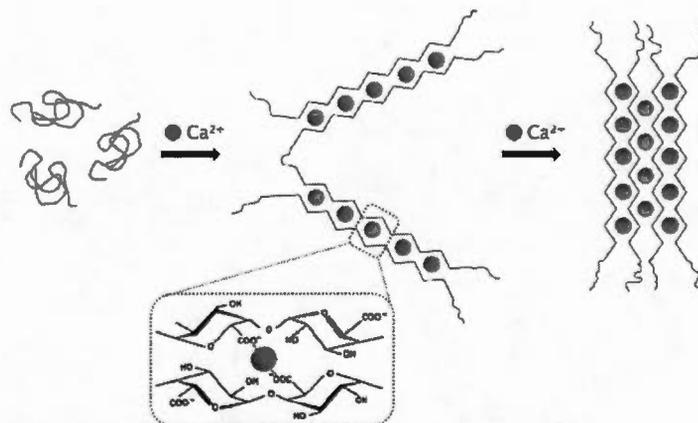
**Figure 3.5** Interactions entre unités G

Les blocs MG sont caractérisés par une alternance entre des liaisons axiale-équatoriale et des liaisons équatoriale-axiale. De telles variations dans la tacticité de la chaîne sont responsables d'une plus grande flexibilité des blocs MG comparée aux autres blocs.

### 3.3 La formation de gel : la gélification ionotropique

À la différence des autres polysaccharides gélifiants, la principale caractéristique de l'alginate est sa gélification avec des cations bivalents pour former des matrices à libération contrôlée de médicaments. La gélification ionotropique permet aussi l'immobilisation des agents actifs par inclusion basée sur la capacité des polyélectrolytes de former un gel insoluble en présence de cations multivalents. Le gel obtenu peut être compact ou sous forme de billes ou microsphères. Les billes d'hydrogel sont préparées en distribuant sous agitation des gouttes de suspension polymérique, contenant l'agent bioactif, dans une solution de cations bivalents comme  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  ou  $\text{Ba}^{2+}$ . Les cations diffusent dans la suspension génératrice de billes et sous agitation forment des microsphères. Généralement, les billes d'alginate sont préparées en introduisant une solution d'alginate dans une solution de cations bivalents (généralement  $\text{Ca}^{2+}$ ) sous agitation. Les cations monovalents et l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  n'entraînent pas la formation d'un gel, alors que les ions  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  produisent des microsphères plus fortes et plus élastiques que le  $\text{Ca}^{2+}$  (Sutherland *et al.*, 1991; Clark *et al.*, 1987; Ouwerx *et al.*, 1998). Cependant, ces cations mentionnés ne sont pas acceptables pour l'utilisation alimentaire ou pharmaceutique. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est le seul acceptable et donc il est le cation le plus souvent utilisé, grâce à sa non toxicité et à sa tendance à préserver la viabilité des cellules et autres microorganismes (Bashan *et al.*, 2002; Smidsrød *et al.*, 1990) inclus dans l'alginate. En détail, deux blocs G de deux chaînes de polymères adjacentes peuvent être réticulés par un cation bivalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ), par une interaction électrostatique entre les deux groupes carboxyliques ( $\text{COO}^-$ ) du polysaccharide. Cette complexation non covalente donne lieu à la formation d'un réseau à trois dimensions, et donc d'un hydrogel physique. Lorsque deux brins de polymère sont face à face, la conformation des blocs G forment des cavités dans lesquelles viennent se loger les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette dimérisation des blocs G est communément appelée structure type "boite d'oeufs". Un schéma représentatif de la gélification des chaînes d'alginate est représenté dans la figure 3.6.

La rigidité du gel obtenu dépend du ratio entre les blocs G et les blocs M contenus dans le polymère (ratio G/M). De façon générale, les alginates composés d'un faible ratio G/M forment des gels plus mous et élastiques, alors que les alginates avec ratio G/M élevé donnent plutôt des gels durs et cassants (Draget *et al.*, 1994).



**Figure 3.6 Gélification de l'alginate par des ions calcium, selon le modèle "boîte d'oeufs".** Les blocs G de deux chaînes sont d'abord dimérisés par une liaison électrostatique avec un cation  $\text{Ca}^{2+}$ , puis gélifiés afin de former un gel dur (d'après Gombotz et Wee, 2012).

Les billes dont le diamètre est d'environ 1,0 mm peuvent être obtenues à petite échelle à l'aide de seringues munies d'aiguilles ou d'embouts de pipettes. L'agent actif est dispersé dans la suspension d'alginate afin d'être immobilisé par la méthode d'inclusion décrite précédemment. La taille des billes obtenues est dépendante du diamètre des aiguilles utilisées, de la vitesse d'agitation ainsi que de la viscosité de la solution d'alginate. Plus la viscosité est grande, plus larges seront les billes. Ouwerx et collaborateurs (1998) ont montré qu'afin d'obtenir des billes sphériques, la concentration de l'alginate et la viscosité intrinsèque doivent être plus élevées qu'une valeur seuil, dépendamment du type de cation utilisé. En général, une concentration d'alginate supérieure à 5% devient trop visqueuse pour manipuler (Gombotz et Wee, 2012). La dégradation des microsphères d'alginate peut se produire par le retrait de

l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  en utilisant des agents complexants comme le citrate, le phosphate ou l'EDTA (Éthylène Diamine Tétra Acétate). Après l'incubation, le gel devient instable et l'agent actif immobilisé dans des microsphères est libéré dans le milieu. Les gels d'alginate se dissolvent complètement dans une solution de citrate de sodium 0,1 M à pH 7,8 tandis qu'ils créent un précipité dans du tampon phosphate de 0,1 M, car l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  se dissocie du polymère pour former un précipité de phosphate de calcium qui pourrait entraîner l'alginate et l'agent bioactif (Gombotz et Wee, 2012).

## CHAPITRE IV

### PRÉSENTATION DU PROJET

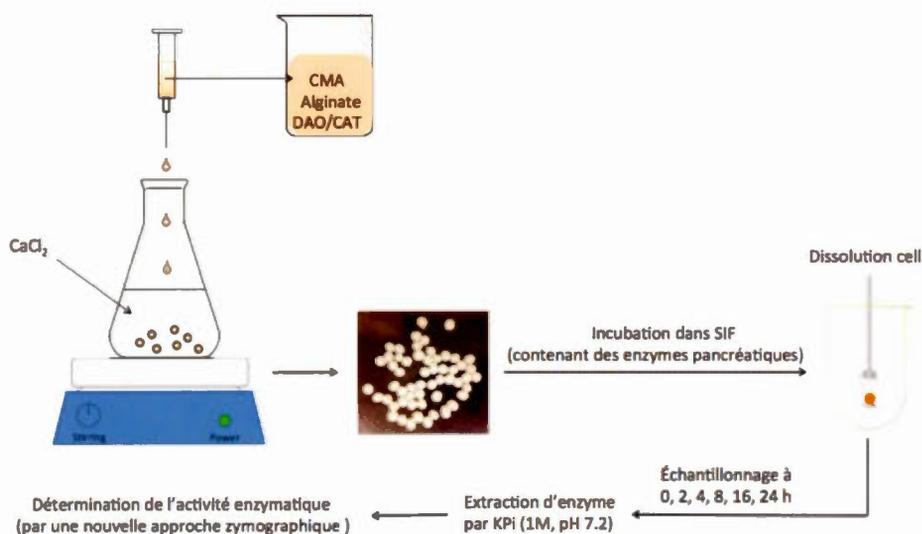
Plusieurs études ont été consacrées aux applications thérapeutiques des agents bioactifs. La diamine oxydase (DAO) végétale, aussi connue sous le nom d'histaminase, car elle dégrade l'histamine, est l'un de ces agents qui a été étudié depuis des années au Laboratoire d'enzymologie et des polymères biocompatibles du Professeur Mateescu. Administrable par voie orale, sous forme de comprimés à base de CMA:Chitosane (Calinescu *et al.*, 2012 ; Assaad et Mateescu, 2012) ou de microbilles à base de CMA/alginat (Blemur *et al.*, 2015), la DAO est un agent de choix pour le traitement de différentes dysfonctions intestinales ayant l'histamine à l'origine.

La DAO, par sa fonction catalytique, diminue les quantités d'histamine (allergène et proinflammatoire) au niveau intestinal. Cependant, la DAO peut générer certains effets toxiques dus au peroxyde d'hydrogène (produit d'oxydation de l'histamine). Pour neutraliser ces effets nocifs, la catalase, qui dégrade le peroxyde d'hydrogène, a été proposée comme ajout dans la formulation de DAO (Calinescu *et al.*, 2012).

Dans cette étude, nous avons établi un lien entre les études de Calinescu *et al.* (2012) sur l'association de la catalase à la DAO sous forme de comprimés à base de CMA/Chitosane et les études de Blemur *et al.* (2015) sur la DAO sous forme des microbilles à base de CMA/alginat. Ainsi, dans ce projet la DAO avec la catalase ont été immobilisées dans des microbilles à base de CMA/alginat (Figure 4.1) pour protéger ces enzymes et assurer leur stabilité face à l'action des enzymes

pancréatiques en conditions simulant le milieu intestinal (SIF, pH 7,2) contenant la pancréatine.

L'inclusion de la DAO et de la catalase dans des microsphères de CMA/Alginate a été réalisée à l'échelle de laboratoire et le schéma est présenté à la figure 4.1.



**Figure 4.1** Procédure d'immobilisation de la DAO dans des microsphères par gélification ionotrope et d'échantillonnage durant l'incubation dans SIF pour déterminer l'activité enzymatique de la DAO.

Cependant, la détermination de l'activité enzymatique de la DAO en présence de la catalase dans la formulation bi-enzymatique par les deux méthodes courantes avec la peroxydase (Rea *et al.*, 2004 ; Calinescu *et al.*, 2012; Blemur *et al.*, 2015) ou avec la L-glutamate déshydrogénase (GDH) (Lorenz *et al.*, 1968; Calinescu *et al.*, 2012) n'est pas possible pour les raisons suivantes:

i) Dans la méthode de dosage par la peroxydase, le dosage enzymatique de la DAO due à la décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la catalase associée ne peut pas être appliqué.

ii) Dans la méthode de dosage par l'enzyme L-glutamate déshydrogénase les composés présents dans l'échantillon peuvent générer des erreurs dans la détermination de l'ammoniac : par exemple les polymères comme CMA et alginate présentent des groupes carboxyles qui peuvent intervenir dans cette réaction. Également en raison de la présence de catalase dans la formulation, autres méthodes courantes de mesure telles que les méthodes par fluorimétrie ou par oxymétrie ne sont pas applicables dans cette étude.

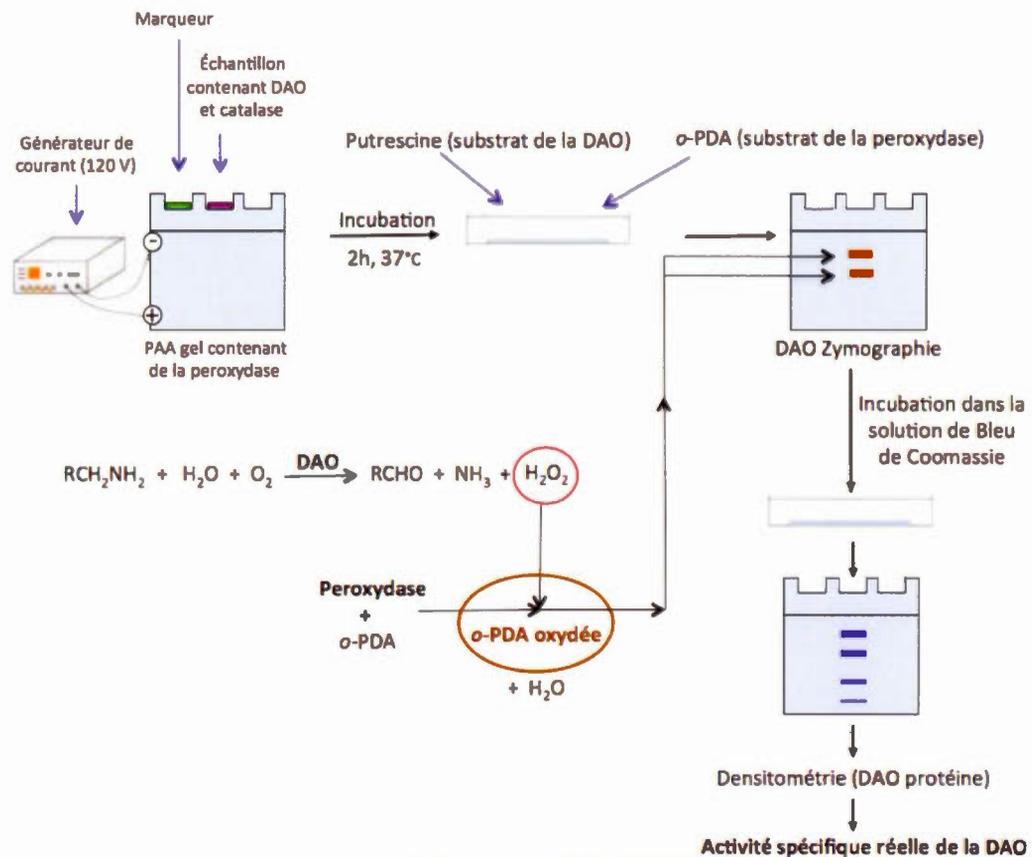
Un objectif principal a été d'élaborer une nouvelle approche zymographique pour permettre d'évaluer l'activité enzymatique des oxydases (dont la DAO) en présence des enzymes interférentes (dont la catalase). L'approche méthodologique pour réaliser l'objectif principal consiste en une zymographie modifiée, basée sur une réaction couplée à la peroxydase immobilisée dans les gels de polyacrylamide (SDS-PAGE). Dans cette nouvelle méthode l'activité oxydasique de la DAO (même dans l'échantillon contenant la catalase) peut être visualisée (après la séparation électrophorétique) par la réaction couplée à la peroxydase en présence de putrescine comme substrat de la DAO et d'ortho- phénylènediamine (*o*-PDA) comme substrat chromogène de la peroxydase (Figure 4.2). D'autres aspects d'intérêt de la méthode consistent non seulement à déterminer l'activité enzymatique, mais aussi à suivre l'intégrité de l'enzyme DAO ainsi qu'à mesurer la concentration de protéines après coloration du même gel par le bleu de Coomassie.

Un autre objectif du projet a été de réaliser des formulations des billes à base de carboxyméthyl amidon et d'alginate pour protéger la diamine oxydase et la catalase (ajoutée à la DAO pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène) face aux protéases pancréatiques durant le transit intestinal. Cet objectif peut impliquer plusieurs étapes :

- Caractériser des microbilles au niveau structurel par spectroscopie en infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

- Évaluer la stabilité de la DAO immobilisée dans les microbilles dans le milieu intestinal simulé (pH 7.2) en présence des enzymes pancréatiques pendant 24 h.

Zymographie modifiée (nouvelle approche) - présentation schématique :



**Figure 4.2** Le principe de la méthode zymographique modifiée.

Cette méthode est l'une des premières pour la détermination de l'activité de la diamine oxydase dans la formulation combinée ou en présence d'autres protéines bioactives, permettant l'évaluation de l'activité spécifique réelle (ASR).

À notre connaissance, le concept l'ASR est nouveau, permettant d'évaluer les caractéristiques de l'enzyme (ex. dénaturation ou inhibition) différemment de l'activité spécifique (AS) qui donne des indications sur les protéines contaminantes et sur la purification (enrichissement de l'enzyme par l'élimination d'autres protéines).

La détermination d'activité de la DAO en présence de catalase par la méthode zymographique présente plusieurs avantages:

- Utilisation simple, rapide et à faible coût en comparaison avec les autres méthodes fluorimétrique (Matsumoto *et al.*, 1982), oxymétrique (Befani *et al.*, 1989), ou radiométrique (Kusche *et al.*, 1973); ou ELISA pour DAO comme protéine. Par exemple, la détermination de l'activité par la méthode fluorimétrique a besoin de l'instrument (fluorimètre) et celle par la méthode radiométrique nécessite l'utilisation des substrats marqués radioactivement qui peuvent être toxiques.
- Possibilité de mettre en évidence l'activité de sous unités des oxydases et d'évaluer si elles sont conservées en présence du dodécylsulfate de sodium (dénaturant).
- Modalité d'évaluer la stabilité de la DAO formulée comme enzyme thérapeutique en mesurant l'activité enzymatique après incubation dans SIF en présence des enzymes pancréatiques (dont des protéases).
- Possibilité de coloration du gel après zymographie par bleu de Coomassie pour identifier l'enzyme en étude comme protéine en présence d'autres protéines en fonction de leur poids moléculaire (identifier de façon non équivoque les enzymes de l'échantillon sur le gel zymographie et ensuite sur le même gel par coloration avec bleu de Coomassie).

L'ensemble des travaux effectués durant le projet de maîtrise est présenté schématiquement à la figure 4.3.

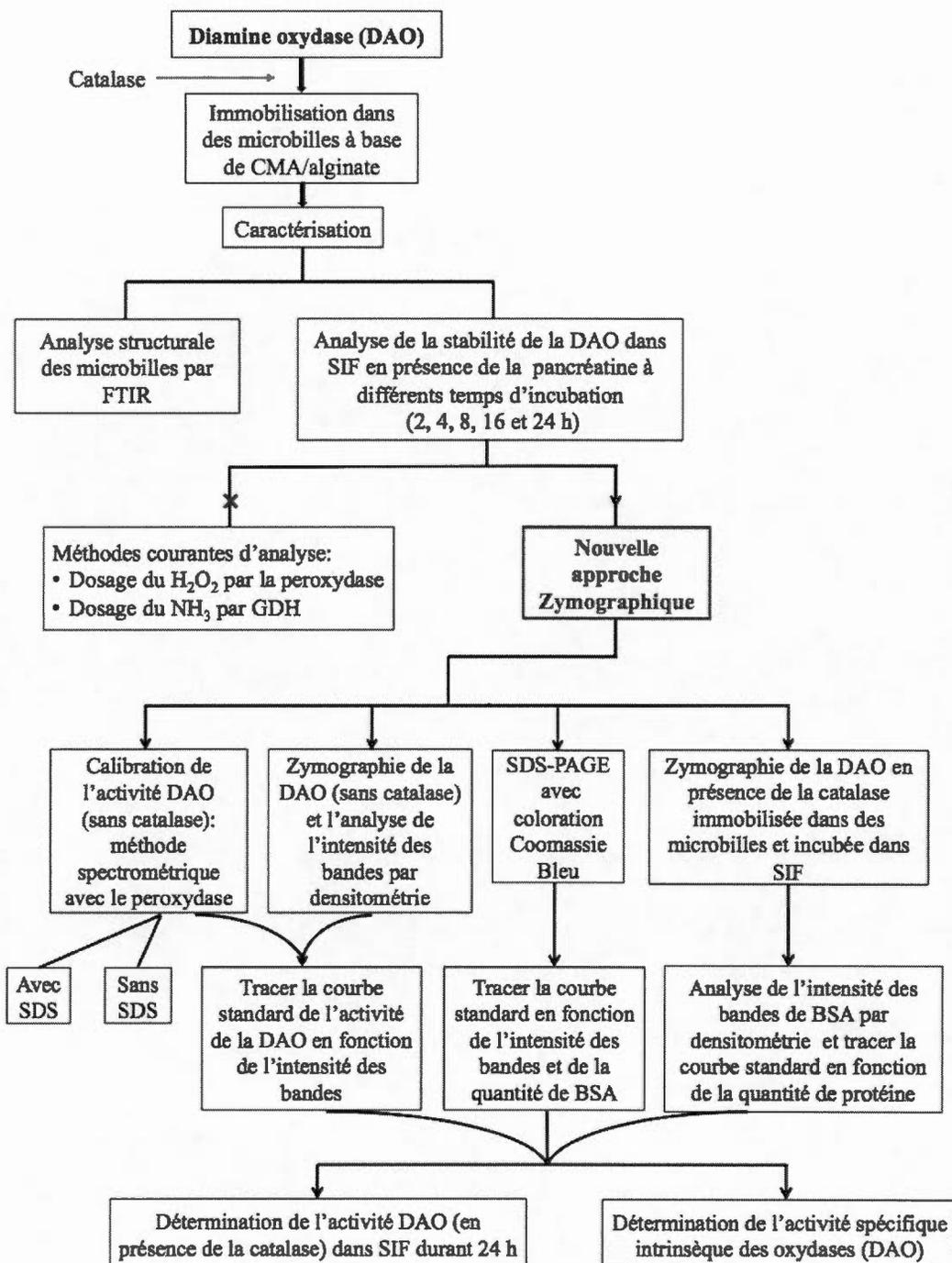
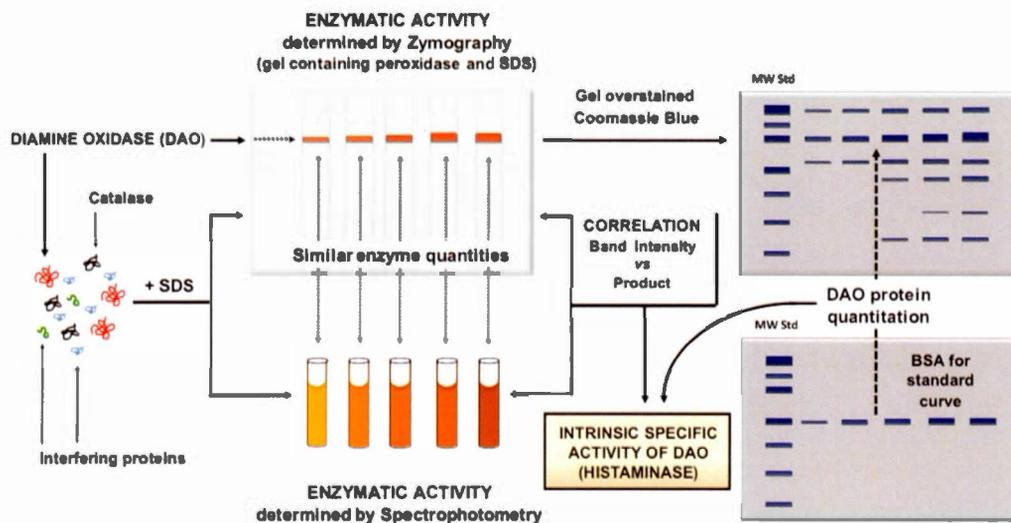


Figure 4.3 Présentation schématique des différents volets du projet de maîtrise



**Figure 4.4** Résumé graphique (soumis, en révision pour publication dans *Analytica Chimica Acta*). Détermination zymographique de l'activité spécifique intrinsèque de la diamine oxydase en présence des enzymes interférentes.

## CHAPITRE V

### UNE NOUVELLE APPROCHE ZYMOGRAPHIQUE POUR DÉTERMINER L'ACTIVITE SPECIFIQUE INTRINSÈQUE DES OXYDASES EN PRÉSENCE DES ENZYMES INTERFERENTES: LE CAS DE LA DIAMINE OXYDASE

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

**Samaneh Ahmadifar:** Contribution à la rédaction, préparation des protocoles, réalisation des expériences, traitement des résultats et recherche bibliographique

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

**Lucia Marcocci:** Contribution à la rédaction et purification de la matière première (la diamine oxydase)

**Paola Pietrangeli:** Contribution à la rédaction et purification de la matière première (la diamine oxydase)

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

**Une nouvelle approche zymographique pour déterminer l'activité spécifique intrinsèque des oxydases en présence des enzymes interférentes: le cas de la diamine oxydase (#)**

Samaneh Ahmadifar\*, Tien Canh Le\*, Lucia Marcocci †, Paola Pietrangeli†, Mircea Alexandru Mateescu\* ‡

\* Department of Chemistry & Centre BioMed, Université du Québec à Montreal, CP 8888, Branch A, Montreal (Québec) H3C 3P8, Canada

† Department of Biochemical Sciences, "A. Rossi-Fanelli", University of Rome "La Sapienza", P.le A. Moro 5, 00185 Rome, Italy

Une nouvelle approche zymographique est proposée permettant la détermination de l'activité spécifique intrinsèque (ASI) de la diamine oxydase (DAO) en présence des enzymes interférentes comme la catalase (qui interfère avec les dosages courants basés sur la détection du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou des protéases intestinales dégradant la DAO. Les gels SDS-PAGE obtenus par co-polymérisations de l'acrylamide et du bis-acrylamide, en présence de la peroxydase de raifort, qui est ainsi immobilisée permettent i) la séparation électrophorétique de la DAO des protéines contaminantes et ii) la localisation des bandes de la DAO comme enzyme. Pour révéler la DAO, après la migration électrophorétique, le gel de PAA obtenu doit être incubé dans la solution de développement contenant un substrat de DAO (putrescine) et un substrat de la peroxydase (*o*-phénylènediamine), ce qui donne des bandes colorées en présence du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré par la DAO. Pour convertir l'intensité des bandes de DAO en unités enzymatiques, une courbe d'étalonnage a été établie en représentant l'intensité densitométrique des bandes obtenues avec des quantités connues de DAO sur le gel de PAA en fonction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré et déterminé en solution par spectrophotométrie, par les mêmes quantités de DAO utilisée en zymographie. Une nouveauté est que le même gel électrophorétique, après zymographie, peut être coloré par le bleu de Coomassie pour la quantification des concentrations protéiques correspondantes aux bandes zymographiques via une courbe de calibration des intensités des spots sur le gel SDS-PAGE en fonction des concentrations d'albumine sérique bovine appliquées. Les valeurs des activités enzymatiques (unités enzymatiques) et les concentrations des protéines correspondantes permettent de calculer l'activité spécifique intrinsèque (ASI) de la DAO directement à partir des intensités des bandes. Le procédé peut être appliqué pour les dosages d'autres oxydases (*i.e.* glucose oxydase, GOD) ou pour évaluer la stabilité de la DAO dans des microsphères d'alginate/CMA (environ 85%) après une incubation de 24 heures dans SIF avec des protéases pancréatiques.

---

‡Corresponding author

Mircea Alexandru Mateescu

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

Phone: --1 (514) 987 4319

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

# Ce manuscrit a été soumis et il est en révision pour publication dans Anal. Chim. Acta.

**A new zymographic approach to determine the intrinsic enzyme specific activity of oxidases in the presence of interfering enzymes: the case of diamine oxidase**

Samaneh Ahmadifar<sup>1</sup>, Tien Canh Le<sup>1</sup>, Lucia Marcocci<sup>2</sup>, Paola Pietrangeli<sup>2</sup>,  
Mircea Alexandru Mateescu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry & Centre BioMed, Université du Québec à Montreal, CP 8888, Branch A, Montreal (Québec) H3C 3P8, Canada

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

---

\* Corresponding author

Mircea Alexandru Mateescu

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

Phone: --1 (514) 987 4319

Fax: --1 (514) 987 4054

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

## ABSTRACT

A novel zymographic approach allowing the determination of the intrinsic specific activity of diamine oxidase (DAO) in the presence of interfering enzymes as catalase (which disturbs current dosages based on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection) or of degrading proteases is described. The SDS-PAGE gels, obtained by co-polymerization of acrylamide and bis-acrylamide in the presence of horseradish peroxidase (HRP) which is thus immobilized, allow the electrophoretical separation of DAO from contaminating proteins. Then, to reveal DAO, the resulting PAA-gel should be incubated in the developing solution containing a DAO substrate (putrescine) and a HRP substrate (*o*-phenylenediamine) which gives colored bands in the presence of DAO-generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To convert the intensity of DAO spots to enzyme units, a calibration curve was established by correlating the densitometric intensity of bands obtained with known amounts of DAO on the PAA-gel and the spectrophotometrically determined H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated in solution, by the same amounts of DAO. The novelty is that the same electrophoretic gel, after zymography, can be stained by Coomassie blue for quantitation of protein corresponding to the zymographic bands via a calibration curve with bovine serum albumin. With the obtained enzyme units and protein concentration it is possible to calculate the intrinsic specific activity of DAO directly from the intensities of bands. The method can be applied for the assays of other oxidases (*i.e.* glucose oxidase, GOD) or to evaluate the stability of DAO entrapped in alginate/CM-starch microspheres (found as about 85 %) after incubation up to 24 h in simulated intestinal fluid containing proteolytic pancreatic enzymes.

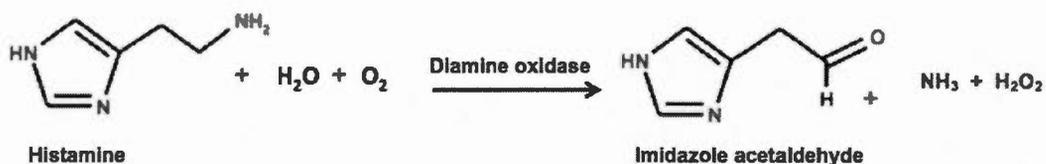
**Keywords:** diamine oxidase (DAO), catalase, zymography, intrinsic specific activity (ISA), histamine, alginate/carboxymethyl starch microspheres.

**Abbreviations:** DAO, diamine oxidase; GOD, glucose oxidase; HRP, horseradish peroxidase; ISA intrinsic specific activity; *o*-PDA, ortho-phenylenediamine; TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine; DTT, D,L-Dithiothreitol; CMS, carboxymethyl starch; SIF, simulated intestinal fluid; FTIR, Fourier-transform Infra-Red; SDS, sodium dodecyl sulphate; PAA, polyacrylamide gel; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate; PBS, Phosphate-buffered saline

## 1. INTRODUCTION

There is a large interest in clinical and food analysis to detect analytes as glucose, lactose, ethanol, aminoacids, biogenic amines that are currently determined with the corresponding enzymes (glucose oxidase, lactate oxidase, alcohol oxidase, aminoacid oxidases, diamine oxidase) via oxygen consumption or hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) release. However, often the samples may contain catalase which drastically interferes by  $H_2O_2$  consuming and  $O_2$  releasing. Furthermore, there are also oxidases, such as diamine oxidase (DAO), used as therapeutic enzymes. The DAO, also known as histaminase (*EC 1.4.3.22*), has been proposed (Calinescu *et al.*, 2012; Mondovì *et al.*, 2013) to treat certain gastrointestinal dysfunctions caused by an elevated level of histamine, an important immunomodulator, signalling and pro-inflammatory factor. Subjects with intestinal DAO deficiency show symptoms related to histamine intolerance such as gastrointestinal discomfort (Schmidt *et al.*, 1990; Mennigen *et al.*, 1990), migraine (Krabbe and Olesen, 1980; Gallai and Sarchielli, 2000), irritation of nasal mucosa and other allergy forms after consumption of certain histamine containing foods (Raithel *et al.*, 1999).

The DAO is a copper-containing amine oxidase present in microorganisms (Cooper *et al.*, 1992), plants (McGuirl *et al.*, 1994; Pietrangeli *et al.*, 2007) and animals (Mondovì *et al.*, 1967). The enzyme catalyses the oxidative deamination of primary biogenic amines such as putrescine, cadaverine, spermine and histamine (Figure 5.1) with the release of the corresponding aldehydes, hydrogen peroxide and ammonia (Mondovì and Finazzi-Agrò, 1982). Due to its ability to degrade Histamine, DAO has been proposed as bioactive agent for oral administration to treat food histaminosis, allergies and histamine-related enteric dysfunctions (Mondovì *et al.*, 2013; Blemur *et al.*, 2015).



**Figure 5.1** Oxidative deamination of histamine catalyzed by diamine oxidase.

The hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by-product of DAO is toxic and can generate oxidative damages to cell structures (membranes, proteins, DNA, etc.). Consequently, the association of DAO with an antioxidant such as catalase enzyme (*EC 1.11.1.6*) able to decompose  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$ , appeared worthwhile. However, the enzymes, when given orally, are sensitive to proteolytic degradation and can be inactivated prior to reach the target site. For this reason, they should be formulated with excipients able to protect them against the proteolytic activities of the intestinal content (Calinescu *et al.*, 2012; Blemur *et al.*, 2015).

The regulatory rules request a deep characterization of the active principles formulated for oral administration. The current methods to determine the DAO activity are based mainly on the dosage of  $\text{H}_2\text{O}_2$  reaction product which, in a coupled peroxidase reaction, will oxidise a chromogenic or a fluorescent substrate to yield products measurable by spectrometric (Calinescu *et al.*, 2010) or fluorimetric methods (Matsumoto *et al.*, 1982). However, these methods cannot be used for DAO combined with catalase because this enzyme will decompose the generated  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The oxymetric DAO assays (Befani *et al.*, 1989) are not appropriate either in the presence of Catalase, which will add  $\text{O}_2$  to the dosage. As an extension of a previous work (Calinescu *et al.*, 2010; Mateescu *et al.*, 2012), this report describes a zymographic approach to determine the intrinsic specific activity (ISA) of DAO through the assay of the released  $\text{H}_2\text{O}_2$ , even in the presence of catalase or of proteolytic enzymes such as those present in intestinal fluids. An important aspect is that neither the article

(Calinescu *et al.*, 2010) nor the book-chapter (Mateescu *et al.*, 2012) described the quantitation of an oxidase (producing  $H_2O_2$ ) in presence of highly interfering catalase (consuming  $H_2O_2$ ).

Furthermore, the zymographic approach here described may also be applied to study the stability of DAO entrapped with catalase in alginate/CMS microspheres expected to protect against proteolytic enzymes in simulated intestinal fluid (SIF).

More precisely, the proposed zymographic procedure is based on a coupled reaction with entrapped peroxidase in the SDS polyacrylamide (PAA) gel used to separate the DAO from contaminating proteins (catalase, pancreatic intestinal enzymes). After electrophoretic separation, the DAO was revealed by incubating the PAA-gel in the developing solution containing putrescine (DAO substrate) and *o*-phenylenediamine (peroxidase chromogenic substrate) to give coloured bands on the gels in the presence of the *in situ* oxidase-generated  $H_2O_2$ . As a novelty, the same electrophoretic gel, after zymography, can be then stained by Coomassie Blue for quantitation of protein concentrations corresponding to the zymographic bands. The intensity of bands stained by Coomassie brilliant blue can be converted in concentration units ( $mg\ protein\ mL^{-1}$ ) via a calibration curve relating Coomassie densitometric intensities to the protein concentration. With these two values: enzyme units and protein concentration, it is possible to evaluate the current intrinsic specific activity (ISA) of DAO in the presence of interfering catalase. To the best of our knowledge, the determination of ISA by zymography seems another novelty. The ISA is a parameter differing to the current specific activity (SA) obtained by reporting the enzyme activity to the amount of proteins in the sample and also differing to current concept of intrinsic specific activity viewed as the specific activity of purified enzyme.

## Materials and methods

### Chemicals and materials

Diamine oxidase extracted from *Lathyrus sativus* (18 U/mg powder) was prepared as reported by Blemur *et al* [13], using a homogenization medium containing 200 mM NaCl in 50 mM phosphate buffer. Catalase (bovine liver, 4540 U/mg protein), Horseradish peroxidase (HRP type I, 52 U/mg solid), Glucose oxidase (*Aspergillus niger*, 26.82 U/mg solid), Pancreatin (from porcine pancreas, 4X), bovine serum albumin,  $\beta$ -D-glucose, putrescine (1,4-Diaminobutane dihydrochloride), ortho-phenylenediamine (o-PDA) dihydrochloride, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and Bradford reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide and protein molecular weight standards (Broad Range) were from Bio-Rad Laboratory (Richmond, VA, USA). DL-Dithiothreitol (DTT) was from Bio Basic Canada Inc. (Markham, Ontario, Canada) and  $\beta$ -Mercaptoethanol from BioShop (Burlington, Ontario, Canada). Other chemicals were reagent grade and used without further purification.

### Spectrophotometric determination of DAO activity

To assay DAO activity in solution, a mixture containing 640  $\mu$ L of potassium phosphate buffer (PBS, 50 mM, pH 7.2), 10  $\mu$ L of horse radish peroxidase (HRP, solution 5.2 U mL<sup>-1</sup>), 50  $\mu$ L of ortho-phenylenediamine (o-PDA, 30 mM in 50 mM PBS, pH 7.2) as peroxidase substrate and 200  $\mu$ L of putrescine (30 mM in PBS) was pre-incubated for 5 min at 37 °C. The assay was started by addition of 100  $\mu$ L DAO solutions at various quantities (0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0; 10.0 and 15.0  $\mu$ g) in PBS. After 5 min of incubation, the reaction was stopped by adding 100  $\mu$ L of 4 M HCl and the absorbance was read at 484 nm using Ocean Optic© fiber optic spectrometer (Dunedin, FL, USA). Since the putrescine consumption and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation are

mole to mole, a calibration curve of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was established for the colorimetric dosage with peroxidase by directly adding 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (instead DAO) at concentrations ranging from 0 to 0.8 mM in PBS to the assay mixture of 640 mL PB, 10 mL peroxidase (5.2 U  $\text{mL}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{L}$  of *o*-PDA (30 mM in PBS), 200 mL putrescine (30 mM) and operating as described above.

One enzymatic unit (U) of DAO is defined as the amount of enzyme catalysing the oxidation of 1.0  $\mu\text{mole}$  of putrescine per minute at pH 7.4, at 37 °C.

*Determination of DAO activity in different denaturing conditions by spectrophotometry*

The influence of different denaturing conditions on the DAO activity was followed as described above (section 2.2), with the mention that DAO samples were treated, just prior to the assay, with same denaturing agents as used for zymography. The enzyme samples contained (final concentration): i) no denaturing agents (control); ii) SDS (2 %); iii) SDS (2 %) +  $\beta$ -Mercaptoethanol (715 mM); iv) SDS (2 %) +  $\beta$ -Mercaptoethanol (715 mM) + heating for 5 min at 95 °C; and v) SDS (2 %) + 1,4-Dithiothreitol (DTT, 360 mM). The DAO retained activity was determined after different incubation times (0-15 min) at 37 °C.

The Bradford reagent was used for the quantitation of proteins in various sample solutions (Bradford, 1976).

*Optimization of the quantity of catalase introduced in the bi-enzymatic formulation*

The appropriate DAO/Catalase ratio such as to obtain a minimal amount of toxic  $\text{H}_2\text{O}_2$  remaining after the oxidation of putrescine by DAO was determined with this described method. Practically, 100 mL of enzyme solutions were added to the assay mixture above noticed such as to have a constant final DAO concentration (2 mg/mL)

and various final catalase concentrations (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A DAO/Catalase ratio 2:1 was chosen among those giving the lowest remaining  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### **Zymography of oxidases**

#### *SDS-PAA gel with entrapped peroxidase for zymography*

Separating polyacrylamide (PAA) gels (Laemmli, 1970) containing SDS and entrapped HRP were prepared as previously reported (Calinescu *et al.* 2012). Practically, to prepare the SDS-PAA gel (10 %), the composition (approximately 5 mL) was: 1 mL of HRP (1 mg mL<sup>-1</sup>) added to 1.7 mL of 30 % acrylamide/bis-acrylamide (29:1), 1.3 mL of Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 50  $\mu\text{L}$  of 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 mL of SDS (10 %), 0.68 mL of water, 1 mL of TEMED and 10 mL of ammonium persulfate (10 %).

#### *Electrophoresis*

A volume of 20  $\mu\text{L}$  of each sample (up to 5 mg/mL and 10  $\mu\text{L}$  of molecular weight standards (Broad Range) 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) contains 0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, and 0.1 % SDS. Samples of bovine serum albumin (BSA) at concentrations up to 1 mg/ml were also run for calibration of the spots in PAA gels in order to determine the protein content of the enzyme samples.

In order to better understand the role of various agents in the zymographic runs, samples of DAO and GOD prior to be loaded on the native PAGE (PAA gels without SDS) were treated (1:1, v/v) with SDS loading buffers as follows:

- i) SDS loading buffer: 1.7 mL Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8), 2.0 mL SDS (10%), 1 mL glycerol and 5.3 mL distilled water to complete up to 10 mL.
- ii) SDS loading buffer plus  $\beta$ -Mercaptoethanol: 25  $\mu$ L of  $\beta$ -Mercaptoethanol (14.3 M) was added to 475  $\mu$ L of SDS loading buffer
- iii) SDS loading buffer plus  $\beta$ -Mercaptoethanol and heating: 25  $\mu$ L of  $\beta$ -Mercaptoethanol (14.3 M) was added to 475  $\mu$ L of SDS loading buffer. Samples were then heated for 5 min at 95 °C.
- iv) SDS loading buffer plus 1-4 Dithiothreitol: 25  $\mu$ L of 1,4-Dithiothreitol (1 M) was added to 475  $\mu$ L of SDS loading buffer.

*Detection of DAO or of glucose oxidase (GOD) activity by zymography on polyacrylamide gels*

After electrophoresis, each PAA gel was fixed for 5 min, under mild agitation, in methanol/water (50:50, v/v). The gel was then washed and incubated (5 min at 37 °C in dark under mild agitation) in developing solution containing putrescine 30 mM (in PBS 50 mM, pH 7.2) as a substrate for DAO and  $\beta$ -D-glucose 30 mM (in PBS 50 mM, pH 7.2) as a substrate for GOD and *o*-PDA 30 mM (in PBS 50 mM, pH 7.2) as a HRP chromogenic substrate.

Similar serial DAO preparations as those used for spectrophotometric determination of enzyme activities (described at section 2.2) were treated (1:1, v/v) with SDS loading buffer and loaded on SDS-PAA gel (10 %). After the separation runs, the gels were incubated in the developing solution and the intensities of the bands on the gels (that correspond to DAO enzyme activity) were determined by densitometric image analysis using the software ImageJ (Win64, version 1.47, National Institutes of Health, USA).

### *Conversion of zymography densitometric intensities into DAO enzyme units*

The densitometric intensities of bands were determined and correlated with the concentrations of hydrogen peroxide obtained by spectrophotometry with the same DAO quantities (without catalase), as described above. In this case, a curve of densitometric intensities (I) versus concentration of hydrogen peroxide was plotted and served as standard curve to determine the enzyme activity (U) and stability of unknown DAO.

### *Determination of protein concentration*

After recording image densitometric intensities, the same zymographic gel was extensively washed in water and then stained with Coomassie brilliant blue. The intensities of bands were measured by densitometric image analysis. A calibration curve obtained by running BSA solutions (0-10 mg/ml) under the same experimental conditions was used as standard for quantitation of protein content corresponding to each band.

The intrinsic specific activity of DAO in each electrophoretic band could then be calculated by dividing the enzyme units obtained by the staining of the zymographic gel with putrescine and *o*-PDA to the protein concentration determined by Coomassie staining.

### *Stability of DAO in simulated intestinal fluid, investigated by zymographic procedure*

As an example of application, the novel zymographic approach was used to investigate the stability of DAO extracted from microspheres of alginate/carboxymethyl starch, obtained by ionotropic gelation with  $\text{Ca}^{2+}$ , in conditions described by Blemur *et al.* (2015) and containing DAO/catalase (ratio 2:1). The microbeads were exposed for duration of up to 24 h in simulated intestinal fluid (SIF) containing pancreatine proteolytic enzymes, prepared according to United

States Pharmacopeia-National Formulary 31 (USP36-NF31). At the end of the incubation times, microbeads were recovered and thoroughly washed in distilled water. Finally, the microbeads were incubated in 2 mL of sodium phosphate buffer 1.0 M (pH 7.2) for 12 hrs in order to dissolve the alginate/CMS matrix and liberate the entrapped enzymes. The suspensions were then centrifuged (3000 g) and filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) to remove the remaining bead matrix fragments. The resulting filtrates were collected and stored at 4 °C for further characterization. The samples extracted from microbeads containing DAO/catalase were treated (1:1, v/v) with SDS loading buffer and loaded on SDS-PAA gel (10 %). After incubation of PAA gel in the developing solution, the densitometric intensities of bands were recorded and measured by densitometric image analysis in order to determine the DAO activity. Then, the same zymographic gel was extensively washed in water and then stained with Coomassie Blue for protein concentrations.

#### *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis of microbead formulation*

Alginate, CMS, enzymes (DAO, catalase) and microspheres (with and without enzymes) under powder form were analyzed by Fourier transform infrared (FTIR). Spectra were recorded (16 scans at a resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$ ) using a Thermo-Nicolet 6700 FTIR spectrometer (Madison, WI, USA) equipped with an Attenuated Total Reflectance (ATR) device.

### **Results and discussion**

The DAO oral formulations appear as a promising strategy for the treatment of food histaminosis (Calinescu *et al.*, 2012; Mondovì *et al.*, 2013) and other biogenic amines-related dysfunctions (Krabbe *et al.*, 1980; Schmidt *et al.*, 1990). A zymographic procedure was previously described to detect DAO activity (Calinescu *et al.*, 2010). The aim of the present report was to investigate the potentiality of zymography to determine the DAO intrinsic specific activity in the presence of

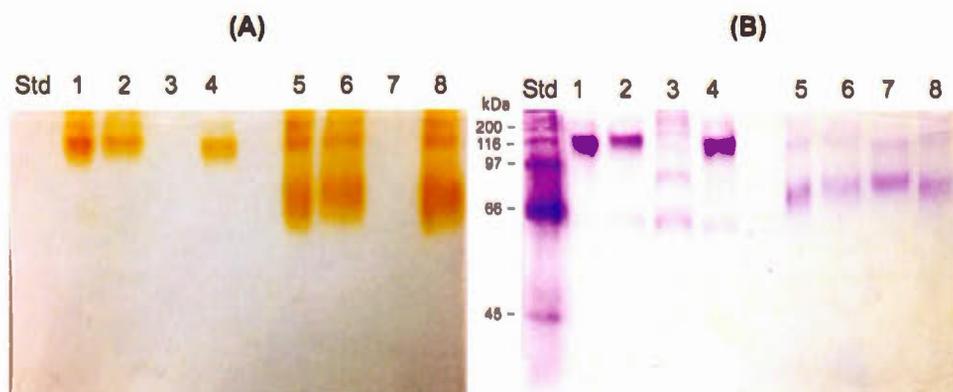
catalase and/or other interfering proteins. Also investigated was the optimal ratio DAO/catalase in formulation aimed to remove  $H_2O_2$  generated by DAO.

#### *Determination of DAO activity by zymography*

For processing or determining an enzyme an important aspect is to maintain intact its native structure and consequently, its biological activity. However, electrophoresis processing frequently consists to separate proteins under denaturing (SDS), reducing with  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) or even heating conditions. The role of SDS consists to linearize proteins and to impart them a negative charge, whereas  $\beta$ -ME cleaves intermolecular disulfide bonds of proteins generating individual subunits. By heating, the bioactive proteins in most cases are completely dissociated and inactivated. It was of interest to evaluate the effect of various treatments on the DAO activity by zymography. In order to understand the action of denaturing agents, a zymography was first performed in absence of SDS in the PAA (native gel). The DAO samples were treated with denaturant agents (SDS; SDS/ $\beta$ -ME; SDS/DTT and SDS/ $\beta$ -ME/heating) for zymography and separately, under similar conditions for assay in solution par spectrophotometric method. In addition, glucose oxidase (GOD) was also included in the zymographic study because it also generates  $H_2O_2$  as secondary product. Moreover, these oxidases are both homodimeric enzymes: DAO, a copper containing oxidase with TPQ cofactor and GOD with a flavin-adenine dinucleotide (FAD) cofactor per monomer.

After electrophoresis and incubation in the developing solutions, the intensities of brown bands on PAA gel indicated the active state of DAO. When the putrescine penetrates into the gel, the generation of hydrogen peroxide would take place solely where is located the DAO. The peroxidase embedded in the gel catalyses the oxidation of *o*-PDA with the hydrogen peroxide liberated by DAO that causes the browning of the DAO bands.

The exposure of DAO samples (Fig. 5.2A, lanes 1-4) to SDS (Fig. 5.2A, lane 1) or to SDS with  $\beta$ -ME at a final concentration of 350 mM (Fig. 5.2A, lane 2) as well as to SDS with DTT at a final concentration of 180 mM (Fig. 5.2A, lane 4) did not inhibit the enzyme. Differently, the heating of DAO samples at 95 °C in the presence of SDS with  $\beta$ -ME resulted in a complete disappearance of catalytic activity (Fig. 5.2A, lane 3). The zymographic method also allows the assay of activity of other oxidases such as glucose oxidase (GOD, Fig. 5.2A, lanes 5-8). Likewise, a certain stability to SDS, SDS/ $\beta$ -ME and SDS/DTT with two bands of GOD activity on the gel was detected, but with a complete loss of enzymatic activity when the enzyme was exposed to SDS/ $\beta$ -ME and heated at 95 °C (Fig. 5.2A, lane 7).

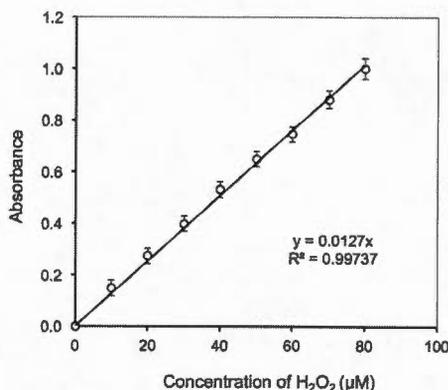


**Figure 5.2** Electrophoresis of diamine oxidase (DAO) and glucose oxidase (GOD) on non-denaturing polyacrylamide (8 %) gel with peroxidase entrapped. Zymography gel of DAO and GOD treated under different denaturing conditions (A); was overcoated with Coomassie brilliant blue (B). Lane 1: DAO treated with SDS; Lane 2: DAO treated with SDS/ $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME); Lane 3: DAO treated with SDS/ $\beta$ -ME/heating; Lane 4: DAO treated with SDS/DTT; Lane 5: GOD treated with SDS; Lane 6: GOD treated with SDS/ $\beta$ -ME; Lane 7: GOD treated with SDS/ $\beta$ -ME/heating; Lane-8: GOD treated with SDS/DTT.

After recording of zymography bands, the same gel was stained by Coomassie brilliant blue (Fig. 5.2B) to reveal the presence of proteins (lanes 1-4 for DAO and 5-8 for GOD). The zymography gel overcoated by Coomassie brilliant blue seems

useful to monitor the presence of contaminant proteins or to visualize the structural integrity of bioactive proteins face to denaturing conditions.

The activity of free DAO was also determined in solution by the spectrophotometric method under similar conditions with different denaturing treatments. To calculate the DAO activity, a standard curve was established as described by Calinescu *et al.* (2010). In fact, different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (product of DAO reaction and substrate for peroxidase) were prepared and added to the solution containing peroxidase and *o*-PDA dye (second substrate for peroxidase) which generated a colored oxidized product (quinonediimine) measurable at 484 nm. A linear dependency of absorbance obtained by peroxidase-catalysed *o*-PDA oxidation upon the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations in solution was found (Fig. 5.3,  $R^2 = 0.9973$ ).



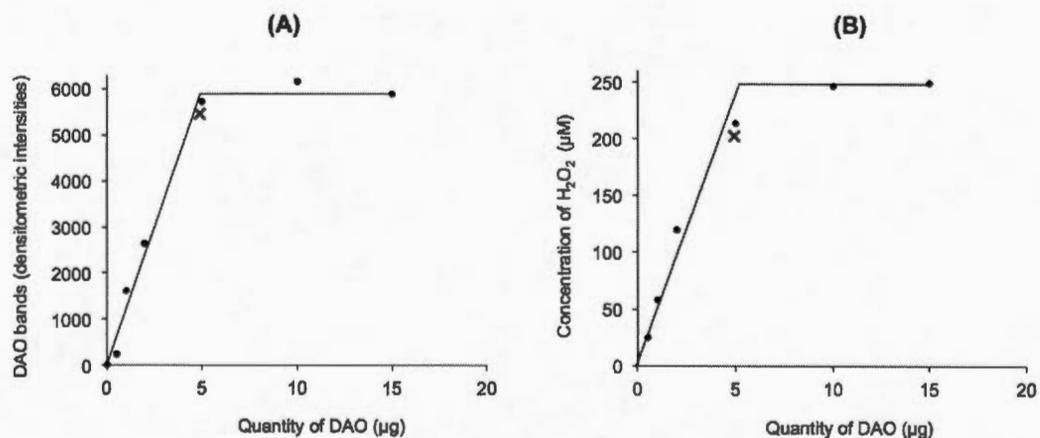
**Figure 5.3** Standard curve of hydrogen peroxide (after incubating of 0.1 mL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0-0.8  $\mu\text{M}$ ) in the reaction medium containing 640  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer (50 mM, pH 7.2), 10  $\mu\text{L}$  of peroxidase (0.1 mg/mL), 50  $\mu\text{L}$  of *o*-PDA (30 mM) and 200  $\mu\text{L}$  of putrescine (30 mM).

Surprisingly, the activity of the DAO treated with SDS at various incubation times (0-15 min) was comparable with that of native DAO. Differently, when treated with SDS/ $\beta$ -ME, a decrease of DAO activity approximately 10 times comparing with that of native DAO and no activity of DAO by heating were noticed (data not shown).

Zymography carried out on native PAA gel (without SDS) generated information on the denaturing agents, but the electrophoretic mobility of proteins was reduced. For this reason, further electrophoretic studies were carried out on SDS-PAGE gels which allow a higher resolution and better protein mobility.

*Zymography of DAO on SDS-PAA gel*

A linear dependency was obtained between the intensity of the zymographic bands and the quantities of DAO run on the 10 % SDS-PAA (Fig. 5.4A). This dependency in zymography was similar with that obtained from measurements of DAO activity by spectrophotometric method with a DAO quantity up to 5  $\mu\text{g}$  (Fig. 5.4B).



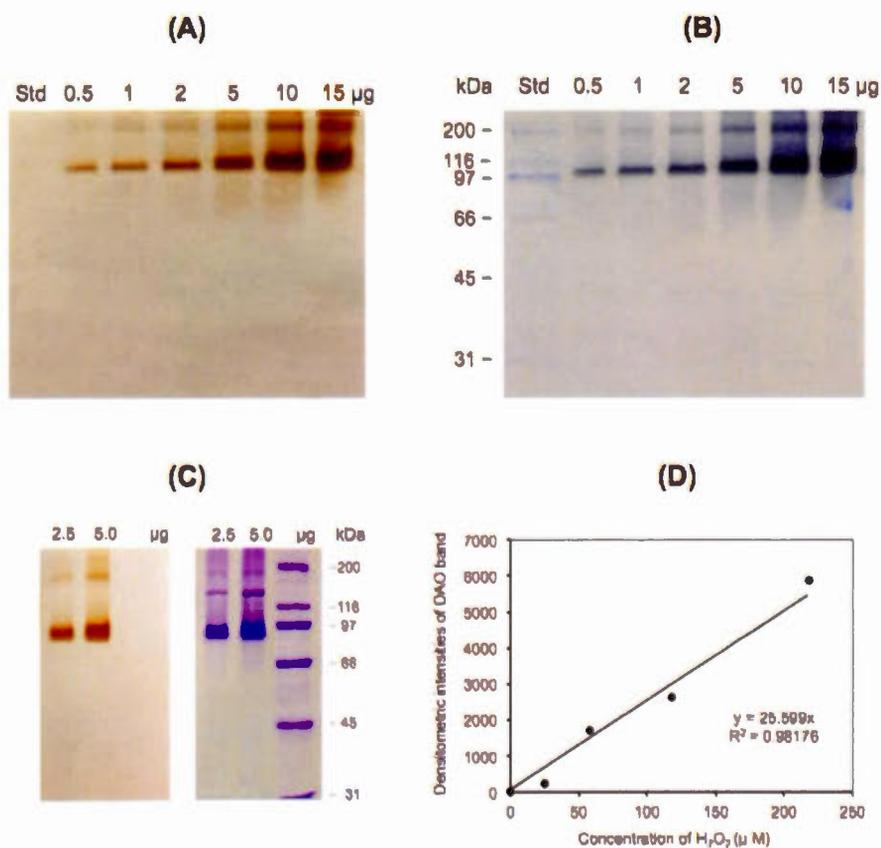
**Figure 5.4** Comparative dependency of intensity of DAO bands in zymography (A) and of concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in solution (B) in function of DAO quantities.

Since the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  generated from the oxidative reaction is stoichiometrically equivalent with the number of moles of putrescine being oxidized into  $\gamma$ -aminobutyraldehyde (product), the quantitation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  may allow to quantify DAO activity and to express it in DAO units.

Generally, zymography is a qualitative assay used to detect enzyme proteins on PAA gel. In order to render the zymography a quantitative method, a relation between the data obtained by spectrophotometry assay in solution and zymographic intensities of bands obtained by image analysis, was established. In this case, a good linearity of the calibration curve with a linear regression ( $R^2 = 0.9818$ ) was obtained (Fig. 5.5D).

The values of densitometric intensities obtained by image analysis of zymographic bands (Fig. 5.5A) with the increasing DAO amounts were represented a calibration curve versus the corresponding concentrations of  $H_2O_2$  (Fig. 5.5D) calculated from the DAO activity determination by spectrophotometry in solution with exactly the same DAO serial quantities run in zymography (Fig. 5.5A). Thus, the activity of a DAO sample run in zymography can be converted in DAO enzyme units by first determining the intensity of band and plotting over the  $H_2O_2$  concentration from the calibration curve (Fig. 5.5D, linear regression  $R^2=0.9818$ ). Then converting  $H_2O_2$  concentration corresponding to the obtained densitometric intensity in DAO enzyme units considering the incubation time in developing solution to reveal the bands of 5 min.

Although dependencies of zymographic intensities upon DAO amounts and evaluation of oxidase activity were satisfactory (Fig. 5.5A) on SDS-gels (10 %), the electrophoretic mobility of the samples was somewhat limited, making difficult the evaluation of molecular mass of protein samples. When more precision on molecular weight is requested, better results may be obtained with the SDS-PAGE (8 %) gel. For instance, DAO samples showed brown bands (Fig. 5.5C, 2.5  $\mu\text{g}$  and 5  $\mu\text{g}$ ) at 90 kDa which may correspond to monomeric subunits and at 180 kDa which may be remained dimer unaltered by SDS. The same gel stained by Coomassie brilliant blue showed the same bands ascribed to DAO and some additional spots (*i.e.* at about 130 kDa), suggesting that DAO preparation also contained some different proteins.

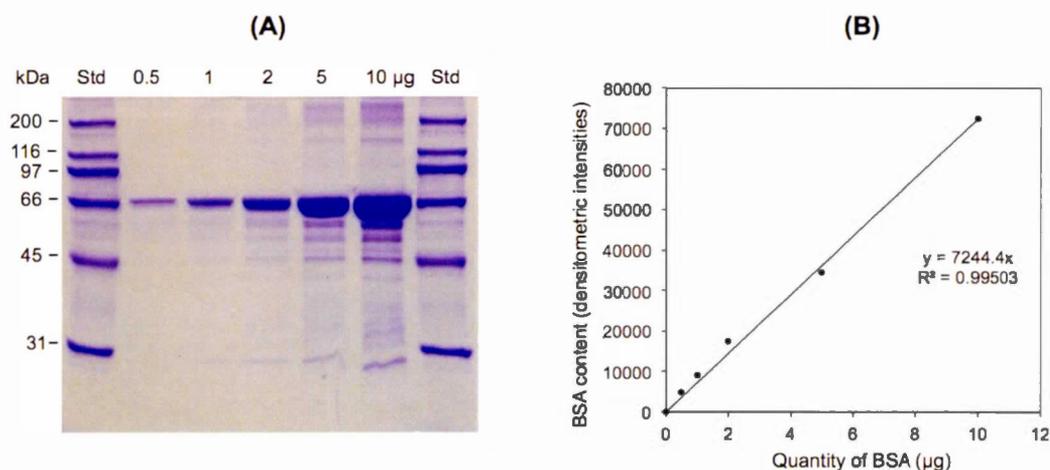


**Figure 5.5** Zymography (A) and Coomassie overstaining (B) on SDS-Polyacrylamide (10 %) gel and on SDS- Polyacrylamide (8 %) gel (C) with the standard curve (D) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations versus densitometric intensities of bands obtained by correlation between zymographic and spectrophotometric assay used to determine intrinsic DAO activity.

An interesting aspect of this zymographic method is that several oxidases can be determined at the same time and on the same gel (*i.e.* DAO and GOD) by incubating the gel in resolving solutions containing specific substrates for each oxidase.

It is also worth to note that no interferences from peroxidase entrapped in the PAA gels were found in either zymography or Coomassie staining.

The electrophoretic method also allows the determination of protein concentration in the samples by referring the intensity of the band (image analysis) to a standard curve obtained under the same experimental conditions, by running solutions of bovine serum albumin (BSA) at various concentrations (Fig. 5.6A, B). A linear correlation ( $y = 7244.4 x$ ,  $R^2 = 0.9950$ ) was observed between the intensity of the Coomassie stained bands and the quantities of loaded BSA.



**Figure 5.6** Electrophoretic pattern of BSA (0-10 µg) on SDS-PAA (10 %) gels stained with Coomassie brilliant Blue (A) and the calibration curve (B) of BSA quantities as function of densitometric intensities of BSA bands.

#### *Determination of DAO intrinsic specific activity*

This zymographic approach allows the determination of the real specific activity of a particular oxidase and it can lead to the concept of the «intrinsic specific activity» (ISA) irrespective of the degree of purity. The parameter «intrinsic specific activity» is known and it was used for the specific activity (Purich, 2010) of a purified enzyme (considered as pure when, even with more advanced purification steps, it was no more possible to increase the specific activity) indicating that no co-purifying

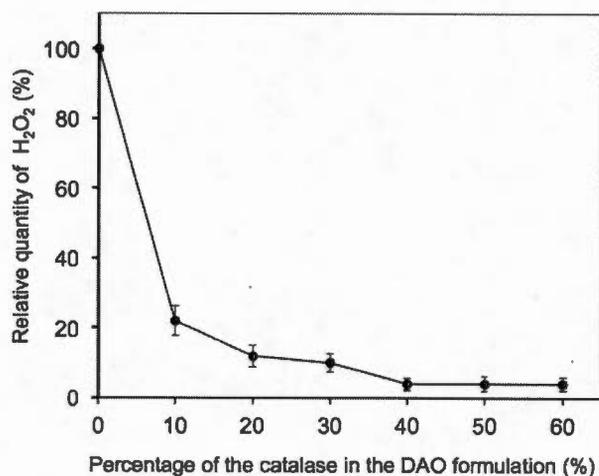
contaminants are present. For instance, the term «Intrinsic activity» was used for inulinase produced by fermentation and further purified until a pure enzyme was obtained and characterized for its enzyme activity by the colorimetric Dinitrosalicylic assay, molecular mass by SDS-PAGE electrophoresis and by micro-Kjeldahl method for the protein content to calculate the intrinsic inulinase activity (Silva-Santisteban *et al.*, 2006). Our approach allows in only one zymographic step to evaluate the current ISA of an oxidase irrespective of the interfering or contaminating proteins. To the best of our knowledge, the determination of the current «intrinsic specific activity» irrespective of the purification degree seems a new concept. In fact, the current specific activity of an enzyme A is obtained by dividing the enzyme activity to the total amount of proteins present in the sample (protein a + protein b + protein c + ... + protein n). With purification, when certain proteins are eliminated (*i.e.* protein b, protein c, protein n), the specific activity of enzyme A is increased (activity of enzyme A/protein a), because the denominator is lower. By the zymographic method here described, it is possible to determine quantitatively the specific activity on the same band stained as enzyme and subsequently stained as protein with Coomassie Blue (even in the presence of other interfering proteins with different mobilities which were separated from enzyme on the gel). This approach may be extended to other oxidases. In fact, the specific activity seems characteristic for the oxidase in study and it can be considered as «intrinsic specific activity». This gives the real specific activity of the enzyme A/protein a. This concept of intrinsic activity is of interest because the specific activity of the enzyme can depend also on the real status (*i.e.* activated or inhibited) of the enzyme (Purich, 2010) and not only in function of contaminating proteins in the samples.

At the same time, this new procedure allows to monitor the purity, the structural integrity and the stability of DAO enzyme in SIF (Simulated Intestinal Fluid) containing pancreatic enzymes.

*Application of the zymographic procedure for characterisation of microbeads containing DAO and catalase*

*- Optimization of the quantity of catalase introduced in the bi-enzymatic formulation*

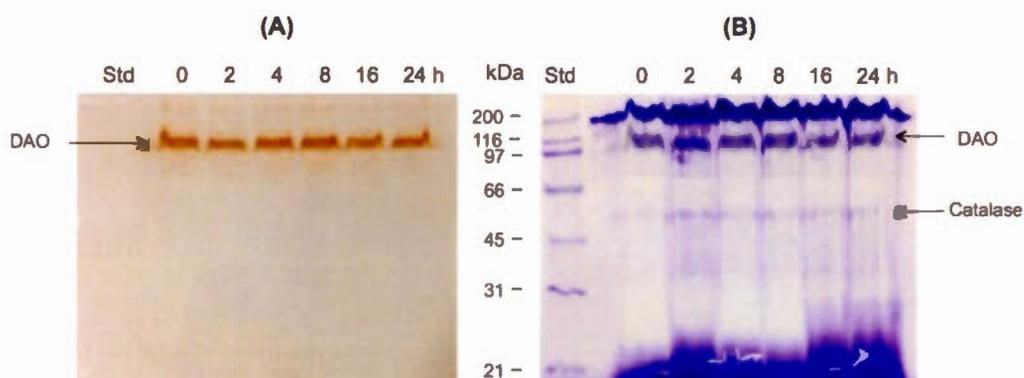
The association of catalase to DAO formulations is important in order to reduce the toxic effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  generated by DAO as product of the oxidative deamination of histamine or other biogenic amines. A decrease of about 90 % of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was found (Fig. 5.7) when the catalase content in the formulation was about of 30 % (corresponding to DAO/catalase ratio, 2:1 w/w). Since no decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was observed, even at higher concentrations of catalase, the ratio of DAO/catalase, 2:1, was retained for this study.



**Figure 5.7** Optimal percentage of catalase introduced in the DAO formulation.

The presence of catalase, which decomposes the generated  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$ , can interfere with the current spectrometric and fluorimetric assays for DAO activity based on the measurement of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as well as with the oxymetric assay.

In terms of analytical procedures, there is a need to separate catalase from DAO prior to determine DAO activity. In this case, the zymographic method seems one the best to characterize DAO activity in the presence of catalase because the two enzymes will run differently (Fig. 5.8B).



**Figure 5.8** Electrophoretic patterns of DAO extracted at various intervals with 1 M phosphate buffer from alginate/CMS microbeads incubated (0-24 h) in SIF (with pancreatin, pH 7.2). Zymographic gels (10 % PAA gel containing HRP) were developed first with putrescine and *o*-PDA for DAO activity (A) and then stained with Coomassie Blue for protein pattern (B).

The advantage of the present zymographic approach is that the DAO oxidase migrates differently to catalase. Thus, the  $H_2O_2$  released *in situ* by DAO is no more decomposed by catalase because of its different mobility (Fig 5b). Moreover, catalase cannot be visualized in zymographic gel (Fig. 5a) and thus the appeared bands can be clearly ascribed to DAO.

#### - The Study of DAO/catalase combination formulation in SIF

There is an interest to evaluate the activity of a bioactive agent (*i.e.* therapeutic enzyme) when administered orally for intestinal delivery. The rationale to investigate stability of enzymes in simulated intestinal fluids is the presence in the intestinal

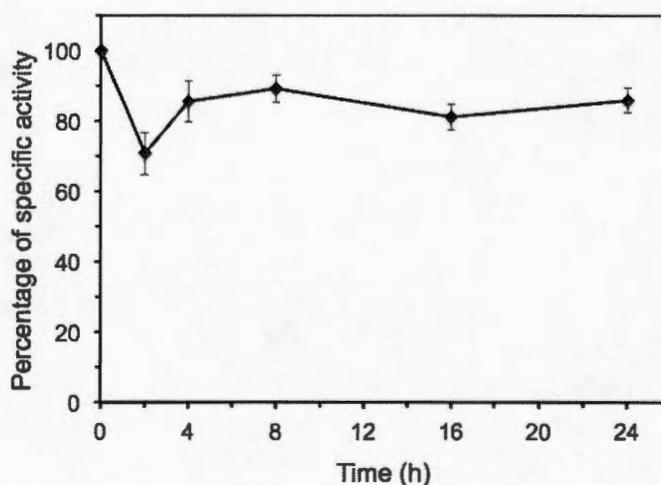
lumen of large amounts of pancreatic enzymes including alpha-amylase catalysing starch hydrolysis and proteases as trypsin and chymotrypsin degrading proteins (*i.e.* DAO). In order to identify the ability of alginate/CMS microbeads to protect DAO against the intestinal proteolytic enzymes, the microspheres with the entrapped DAO and catalase have been incubated for various intervals in SIF with pancreatin, withdrawn for DAO extraction and subsequent run in zymography.

As reported in figure 5.8A, the intensity of the DAO bands on zymography was unchanged, irrespective to the incubation time. Similarly, the gel stained by Coomassie (Fig. 5.8B) showed no change of intensities of DAO and also of catalase bands as proteins, indicating thus that the alginate/CMS matrix was able to protect for duration up to 24 h the DAO and Catalase against proteolytic enzymes present in pancreatin. Also, some degraded protein fragments may appear with the time in the bottom of the gel (Fig. 5.8B) due to their higher mobility. They may originate from the proteolysis of proteins present in pancreatin.

Practically, this zymographic method may give information on the DAO activity in the presence of bioactive proteins as catalase (in bi-enzymatic formulation) or as proteases during the incubation in SIF.

The zymographic and electrophoretic (Coomassie) pattern of DAO extracted from the alginate/CMS microspheres incubated in SIF containing pancreatin proteases was in agreement with the enzyme activity of the extracted DAO determined by the spectrophotometric method. Practically, a slight decrease (less than 15 %) of the DAO activity was found after 24h of microsphere incubation in SIF. The maintaining of the zymographic (Fig. 5.8A) and of the SDS-PAGE (Fig. 5.8B) patterns with almost 85% activity retained after 24 h incubation in SIF (Fig. 5.9) indicates that the entrapment of DAO in alginate/CMS based microbeads presents a good issue for protection for DAO against proteolysis during intestinal passage.

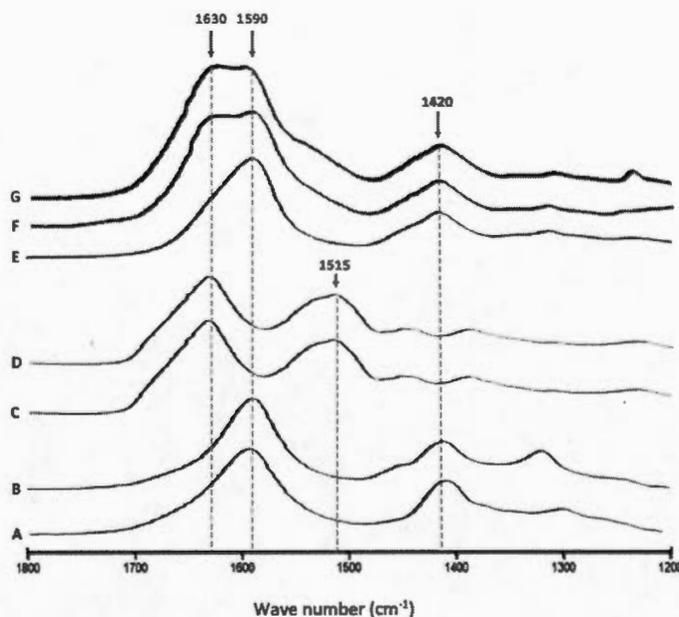
This zymographic assay of DAO associated with interfering catalase may be applicable for other oxidases whose current dosage methods are based on measurement of  $H_2O_2$  such as alcohol oxidase, galactose oxidase, lysyl oxidase, aminoacid oxidase, particularly in processes when catalase may interfere.



**Figure 5.9** Retained activity of entrapped DAO in association with catalase in microbeads at various incubation times (0, 2, 4, 8, 16 and 24 h) in SIF (with pancreatin). The initial enzymatic activity (considered as 100 %) of the entrapped enzyme was established as the enzymatic activity of DAO extracted after microbeads treatment in 1 M phosphate buffer (pH 7.2) without pancreatin.

*Characterization of microspheres containing DAO and catalase.*

FTIR analysis (Fig. 5.10) confirmed the presence of the entrapped enzymes in the microbeads. The Alginate/CMS matrix with the entrapped DAO and catalase (Fig. 5.10 F and G) maintained the major peak at  $1590\text{ cm}^{-1}$  due to the carboxylate groups of the alginate/CMS (Fig. 5.10 A, B, E) and presented additional shoulders at  $1650\text{ cm}^{-1}$ , derived from the band at  $1670\text{ cm}^{-1}$  ascribed to amide-I groups of the entrapped proteins.



**Figure 5.10** FTIR spectral analysis of the DAO/catalase entrapped in alginate/CMS-based microbeads. Alginate (A); CMS (B); free catalase (C); free DAO (D); Alginate/CMS microbeads without enzyme (E); Alginate/CMS microbeads containing DAO (F); and alginate/CMS microbeads containing DAO/catalase (G).

For the moment, only DAO was investigated. Furthermore, certain data obtained in the present study showed that this new approach could be applicable for glucose oxidase. However, to extend the application of this method, other oxidases enzymes such as galactose oxidase and lysyl oxidase, etc. might be studied in details.

### Conclusion

The new zymographic approach may be used to evaluate the DAO activity from a mixture with several enzymes. For instance, the procedure allows the assessing of the activity of DAO when associated with the interfering catalase or of the stability of DAO formulations when incubated in SIF with degrading proteolytic enzymes. A major advantage in this method is the use of the same zymographic gel for overstaining with the Coomassie brilliant blue to monitor the integrity of oxidases.

A correlation of the protein pattern on a zymographic PAA gel stained first for enzymatic activity and then for protein, allows the evaluation of the *intrinsic specific activity* of oxidases from the image analysis data of the same and unique band for the enzyme activity and for the protein concentration. Zymography appears as a convenient simple and low cost procedure not only to determine the intrinsic specific activity but also to monitor the integrity and the stability of oxidases in the presence of interfering enzyme as catalase or of degrading intestinal proteases.

This zymographic approach can be applied for the assays of other oxidases (*i.e.* glucose oxidase). It can also give valuable information on the enzymatic activity of DAO in presence of bioactive proteins and interfering enzymes, such as catalase in bi-enzymatic formulation obtained by entrapment in alginate/CMS microspheres and on their stability in the presence of proteases in the simulated intestinal fluid.

### **Acknowledgments**

Financial support from NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council) of Canada, from Fondation Courtois (Canada) and from Regione Lazio of Italy (FILAS-RU-2014-1020) is gratefully acknowledged. Thanks are due to Mrs. Lindsay Blemur, M. Sc., for helpful discussions.

## Les références citées dans ce manuscrit sont trouvables à la liste des références (section Bibliographie, page 84).

## CHAPITRE VI

### DISCUSSIONS ET CONCLUSION

La DAO d'origine végétale a été proposée comme un agent antihistaminique naturel administré par voie orale. Cependant, la DAO, en catalysant l'oxydation de l'histamine en imidazole-acétaldéhyde, génère également du peroxyde d'hydrogène qui est toxique. Pour neutraliser ses effets néfastes, la catalase a été ajoutée dans la formulation de DAO (Calinescu *et al.*, 2012). L'étude de la stabilité de DAO en présence de catalase dans la formulation rencontre des problèmes majeurs à cause de l'interférence de l'activité de la catalase qui décompose le  $H_2O_2$ . Ainsi, le dosage de la DAO comme oxydase via le  $H_2O_2$  libéré est drastiquement perturbé. En effet, comme la majorité des méthodes de détermination des oxydases sont basées sur le dosage du  $H_2O_2$ , leur détermination par ce type de méthodes n'est pas possible en présence de la catalase qui décompose le  $H_2O_2$  généré lors de la réaction oxydative catalysée par l'oxydase. Généralement, le  $H_2O_2$  est utilisé comme premier substrat de la peroxydase pour oxyder un autre substrat de la peroxydase (un chromogène) ou une molécule fluorescente mesurables par la spectrophotométrie (Calinescu *et al.*, 2010) ou par la fluorimétrie (Matsumoto *et al.*, 1982). Ce dosage n'est pas possible en présence de la catalase. Également, la méthode oxymétrique (Befani *et al.*, 1989) n'est pas appropriée en présence de catalase, car elle va ajouter au dosage d'oxygène ( $O_2$ ). Certaines méthodes alternatives peuvent permettre de déterminer l'activité de DAO via le dosage du  $NH_3$  qui, en présence de L-glutamate déshydrogénase, réagit avec l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique et le NADPH pour former L-glutamate et  $NADP^+$  avec la consommation du NADPH mesurable à 340 nm (Lorenz *et al.*, 1968). Cependant,

plusieurs interférences peuvent affecter la mesure de  $\text{NH}_3$ . En effet, le  $\text{NH}_3$  pourrait être retenu par des groupes carboxylate (chargés négativement) provenant de la matrice (alginate et CMA). En outre, la présence des ions des métaux lourds, provenant de la dégradation des enzymes par des protéases intestinales, comme le cuivre (DAO) ainsi que les tanins se trouvant dans les plantes peuvent inhiber la L-glutamate déshydrogénase. Dans ce contexte, la mise au point d'une nouvelle méthode pour déterminer l'activité de DAO constitue également un objectif indispensable de ce projet.

*Nouvelle approche zymographique pour la détermination des oxydases en présence des enzymes interférentes*

Une nouvelle approche zymographique a été développée pour déterminer l'activité de la DAO en présence de la catalase et des enzymes pancréatiques présentes dans le milieu intestinal ou encore en présence d'autres fragments protéiques interférents résultant de la dégradation par des protéases. Plus précisément, le nouveau procédé proposé est appliqué pour étudier la stabilité de la DAO immobilisée par inclusion dans des microbilles à base d'alginate/CMA, en conditions simulant le tract intestinal. Cette approche zymographique implique les étapes suivantes: immobiliser d'abord la peroxydase dans le gel polyacrylamide durant le processus de polymérisation; séparer les protéines sur gel polyacrylamide (contenant de la peroxydase) par électrophorèse sur des gels SDS-Polyacrylamide, mais sans conditions réductrice ( $\beta$ -mercaptoéthanol); révéler l'activité enzymatique de la DAO sur le gel SDS-PAA (après la séparation électrophorétique), par l'incubation du gel dans une solution de révélation contenant la putrescine (substrat pour la DAO) et l'*o*-PDA (chromogène); traiter le même gel avec le réactif Coomassie pour déterminer la concentration en protéine des différentes bandes.

Un des aspects importants à tenir compte est l'homogénéité dans la distribution de la peroxydase dans le gel de polyacrylamide. Pour évaluer ce degré d'homogénéité,

nous avons préparé des membranes de PAA dans des conditions semblables à celles utilisées pour l'électrophorèse. Ces membranes ont été traitées avec du colorant bleu de Coomassie, en effectuant toutes les étapes comme pour les gels en électrophorèse. Les résultats montrent clairement la distribution homogène de la peroxydase suite à la coloration avec bleu de Coomassie.

L'étude zymographique de la DAO a été effectuée dans les conditions natives et dénaturantes. Cette étude a révélé plusieurs aspects importants:

- Il n'y a pas de différence significative entre l'activité de la DAO en présence et en absence de SDS;
- L'activité de DAO détectée en présence de SDS semblait suggérer qu'il n'est pas exclus que des sous-unités de DAO conservent leur activité. Ce comportement est inattendu et travaux futurs doivent élucider la fonctionnalité des monomères de la DAO en fonction de leur structure.
- En présence de SDS et  $\beta$ -mercaptoéthanol, l'activité de DAO a été diminuée environ de 10 fois et aucune activité n'a été détectée après le chauffage. Ce comportement est tout à fait explicable considérant le rôle dénaturant du mercaptoéthanol et de la chaleur.

Puisque l'activité de la DAO en présence et en absence de SDS n'a pas donné des différences significatives, il est préférable de réaliser cette séparation en présence de SDS, mais non-réductrices (en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol). Dans ces conditions, la résolution des bandes sur des gels de SDS-PAA est bien meilleure que celle en absence de SDS. Il est important de mentionner que le SDS est un détergent anionique qui désorganise des interactions non-covalentes des protéines et leur confère des charges négatives. En dénaturant les protéines avec le SDS, leur migration électrophorétique est en fonction seulement de leur masse. Par contre sans SDS, d'autres propriétés moléculaires comme la forme (*i.e.* la structure globulaire) et

la charge pourraient présenter des interférences dans le processus de séparation. Par exemple, en absence du SDS, des protéines qui sont fortement négatives seraient migrées plus vite vers le bas du gel, même si elles étaient plus grandes.

L'étude en fonction de différentes concentrations (0-15  $\mu\text{g}$ ) d'enzyme pour une concentration en substrat (putrescine) fixe a été réalisée. Par la suite, il est nécessaire de faire une corrélation entre ces résultats obtenus par spectrophotométrie et ceux déterminés par zymographie.

L'analyse des résultats obtenus en fonction de la quantité de DAO a montré que les cinétiques de libération de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en solution et l'intensité des bandes en zymographie ne présentent pas de différences significatives entre les deux méthodes (méthode de dosage en tube, Figure 5.4A et méthode de dosage par zymographie 5.4B). Pour des concentrations de DAO inférieures ou égale à 5  $\mu\text{g}$ , une zone linéaire a été observée, ce qui signifie que les concentrations en substrat (disparition progressive) et en produit (apparition progressive) varient toutes deux linéairement. À des concentrations de DAO supérieures à 5  $\mu\text{g}$ , la dépendance n'est plus linéaire, montrant un plateau (cinétique ordre zéro), ce qui est probablement dû à l'épuisement du substrat ou de l'inhibition du produit.

La corrélation des résultats a permis d'établir une courbe de standard qui représente l'intensité des bandes de DAO rapportée à la cinétique de l'apparition de produit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), qui est stoichiométriquement égal avec la disparition de substrat (putrescine).

De plus, des résultats similaires ont été observés (Figure 5.2) pour la glucose oxydase (GOD). Il est à noter que cette enzyme a été incluse dans cette étude afin de vérifier la possibilité d'élargir l'application de cette nouvelle approche. En effet, la GOD est aussi une oxydase dont les sous unités sont identiques (homodimère) et reliées entre elles par des liaisons disulfure. Différemment de la DAO qui est une enzyme à cuivre ayant le TOPA quinone comme cofacteur, la GOD est une enzyme contenant du fer et

son cofacteur est le flavine adénine dinucléotide (FAD). Bien que la structure de la GOD soit différente de celle de DAO, son produit secondaire est, comme pour la grande majorité des oxydases, le  $H_2O_2$ .

Un autre aspect aussi intéressant à mentionner de cette approche est que le même gel zymographique peut être coloré avec le bleu de Coomassie. Également intéressant et le fait qu'aucune interférence considérable générée par la peroxydase préalablement immobilisée dans le gel n'a été observée. La coloration avec le bleu de Coomassie permet non seulement de déterminer quantitativement la DAO (pour calculer l'activité spécifique intrinsèque), mais aussi de vérifier sa pureté ou encore de visualiser son intégrité après incubation dans le milieu intestinal contenant les protéases pancréatiques.

Les enzymes thérapeutiques administrées par voie orale, dont la DAO et la catalase, sont sensibles à la dégradation par des protéases. L'immobilisation de ces enzymes sous forme de microbilles peut permettre de préserver leur activité durant le transit intestinal. D'après Blemur *et al.* (2015), l'utilisation de la matrice à base d'alginate et de CMA semble appropriée. Dans ce contexte, l'objectif principal du présent projet était de caractériser la DAO en association avec la catalase et d'évaluer la stabilité de la formulation DAO/catalase sous forme de microbilles à base d'alginate/CMA dans le milieu intestinal simulant contenant enzymes pancréatiques.

#### *Caractérisation des microbilles à base d'alginate/CMA contenant de la DAO et de la catalase*

Les microbilles à base d'alginate/CMA stabilisées avec des ions  $Ca^{2+}$  via gélification ionotropique présentent de bonnes propriétés mécaniques et peuvent retenir des enzymes thérapeutiques avec un rendement environ de 88 %.

L'optimisation de la quantité de la catalase introduite dans la formulation de DAO a montré qu'à la ratio de DAO/catalase 2:1 (p/p) la catalase peut décomposer plus de

85 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  généré par la réaction oxydative de DAO. Comme la catalase a une constante catalytique (*turnover number*) très élevée en comparaison à celle de DAO, le ratio DAO catalase 2:1 semble approprié.

L'inclusion des enzymes dans des microbilles a été confirmée par des analyses FT-IR. En effet, l'alginate et le CMA présentent des bandes d'absorption localisées à  $1590$  et  $1420\text{ cm}^{-1}$  attribuées respectivement à la vibration d'élongation asymétrique et symétrique des groupes carboxylate (Figure 5.10 A et B). Pour la catalase (Figure 5.10 C) et la DAO (Figure 5.10 D) natives, les spectres FTIR ont montré deux bandes principales situées à  $1630$  et  $1515\text{ cm}^{-1}$  attribuées respectivement à des bandes amide-I et amide-II. Lorsque ces enzymes ont été immobilisées par inclusion dans les microbilles, seule la bande amide-I ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ) a été observée et chevauché avec la bande d'absorption du groupe carboxylate ( $1590\text{ cm}^{-1}$ ) caractérisée par un élargissement de la bande. La présence d'enzymes dans des microbilles a été confirmée par la bande Amide-I à  $1630\text{ cm}^{-1}$  (Figure 5.10 F et G).

Après incubation des microbilles contenant des enzymes DAO et catalase dans le milieu SIF en présence des enzymes pancréatiques pendant 24 h, la zymographie de DAO extraite à partir des microbilles a été effectuée (Figure 5.8 A) afin de séparer la DAO de la catalase et protéines interférentes. Par la suite, l'intensité de la bande DAO a été mesurée et son activité a été déterminée à l'aide de la courbe standard (Figure 5.5 D) préalablement obtenue par corrélation.

#### *Détermination de l'activité spécifique intrinsèque de la DAO*

Cette nouvelle approche basée sur la zymographie a permis de déterminer l'activité spécifique d'une enzyme oxydase en présence d'autres enzymes et protéines interférentes. Par ailleurs, la détermination quantitative de DAO comme protéine après séparation par électrophorèse a été effectuée à l'aide d'une courbe standard de BSA (Figure 5.6 B), réalisée dans des mêmes conditions, ce qui peut conduire au

concept de «activité spécifique intrinsèque» (ASI) indépendamment du degré de pureté. En général, la zymographie permet de détecter des enzymes d'un mélange par la migration différenciée des protéines. À l'aide d'un substrat spécifique de l'enzyme il est possible de quantifier l'activité spécifique intrinsèque des enzymes. Un des principaux avantages de cette procédure est l'utilisation du même gel zymographique résolu comme enzyme et ensuite coloration avec le bleu de Coomassie pour surveiller l'intégrité des enzymes et vérifier la présence des protéines contaminantes comme la catalase (dans la formulation combinée), des protéases et de peroxydase (dans un gel zymographique). Les activités retenues de la DAO immobilisée en association avec catalase lorsque traités dans SIF à divers intervalles (0-24 h) ont été illustrées dans la figure 5.9. L'activité enzymatique de la DAO a été légèrement réduite (85%), mais presque conservée après 24 heures d'incubation dans SIF. Ce résultat montre que les microbilles à base d'alginate et de CMA confèrent une bonne protection pour DAO contre la protéolyse pendant le transit intestinal. La diminution de l'activité de la DAO immobilisée au cours de la première heure d'incubation peut être due à une faible hydratation ou faible gonflement des microsphères qui est nécessaire pour rendre l'accessibilité du substrat à l'intérieur des billes.

En conclusion, un gel zymographique a été d'abord développé pour l'activité enzymatique et puis le même gel coloré par bleu de Coomassie pour la concentration de protéine permettant d'évaluer l'activité spécifique intrinsèque des oxydases en présence des enzymes interférentes à partir des données d'analyse d'imagerie des bandes apparues sur le gel de PAA. Cette approche zymographique peut être également appliquée pour mesurer l'activité enzymatique de DAO dans une formulation bi-enzymatique avec la catalase encapsulées dans microsphères d'alginate/CMA et sur leur stabilité dans des conditions de dénaturation (par exemple des enzymes protéolytiques dans le tractus intestinal). De plus, cette méthode est simple, peu coûteuse et sans nécessiter des équipements spéciaux tels que fluorimètre, scintillateur, oxymètre, etc.

Pour des travaux futurs, il serait intéressant d'utiliser cette approche zymographique pour déterminer l'activité de certaines enzymes appartenant de la classe des oxydo-réductases telles que glucose oxydase, galactose oxydase, lysyl oxydase, etc. Cependant, il est nécessaire de faire une étude approfondie pour chaque enzyme.

## BIBLIOGRAPHIE

- Agostinelli E. et Seiler N. (2006). Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications. *Amino Acids*, 31, 341-355.
- Agostinelli, E., Przybytkowski, E. et Averill-Bates, D. A. (1996). Glucose, glutathione, and cellular response to spermine oxidation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 649-656
- Agostinelli, E., Przybytkowski, E., Mondovi, B. et Averill-Bates, D. A. (1994). Heat enhancement of cytotoxicity induced by oxidation products of spermine in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical Pharmacology*, 48, 1181-1186
- Agostinelli, E., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Grancara, S., Toninello, A. et Stevanato, R. (2009). Potential anticancer application of polyamine oxidation products formed by amine oxidase: a new therapeutic approach. *Amino Acids*, 38, 353-368.
- Alger, M. S. M. (1997). *Polymer Science Dictionary*. New York : Chapman & Hall.
- Anderson, G. J. et Vulpe, C. D. (2009). Mammalian iron transport. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 3241-61.
- Aouffen, M., Paquin, J., Grandpre, E. D., Nadeau, R. et Mateescu, M. A. (2001). Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuronoprotective properties. *Biochemistry and Cell Biology*, 79, 489-497.
- Argento-Cerù, M. et Autuori, F. (1985). Localization of diamine oxidase in animal tissues. Dans B. Mondovi : *Structure and functions of amine oxidases*. Boca Raton : CRC Press
- Assaad, E. et Mateescu, M. A. (2012). Carboxymethyl starch and chitosan polyelectrolyte complexes. WO 2012097447 A1
- Assaad, E., Wang, Y. J., Zhu, X. X. et Mateescu, M. A. (2011). Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration. *Carbohydrate polymers*, 84, 1399-1407.

- Atanasiu, R. L., Stea, D., Mateescu, M. A., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Maupoil, V., Nadeau, R. et Rochette, L. (1998). Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 189, 127-135.
- Atkins, E. D. T., Nieduszynski, I. A., Mackie, W., Parker, K. D. et Smolko, E. E. (1973a). Structural components of alginic acid. I. The crystalline structure of Poly- $\beta$ -D- mannuronic acid. Results of X-Ray diffraction and polarized infrared studies. *Biopolymers*, 12, 1865-1878.
- Atkins, E. D. T., Nieduszynski, I. A., Mackie, W., Parker, K. D. et Smolko, E. E. (1973b). Structural components of alginic acid. II. The crystalline structure of Poly- $\alpha$ -L-guluronic. Results of X-Ray diffraction and polarized infrared studies. *Biopolymers*, 12, 1879-1887.
- Averill-Bates, D. A., Agostinelli, E., Przybytkowski, E. et Mondovi, B. (1994). Aldehyde dehydrogenase and cytotoxicity of purified bovine serum amine oxidase and spermine in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 72, 36-42.
- Averill-Bates, D. A., Agostinelli, E., Przybytkowski, E., Mateescu, M. A. et Mondovi, B. (1993). Cytotoxicity and kinetic analysis of purified bovine serum amine oxidase in the presence of spermine in Chinese hamster ovary cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, 75-79.
- Bai, J., Rodriguez, A. M., Melendez, J. A. et Cederbaum, A. I. (1999). Overexpression of Catalase in Cytosolic or Mitochondrial Compartment Protects HepG2 Cells against Oxidative Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 26217-26224.
- Barrett, A. J. (1966). Chondromucoprotein-degrading enzymes. *Nature*, 211, 1188-1189.
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L. A. et Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 35, 359-368.
- Befani, O., Sabatini, S., Mateescu, M. A. et Mondovi, B. (1989). Peculiar effects of temperature and polyvinylalcohol on the activity of bovine serum amine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 163, 1168-1174.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C. et Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: A critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 133-153.

- Beltramini, M., Colangelo, N., Giomi, F., Bubacco, L., Di Muro, P., Hellmann, N., Jeanicke, E. et Decker, H. (2005). Quaternary structure and functional properties of *Penaeus monodon* hemocyanin. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 272, 2060-2075.
- Benedetti, M. S. et Dostert, P. (1989) Monoamine oxidase, brain ageing and degenerative diseases. *Biochemical Pharmacology*, 38, 555-561.
- Berry, M. D., Juorio, A. V. et Paterson, I. A. (1994). The functional role of monoamine oxidases A and B in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 42, 375-391.
- Biegański, T., Kusche, J., Lorenz, W., Hesterberg, R., Stahlknecht, C. D. et Feussner, K. D. (1983). Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 756, 196-203.
- Billett, E. E. (2004). Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *Neurotoxicology*, 25, 139-48.
- Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubálek, F., Edmondson, D. E. et Mattevi, A. (2001). Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature Structural Biology*, 9, 22-26.
- Blemur, L., Le, T. C., Marcocci, L., Pietrangeli, P. et Mateescu, M. A. (2015). Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63, 344-353.
- Bolmstedt, B. et Tham, R. (1959). A spectrophotometric method for determination of diamine oxidase (DAO) activity. *Acta Physiologica*, 45, 152-163.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- 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. (2009). History. Dans G. Floris et B. Mondovi : *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology*. Boca Raton : CRC Press.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V. et Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.
- Cadenas, E. et Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 222-230
- Calabrini, A., Arancia, G., Marra, M., Crateri, P., Befani, O., Martone, A. et Agostinelli, E. (2002). Enzymatic oxidation products of spermine induce greater cytotoxic effects on human multidrug-resistant colon carcinoma cells (LoVo) than on their wild-type counterparts, *International Journal of Cancer*, 99, 43-45.
- Calinescu, C. et Mateescu M. A. (2008). Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 582-589.
- 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.
- Calinescu, C., Mulhbacher, J., Nadeau, E., Fairbrother, J. M. et Mateescu, M. A. (2005). Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, 53-60.
- Chahine , R., Mateescu, M. A., Roger, S., Yamaguchi, N., De Champlain, J. et Nadeau, R. (1991). Protective effects of ceruloplasmin against electrolysis-induced oxygen free radicals in rat heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69, 1459-1464.
- Chance, B., Sies, H. et Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59, 527-605.

- Chang, C. M., Klema, V. J., Johnson, B. J., Mure, M., Klinman, J. P. et Wilmot, C. M. (2010). Kinetic and Structural Analysis of Substrate Specificity in Two Copper Amine Oxidases from *Hansenula polymorpha*. *Biochemistry*, 49, 2540-2550.
- Cheuk, W. L., et Finne, G. (1984). Enzymatic Determination of Urea and Ammonia in Refrigerated Seafood Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 14-18.
- Clark, A. H. et Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.
- Cogoni, A., Piras, C., Farci, R., Melis, A. et Floris, G. (1990). *Hordeum vulgare* seedlings amine oxidase. Purification and properties. *Plant Physiology*, 93, 818-821.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. et Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11, 80-88.
- Cooper, R. A., Knowles, P. F., Brown, D. E., McGuirl, M. A. et Dooley, D. M. (1992). Evidence for copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal*, 288, 337-340.
- Copinnet, A., Coma, V., Onteniente, J. P. et Couturier, Y. (1998). Enzymatic degradation of native and acetylated starch-based extruded blends. *Packaging Technology and Science*, 11, 69-81.
- Coruzzi, G., Morini, G., Adami, M. et Grandi, D. (2001). Role of histamine H3 receptors in the regulation of gastric functions. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 52, 539- 553.
- Curzon, G. (1961). Some properties of coupled iron-caeruloplasmin oxidation systems. *Biochemical Journal*, 79, 656-663.
- Davis, G. K. et Mertz, W. (1987). Copper. Dans W. Mertz : *Trace elements in human and animal nutrition*, New York: Academic Press.
- Davydova, V. N., Yermak, I. m., Gorbach, V. I., Krasikova, I. N et Solov'eva, T. (2000). Interaction of Bacterial Endotoxins with Chitosan. Effect of Endotoxin Structure, Chitosan Molecular Mass, and Ionic Strength of the Solution on the Formation of the Complex. *Biochemistry (Mosc)*, 65,1082-90.

- 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.
- de Mol, N. J. (1985). Interaction of phenothiazine drugs with human ceruloplasmin. Relation between activation of catecholamine neurotransmitter oxidation and electron donating ability of phenothiazine drugs. *Biochemical Pharmacology*, 34, 2605-2609.
- Draget, K. I., Skjåk Bræk, G. et Smidsrød, O. (1994). Alginate gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 25, 31-38.
- Dumoulin, M. J., Chahine, R., Atanasiu, R., Nadeau, R. et Mateescu, M. A. (1996). Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin. *Arzneimittel-Forschung*, 46, 855-861.
- Dumoulin, Y., Cartilier, L. H. et Mateescu, M. A. (1999). Cross-linked amylose tablets containing  $\alpha$ -amylase: an enzymatically-controlled drug release system. *Journal of Controlled Release*, 60, 161-167.
- Dunford, P. J., O'donnell, N., Riley, J. P., Williams, K. N., Karlsson, L. et Thurmond, R. L. (2006). The histamine H<sub>4</sub> receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of Immunology*, 176, 7062-7070.
- Engvall, E. et Perlmann, P. (1972). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *Journal of Immunology*, 109, 129-135.
- Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society*, 65, 899-910.
- Fletcher, F., Epstein, C. et Jewell, P. I. (1953). The antimycobacterial activity of tissue extracts and surface-active agents in Dubos's medium. *Journal of General Microbiology*, 8, 323-329.
- Fogel, W. A. et Lewinski, A. (2006). The effects of diamine oxidase administration on experimental ulcerative colitis in rats. *Inflammation Research*, 55, S63-S64.
- Fogel, W. A., Wagner, W., Sasiak, K. et Stasiak, A. (2005). The role of histamine in experimental ulcerative colitis in rats. *Inflammation Research*, 54, S68-S69.

- Fogel, W.A., Toporowska-Kowalska, E. et Stasiak, A. (2009). Copper amine oxidases in intestinal diseases. Dans G. Floris et B. Mondovi : *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology*, Boca Raton : CRC Press.
- Fowler, J. S., Volkow, N. D., Wang, G. J., Logan, J., Pappas, N., Shea, C. et MacGregor, R. (1997). Age-related increases in brain monoamine oxidase B in living healthy human subjects. *Neurobiology of Aging*, 18, 431-435
- Friciu, M. M., Canh Le, T., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M. A. (2013). Carboxymethyl starch and lecithin complex as matrix for targeted drug delivery: I. Monolithic Mesalamine forms for colon delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 521-530.
- Gacesa, P. (1988). Alginates. *Carbohydrate Polymers*, 8, 161-182.
- Galdston, M., Levytska, V., Schwartz, M. S. et Magnússon, B. (1984). Ceruloplasmin. Increased serum concentration and impaired antioxidant activity in cigarette smokers, and ability to prevent suppression of elastase inhibitory capacity of alpha 1-proteinase inhibitor. *The American Review of Respiratory Disease*, 129, 258-263.
- Gallai, V. et Sarchielli, P. (2000). Nitric oxide in primary headaches. *The Journal of Headache and Pain*, 1, 145-154.
- Gantner, F., Sakai, K., Tusche, M. W., Cruikshank, W. W., Center, D. M. et Bacon, K. B. (2002). Histamine H<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 300-307.
- García-Martín, E., Ayuso, P., Martínez, C., Blanca, M. et Agúndez, J. A. G. (2009). Histamine pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, 10, 867-883.
- Gatsogiannis, C. et Markl, J. (2009). Keyhole Limpet Hemocyanin: 9-Å CryoEM Structure and Molecular Model of the KLH1 Didecamer Reveal the Interfaces and Intricate Topology of the 160 Functional Units. *Journal of Molecular Biology*, 385, 963-983.
- Glover, V., Sandler, M., Owen, F. et Riley, G. J. (1977). Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature*, 265, 80-81.

- Goldstein, I. M., Kaplan, H. B., Edelson, H. S. et Weissmann, G. (1979). A new function for ceruloplasmin as an acute-phase reactant in inflammation: a scavenger of superoxide anion radicals. *Transactions of the Association of American Physicians*, 92, 360-9.
- Gombotz, W. R. et Wee, S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 194-205.
- Guss, J. M., Zanotti, G. et Salminen, T. A. (2009). Copper amine oxidase crystal structures. Dans G. Floris et B. Mondovi : *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology*, Boca Raton : CRC Press.
- Harris, J. R. et Markl, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*, 30, 597-623.
- Heby, O. et Persson, L. (1990). Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 15, 153-158
- Heinze, T., Liebert, T., Heinze, U. et Schwikal, K. (2004). Starch derivatives of high degree of functionalization 9: carboxymethyl starches. *Cellulose*, 11, 239-245.
- Hirsch, J. G. et Dubos, R. J. (1952). The effect of spermine on tubercle bacilli. *Journal of Experimental Medicine*, 95, 191-208.
- Honzawa, Y., Nakase, H., Matsuura, M. et Chiba, T. (2011). Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17, E23-E25.
- Hu, W.-W. et Chen, Z. (2012). Role of histamine and its receptors in cerebral ischemia. *ACS Chemical Neuroscience*, 3, 238-247.
- 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.
- Itoh, Y., Ito, A., Iwata, K., Tanzawa, K., Mori, Y. et Nagase, H. (1998). Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 24360-24367.
- Jensen, E. R., Long, J. E. et Williams, L. D. (1972). *Brevet américain US3666557 A1*.

- Jones, B. et Keams, G. (2010). Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 89, 189-197.
- Jutel, M., Watanabe, T., Akdis, M., Blaser, K. et Akdis, C. A. (2002). Immune regulation by histamine. *Current Opinion in Immunology*, 14, 735-740.
- Jutel, M., Watanabe, T., Klunker, S., Akdis, M., Thomet, O. A., Malolepszy, J., Zak-Nejmark, T., Koga, R., Kobayashi, T. et Blaser, K. (2001). Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*, 413, 420-425.
- Kawashima, Y., Lin, S. Y., Kasai, A., Handa, T. et Takenaka, H. (1985). Preparation of a prolonged release tablet of aspirin with chitosan. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 33, 2107-2113.
- Khalil, M. I., Hashem, A. et Habeish, A. (1990). Carboxymethylation of maize starch. *Starch Starke*, 42, 60-63.
- Kim, M., Okajima, T., Kishishita, S., Yoshimura, M., Kawamori, A., Tanizawa, K. et Yamaguchi, H. (2002). X-ray snapshots of quinone cofactor biogenesis in bacterial copper amine oxidase. *Nature Structural Biology*, 9, 591-596.
- Kivirand, K. et Rincken, T. (2007). Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Chemistry*, 56, 164-171.
- Klinman, J. P. et Mu, D. (1994). Quinoenzymes in biology. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 299-344.
- Knapczyk, J. (1993). Excipient ability of chitosan for direct tableting. *International Journal of Pharmaceutics*, 89, 1-7.
- Komericki, P., Klein, G., Reider, N., Hawranek, T., Strimitzer, T., Lang, R., Kranzelbinder, B. et 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
- Kondo, Y., Kawai, Y., Miyazawa, T., Matsui, H. et Mizutani, J. (1994). An assay for lipoxygenase activity by chemiluminescence. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 421-422.

- Krabbe, A. et Olesen, J. (1980). Headache provocation by continuous intravenous infusion of histamine. Clinical results and receptor mechanisms. *Pain*, 8, 253-259.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 946-950.
- Kruszewski, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research*, 531, 81-92.
- Kumar, V., Dooley, D. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Harvey, I., McGuirl, M. A., Wilce, M. C. et Zubak, V. M. (1996). Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure*, 4, 943-955.
- Kusche, J., Richter, H., Hesterberg, R., Schmidt, J. et Lorenz, W. (1973). Comparison of the <sup>14</sup>C-putrescine assay with the NADH test for the determination of diamine oxidase: description of a standard procedure with a high precision and an improved accuracy. *Agents and Actions*, 3, 148-156.
- Kusche, K., Ruhberg, H. et Burmester, T. A. (2002). A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10545-10548.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lai-Fook, J. (1966). The repair of wounds in the integument of insects. *Journal of Insect Physiology*, 12, 195-226.
- Lazik, W., Heinze, T., Pfeiffer, K., Albrecht, G. et Mischnick, P. (2002). Starch derivatives of a high degree of functionalization. VI. Multistep carboxymethylation. *Journal of Applied Polymer Science*, 86, 743-752.
- Leber, T. M. et Balkwill, F. R. (1997). Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*, 249, 24-28.
- Lemieux, M., Gosselin, P. et Mateescu, M. A. (2009). Carboxymethyl high amylose starch as excipient for controlled drug release: Mechanistic study and the influence of degree of substitution. *International Journal of Pharmaceutics*, 382, 172-182.

- Lemieux, M., Gosselin, P. et Mateescu, M. A. (2010). Influence of drying procedure and of low degree of substitution on the structural and drug release properties of carboxymethyl starch. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 11, 775 -785.
- Lenaerts, V., Dumoulin, Y. et Mateescu, M. A. (1991). Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. *Journal of Controlled Release*, 15, 39-46.
- Linder, M. C., Houle, P. A., Isaacs, E., Moor, J. R. et Scott, L. E. (1979). Copper regulation of ceruloplasmin in copper-deficient rats. *Enzyme*, 24, 23-35
- Lindley, P. F., Card, G., Zaitzeva, I., Zatischev, V., Reinhammar, B., Selin-lindgren, E. et Yoshida, K. (1997). An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2, 454-463.
- Liu, J., Chen, J., Dong, N., Ming, J. et Zhao, G. (2012). Determination of degree of substitution of carboxymethyl starch by Fourier transform mid-infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry*, 132, 2224-2230.
- Lord-Fontaine, S., Agostinelli, E., Przybytkowski, E. et Averill-Bates, D. A. (2001). Amine oxidase, spermine, and hyperthermia induce cytotoxicity in P-glycoprotein overexpressing multidrug resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 79, 1-12.
- Lorenz, W., Kusche, J., Hahn, H. et Werle, E. (1968). Determination of the activity of diamine oxidases, urease and histidine ammonia-lyase by enzymatic assay of ammonia. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 243, 259-263.
- Løvstad, R. A. (2006). A Kinetic Study on the Phenothiazine Dependent Oxidation of NADH by Bovine Ceruloplasmin. *Biometals*, 19, 1-5.
- Mahy, N., Andres, N., Andrade, C. et Saura, J. (2000). Age-related changes of MAO-A and -B distribution in human and mouse brain. *Neurobiology (Budapest, Hungary)*, 8, 47-54.
- Maintz, L. et Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1185-1196.
- Makino, N. (1985). An oxygenation-linked dye binding to *Limulus polyphemus* hemocyanin. *European Journal of Biochemistry*, 146, 563-569.

- Markl, J., savel, A., Knabe, B., Storz, H., Krabbe, T., Abel, S. et Markl, B. (1986). Mercury ions-a tool to study the specific role of individual subunits in the allosteric interaction of arthropod hemocyanins. Dans B. Linzen : *Invertebrate oxygen carriers*, Heidelberg : Springer
- Marton, L. J. et Pegg, A. E. (1995). Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 55-91
- Masini, E., Bani, D., Marzocca, C., Mateescu, M. A., Mannaioni, P. F., Federico, R. et Mondovi, B. (2007). Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. A plant histaminase in allergic asthma and ischemic shock. *Scientific World Journal*, 7, 888-902.
- Masini, E., Vannacci, A., Giannini, L., Befani, O., Nistri, S., Mateescu, M. A., Mannaioni, P. F., Mondovi, B. et Federico, R. (2004). Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. *European Journal of Pharmacology*, 502, 253-264.
- Masini, E., Vannacci, A., Marzocca, C., Mannaioni, P.F., Befani, O., Federico, R., Toma, A. et Mondovi, B. (2002). A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 840-846.
- Massicotte, L. P., Baille, W. E. et Mateescu, M. A. (2008). Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients: Structural insights and formulation of pancreatic enzymes. *International Journal of Pharmaceutics*, 356, 212-223.
- Mateescu, M. A. et Nadeau, R. (2009). Copper amine oxidase as antioxydant and cardioprotectives agents. Dans G. Floris et B. Mondovi : *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology*, Boca Raton : CRC Press.
- Mateescu, M. A., Calinescu, C., Ispas-Szabo, P., Mondovi, B. et Federico, R. (2012b). *Brevet américain US 2014/0212492 A1*. HISTAPHARM INC.
- Mateescu, M. A., Calinescu, C., Le, T. C., Federico, R. et Mondovi, B. (2012). Zymographic Assay of Oxidases Using Peroxidase or Hemin Entrapped in Polyacrylamide Gel. *Methods in Molecular Biology*, 869, 591-605..
- 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.

- Maurer, H. W. et Kearney, R. L. (1998). Opportunities and challenges for starch in the paper industry. *Starch-Srärke*, 50, 396-402.
- Mayer, I., Pittner, F., Hermann, M. et Missbichler, A. (2007). Highly sensitive determination of DAO activity by oxidation of a luminescence reagent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 143, 164-175.
- Mcgrath, A. P., Hilmer, K. M., Collyer, C. A., Dooley, D. M. et Guss, J. M. (2010). A new crystal form of human diamine oxidase. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 66, 137-142.
- McGrath, A. P., Mithieux, S. M., Collyer, C. A., Bakhuis, J. G., Van Den Berg, M., Sein, A., Heinz, A., Schmelzer, C., Weiss, A. S. et Guss, J. M. (2011). Structure and activity of *Aspergillus nidulans* copper amine oxidase. *Biochemistry*, 50, 5718-5730.
- McGuirl, M. A., McCahon, C. D., McKeown, K. A. et Dooley, D. M. (1994). Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies. *Plant Physiology*, 106, 1205-1211.
- Mennigen, R., Kusche, J., Streffer, C. et Krakamp, B. (1990). Diamine oxidase activities in the large bowel mucosa of ulcerative colitis patients. *Agents and Actions*, 30, 264-266.
- Mondovi, B. et Finazzi-Agrò, A. (1982). Structure and function of amine oxidases. Dans F. Bossa, E. Chiancone, A. Finazzi-Agrò et R. Strom : *Structure and Function Relationships in Biochemical Systems*, New York : Plenum Press.
- Mondovi, B. et Riccio, P. (1984). Copper amine oxidases: structure and function. *Advances in Inorganic Biochemistry*, 6, 225-244.
- Mondovi, B., Rotilio, G., Costa, M. T., Finazzi-Agro, A., Chiancone, E., Hansen, R. E. et Beinert, H. (1967). Diamine oxidase from pig kidney. Improved purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 1160-1167.
- Morris, N. J., Ducret, A., Aebersold, R., Ross, S. A., Keller, S. R. et Lienhard, G. E. (1997). Membrane amine oxidase cloning and identification as a major protein in the adipocyte plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 9388-9392.
- Mu, D., Medzihradzky, K. F., Adams, G. W., Mayer, P., Hines, W. M., Burlingame, A. L., Smith, A. J., Cai, D. et Klinman, J. P. (1994). Primary structures for a mammalian cellular and serum copper amine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 9926-9932.

- Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P. et Mateescu, M. A. (2004). Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release: II. Swelling properties and mechanistic study. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 231-238.
- Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P., Lenaerts, V. et Mateescu, M. A. (2001). Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. *Journal of Controlled Release*, 76, 51-58.
- Néel, J. (1965). *Exposés de chimie macromoléculaire: structure chimique des polyosides*. Paris: Gauthier-Villars.
- Newman, A. W., Mueller, R. L., Vitez, I. M., Kiesnowski, C. C., Bugay, D. E., Findlay, W. P. et Rodriguez, C. (1996). Starch. Dans G. B. Harry : *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, New Jersey : Academic Press.
- Nicotra, A., Pierucci, F., Parvez, H. et Senatori, O. (2004). Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology*, 25, 155-165
- Ohtsu, H. et Watanabe, T. (2003). New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 443-447.
- Otsuka, S. et Kobayashi, Y. (1964). Radioisotopic assay for monoamine oxidase determinations in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, 13, 995-1006.
- Ouwerx, C., Velings, N., Mestdagh, M. et Axelos, M. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*, 6, 393-408.
- Overall, C. M. et Limeback, H. (1988). Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. Amelogenolytic serine proteinases are associated with enamel maturation in pig. *Biochemical Journal*, 256, 965-972.
- Page, S., Ammit, A.J., Black, J. L. et Armour, C. L. (2001). Human mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281, L1313-L1323.
- Parsons, M. R., Convery, M. A., Wilmot, C. M., Yadav, K. D. S., Blakeley, V., corner, A. S., Philips, S. et Knowles, P. F. (1995). Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure*, 3, 1171-1184.

- Patel, B. N., Dunn, R. J., Jeong, S. Y., Zhu, Q., Julien, J. P. et David, D. (2002). Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *Journal of Neuroscience*, 22, 6578-6586.
- Pietrangeli, P., Federico, R., Mondovi, B. et Morpurgo, L. (2007). Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 997-1004.
- Purich, D. L. (2010). *Enzyme Kinetics: Catalysis and Control. A reference of theory and Best-Practice Methods*, Elsevier : London
- Qian, Z. M., et Ke, Y. (2001). Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 35, 287-294
- Raithel, M., K fner, M., Ulrich, P. et Hahn, E. (1999). The involvement of the histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal. *Inflammation Research*, 48, 75-76.
- Raithel, M., Matek, M., Baenkler, H., Jorde, W. et Hahn, E. (1995). Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergy enteropathy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 108, 127-133.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. et Ravi Kumar, M. N. V. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207.
- Rea, G., de Pinto, M. C., Tavazza, R., Biondi, S., Gobbi, V., Ferrante, P., De Gara, L., Federico, R., Angelini, R. et Tavladoraki, P. (2004). Ectopic expression of maize polyamine oxidase and pea copper amine oxidase in the cell wall of tobacco plants. *Plant Physiology*, 134, 1414-1426.
- Rikans, L. E. et Hornbrook, K. R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1362, 116-127.
- Robyt, J. F. (2008). Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology. Dans B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta et J. Thiem : *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Heidelberg : Springer
- Rosei, M. A., Foppoli, C., Wang, X. T., Coccia, R. et Mateescu, M. A. (1998). Production of melanins by ceruloplasmin. *Pigment cell Research*, 11, 98-102.

- Rosenthal, S. M. et Tabor, C. W. (1956). The pharmacology of spermine and spermidine. Distribution and excretion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 116, 131-138.
- Sabnis, S., Rege, P. et Block, L. H. (1997). Use of Chitosan in compressed tablets of diclofenac sodium: Inhibition of drug release in an acidic environment. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2, 243-255.
- Salvato, B. et Beltramini, M. (1990). Hemocyanin: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site. *Life Chemistry Reports*, 8, 1-47.
- Salvato, B., Santamaria, M., Beltramini, M., Alzuet, G. et Casella, L. (1998). The enzymatic properties of Octopus vulgaris hemocyanin: o-diphenol oxidase. *Biochemistry*, 37, 14065-14077.
- Sanchez, D., Ganfornina, M. D., Gutierrez., G. et Bastani, M. J. (1998). Molecular characterization and phylogenetic relationship of a protein with potential oxygen-binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects? *Molecular Biology and Evolution*, 15, 415-426.
- Sangseethong, K., Ketsilp, S. et Sriroth, K. (2005). The role of reaction parameters on the preparation and properties of carboxymethyl cassava starch. *Starch-Stärke*, 57, 84-93.
- Saura, J., Richards, J. G. et Mahy, N. (1994b) Differential age-related changes of MAO-A and MAO- B in mouse brain and peripheral organs. *Neurobiology of Aging*, 15, 399-408.
- Schell, H. D., Serban, M., Mateescu, M. A. et Bentia, T. (1978). Acid and basic amylose ionic exchangers. *Revue Roumaine de Chimie.*, 23,1143-1147.
- Schmidt, W. U., Sattler, J., Hesterberg, R., Roher, H. D., Zoedler, T., Sitter, H. et Lorenz, W. (1990). Human intestinal diamine oxidase (DAO) activity in Crohn's disease: a new marker for disease assessment? *Agents and Actions*, 30, 267-270.
- Schwelberger, H. G. (2004). Diamine oxidase (DAO) enzyme and gene. Dans A. Falus, Zs. Darvas et N. Grosman : *Histamine: Biology and Medical Aspects*, Budapest : Spring Med Publishing.
- Scoccianti, V., Torrigiani, P. et Bagni, N. (1990). Distribution of diamine oxidase activity and polyamine pattern in bean and soybean seedlings at different stages of germination. *Physiologia Plantarum*, 80, 515-519.

- Sepper, R., Konttinen, Y. T., Sorsa, T. et Koski, H. (1994). Gelatinolytic and type IV collagenolytic activity in bronchiectasis. *Chest*, 106, 1129-1133.
- Shepherd, G. M. (1994). *Neurobiology*. New York : Oxford University Press
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295.
- Silva-Santisteban, B. O. Y., Converti, A. et Maugeri Filho, F. (2006). Intrinsic Activity of Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and Carbon and Nitrogen Balances. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 479-483.
- Smidsrød, O. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71-78.
- Smolinska, S., Jutel, M., Cramer, R. et O'mahony, L. (2014). Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy*, 69, 273-281.
- Snyder, S. H. et Hendley, E. D. (1968). A simple and sensitive fluorescence assay for monoamine oxidase and diamine oxidase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 163, 386-392.
- Söderhäll, K. et Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10, 23-28.
- Stocks, J., Gutteridge, J. M., Sharp, R. J. et Dormandy, T. L. (1974). The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and alpha-tocopherol. *Clinical Science and Molecular Medicine*, 47, 223-233.
- Stojanovic, Z., Jeremic, K., Jovanovic, S. et Lechner, M. D. (2005). A comparison of some methods for the determination of the degree of substitution of carboxymethyl starch. *Starch- Stärke*, 57, 79-83.
- Stolen, C. M., Yegutkin, G. G., Kurkijärvi, R., Bono, P., Alitalo, K. et Jalkanen, S. (2004). Origins of serum semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Circulation Research*, 95, 50-57.
- Su, Q. et Klinman, J. P. (1998). Probing the mechanism of proton coupled electron transfer to dioxygen: the oxidative half-reaction of bovine serum amine oxidase. *Biochemistry*, 37, 12513-12525.
- Sugumar, M. (1996). Role of insect cuticle in immunity. Dans K. Söderhäll, S. Iwanaga et G. Vasta : *New directions in invertebrate immunity*, New Jersey: SOS Publications.

- Sunderman, F. W. Jr. et Nomoto, S. (1970). Measurement of human serum ceruloplasmin by its *p*-phenylenediamine oxidase activity. *Clinical Chemistry*, 16, 903-910.
- Sutherland, L. W. (1991). Alginates. Dans D. Byron : *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*, New York : Stockton Press
- Szeberenyi, J. B., Pallinger, E., Zsinko, M., Pos, Z., Rothe, G., Orso, E., Szeberenyi, S., Schmitz, G., Palus, A. et Laszlo, V. (2001). Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs *in vitro* human dendritic cell differentiation. *Immunology Letters*, 76, 175-182.
- Takeshita, K., Sakai, K., Bacon, K. B. et Gantner, F. (2003). Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan *in vivo*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307, 1072- 1078 .
- Texel, S. J., Zhang, J., Camandola, S., Unger, E. L., Taub, D. D., Koehler, R. C., Harris, Z. L. et Mattson, M. P. (2011). Ceruloplasmin deficiency reduces levels of iron and BDNF in the cortex and striatum of young mice and increases their vulnerability to stroke. *PLoS one*, 6, e25077.
- Thompson J. S., Bumett D. A., Markin R. S. et Vaughan W. P. (1988). Intestinal mucosa diamine oxidase activity reflects intestinal involvement in Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*, 83, 756-760.
- Tijssen, C. J., Kolk, H. J., Stamhuis, E. J. et Beenackers, A. A. C. M. (2001). An experimental study on the carboxymethylation of granular potato starch in non-aqueous media. *Carbohydrate Polymers*, 45, 219-226.
- Turowski, P. N., McGuirl, M. A. et Dooley, D. M. (1993). Intramolecular electron transfer rate between active-site copper and topa quinone in pea seedling amine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 17680-17682.
- US Pharmacopeia XXII. 1990. US pharmacopeial Convention. Reockvill, MD, pp. 1788-1789.
- Vachette, P., Dainese, E., Vasyliiev, V. B., Muro, P. D., Beltramini, M., Svergun, D. I., De Filippis, V. et Salvato, B. (2002). A key structural role for active site type 3 copper ions in human ceruloplasmin. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 40823-40831.
- Van Holde, H. E. et Miller, K. I. (1982). Hemocyanins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 15, 1-129.

- Van Holde, K. E. et Miller, K. I. (1995). Hemocyanins. *Advances in Protein Chemistry*, 47, 1-81.
- Vianello, F., Dipaolo, M. L., Stevanato, R., Gasparini, R. et Rigo, A. (1993). Purification and Characterization of Amine Oxidase from Soybean Seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307, 35-39.
- Vignevich, V., Dooley, D. M., Guss, J. M., Harvey, I., McGuirl, M. A. et Freeman, H. C. (1993). Crystallization and preliminary crystallographic characterization of the copper-containing amine oxidase from pea seedlings. *Journal of Molecular Biology*, 229, 243-245.
- Vlieg-Boerstra, B. J., van der, H. S., Oude Elberink, J. N., Kluin-Nelemans, J. C. et Dubois, A. E. (2005). Mastocytosis and adverse reactions to biogenic amines and histamine- releasing foods: what is the evidence? *Netherlands Journal of Medicine*, 63, 244-249.
- Williams, D. M., Loukopoulos, D., Lee, G. R. et Cartwright, G. E. (1976). Role of copper in mitochondrial iron metabolism. *Blood*, 48, 77-85
- Wilson, M. T. et Reeder, B. J. (2007). Oxygen-binding haem proteins. *Experimental Physiology*, 93, 128-132.
- Winterkamp, S., Weidenhiller, M., Otte, P., Stolper, J., Schwab, D., Hahn, E. G. et Raithel, M. (2002). Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*, 97, 3071-3077.
- Wurzburg, O. B. (1986). Introduction. Dans O. B. Wurzburg : *Modified starehes: properties and uses*, Boca Raton : CRC Press.
- Xie, H. et He, S.-H. (2005). Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 2851-2857.
- Yu, G., Liang, J., He, Z. et Sun, M. (2006). Quantum dot-mediated detection of  $\gamma$ -aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco. *Chemistry & Biology*, 13, 723-731.
- Yu, P. H., Wright, S., Fan, E. H., Lun, Z. R. et Gubisne-Harberle, D. (2003). Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1647, 193-199.

- Zaitsev, V. N., Zaitseva, I., Papiz, M. et Lindley, P. F. (1999). An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 4, 579-587.
- Zaitseva, I., Zaitsev, V. N., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A. et Lindley, P. F. (1996). The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of copper centers. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1-15-23.
- Zlateva, T., Di Muro, P., Salvato, B. et Beltramini, M. (1996). The *o*-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Letters*, 348, 251-254.