

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MICROSPHÈRES DE CARBOXYMETHYLAMIDON : ALGINATE POUR LA
LIVRAISON INTESTINALE DE LA DIAMINE OXYDASE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

LINDSAY BLEMUR

NOVEMBRE 2014

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.01-2006). 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

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le professeur Mircea Alexandru Mateescu, de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir accordé un soutien sans faille durant mes études en maîtrise. Je lui exprime également ma gratitude pour ses conseils avisés et généreux.

Je remercie aussi, et de manière particulière, le Dr Tien Canh Le pour sa disponibilité, son grand soutien et sa gentillesse. Il a su m'apporter l'aide nécessaire au moment où j'en avais le plus besoin.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues de laboratoire pour leur aide et soutien ainsi que pour les bons moments passés ensemble. Ils ont su me motiver et m'offrir le soutien psychologique nécessaire pour m'aider à finir ma maîtrise. Un gros merci particulier pour Nassima Larbi, Kouadio Victorien Konan et Samaneh Ahmadifar.

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

Je remercie de tout mon cœur ma famille pour leur soutien et leur amour tout au long de mes études. Ma mère, Marlène Moïse, pour m'avoir motivé de poursuivre mes études et mon père, Henry Blémur, pour ses bon conseils.

Je tiens à exprimer mes remerciements vers le CRIPA (Regroupement Stratégique FQRNT) et la Fondation Courtois ainsi que vers FARE (UQAM) pour les bourses octroyées et le financement pour le projet.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vvi
RÉSUMÉ	viii

PARTIE I - INTRODUCTION

CHAPITRE I

LES AMINES OXYDASES ET LEURS RÔLES PHYSIOLOGIQUES.....	1
1.1 Les amine oxydases – généralités	1
1.1.1 La structure des amines oxydases à cuivre	2
1.1.2 Mécanisme catalytique des amines oxydase à cuivre.....	3
1.2 Les amines oxydases à cuivre et leur action sur les amines biogènes	5
1.2.1 La diamine oxydase et le métabolisme de l’histamine	6
1.2.2 La diamine oxydase comme agent antihistaminique et anti-allergène	9
1.2.3 La diamine oxydase comme agent anti-inflammatoire.....	10
1.3 Les amine oxydases cuivriques d’origine animale.....	11
1.4 La diamine oxydase végétale:	12

CHAPITRE II

LES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L’INTESTIN	13
2.1 La colite ulcéreuse.....	16
2.2 La maladie de Crohn	17
2.3 L’histamine et les maladies du colon enflammé	19
2.4 La diamine oxydase et les maladies du colon enflammé	20

CHAPITRE III	
EXCIPIENTS POLYCARBOXYLIQUES POUR LA LIVRAISON D'AGENT BIOACTIF AU NIVEAU INTESTINAL	23
3.1. L'amidon et ses dérivés polycarboxyliques	23
3.2 L'alginate	28
3.2.1 La structure de l'alginate	28
3.2.2 La formation de gel : la gelation ionotropique	29
3.2.3 Applications thérapeutiques et alimentaires	31
CHAPITRE IV	
PRESENTATION DU PROJET	33
PARTIE II - SECTION EXPÉRIMENTALE	
CHAPITRE V	
MICROSPHÈRES DE CARBOXYMÉTHYLAMIDON/ALGINATE POUR LA LIVRAISON INTESTINALE DE LA DIAMINE OXYDASE	39
CHAPITRE VI	
DISCUSSIONS ET CONCLUSION	62
ANNEXES	
CONTRIBUTION AU "97 th CANADIAN CHEMISTRY CONFERENCE AND EXHIBITION"	70
BIBLIOGRAPHIE.....	71

LISTE DES FIGURES

	Page
1.1 Structures des amines oxydase à cuivre provenant d' <i>Escherichia coli</i>), <i>Aspergillus nidulans</i> et de l'humain.	3
1.2. Schéma du mécanisme catalytique des CuAO.....	5
1.3 Métabolisme de l'histamine	9
2.1 La distribution des maladies inflammatoires de l'intestin.....	15
2.2 Zone d'inflammation de la colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn.....	19
2.3 Modèle représentant élimination intestinale de l'histamine	22
3.1 Schéma de la synthèse du carboxyméthylamidon.....	26
3.2 Photo de comprimés de CMA, chitosane, mélange 50% CMA : 50% Chitosane et le complexe polyélectrolyte durant différents tests de dissolutions	27
3.3 Structure partielle de l'alginate arrangée dans une séquence intercalée (...GGMMGG...) de guluronate et mannuronate	29
3.4 Représentation schématique de la structure « boîte d'œuf » obtenue par l'association de la séquence guluronate de l'alginate avec un cation divalent (Ca ²⁺)	30
4.1 Procédure de préparation de microsphère par gélation ionotropique.....	35
4.2 Présentation schématique des différents volets du projet de maîtrise.....	37
5.1 Macroscopic view of CMS/Alginate microbeads after Coomassie Blue staining.....	53
5.2 Electrophoresis pattern of diamine oxidase by (a) Coomassie staining and (b) zymography	54
5.3 FTIR spectra of air dried microbeads.....	55
5.4 X-ray diffraction patterns of Alginate microbeads, CMS/Alginate microbeads, CMS/Alginate microbeads with entrapped enzyme.	56

5.5 Scanning electron micrographs of CMS/Alginate air dried microbeads after various treatments.....	58
5.6 Enzyme activity of free and entrapped enzyme at various incubation times in SIF (with pancreatin, pH 7.2).....	60
6.1 Structure hypothétique du complexe CMA/Alginate.....	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AO	Amine oxydase
CMA	Carboxyméthylamidon
C.U	Colite ulcéreuse
CuAO	Amine oxydase à cuivre
DAO	Diamine oxydase
DRX	Diffraction des rayons X
DS	Degré de substitution
ECAO	Amine oxydase à cuivre provenant d' <i>Escherichia coli</i>
E. coli	Escherichia coli
FAD-AO	Amines oxydases à flavine adénine dinucléotide
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
G	Guluronate
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
HNMT	Histamine N-méthyltransférase
HPAO-1 HPAO-2	Amine oxydase à cuivre provenant de <i>Hansenula polymorpha</i>
HPC	Hydroxypropylcellulose

LtQ	Lysine tyrosyl quinone
M	Mannuronate
MC	Maladie de Crohn
MEB	Microscopie électronique de balayage
MII	Maladies inflammatoires de l'intestin
SGF	Fluide gastrique simulé
SIF	Fluide intestinal simulé
TPQ	2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone

RÉSUMÉ

L'histamine : 2-(4-imidazolyl)-éthylamine est une amine endogène synthétisée dans de nombreux organes, qui peut agir sur quatre récepteurs H1-H4 présents sur la surface des différentes cellules en provoquant, selon le récepteur, une réponse inflammatoire ou des sécrétions gastriques. La colite ulcéreuse et la maladie de Crohn sont les deux formes principales de Maladies Inflammatoires de l'Intestin (MII). Les symptômes associés aux MII sont considérés, en partie, causés par un niveau élevé d'histamine, comme facteur pro-inflammatoire. Les traitements anti-inflammatoires actuels (acide 5-aminosalicylique ou des corticostéroïdes) présentent plusieurs effets secondaires.

Notre équipe a proposé un agent antihistaminique naturel administré par voie orale: une oxydase à cuivre végétale : la diamine oxydase (DAO ou Histaminase). L'hypothèse est que la DAO (EC 1.4.3.22), une fois livrée au niveau du tractus intestinal, dégrade l'histamine ce qui limite l'inflammation au niveau du côlon.

L'objectif principal du projet était d'utiliser des matériaux de type biopolymères comme matrices-excipients pour protéger l'intégrité de la DAO dans les conditions dénaturantes gastro-intestinales et de lui permettre d'exercer son activité dans le côlon sans être dégradée par les enzymes protéolytiques. Pour y parvenir, l'immobilisation par inclusion de la DAO provenant de la gesse commune (*Lathyrus sativus*) dans des microsphères d'alginate a été suggérée. L'alginate est un biopolymère naturel qui peut former des microsphères par gélation ionotropique en présence de cations bivalents comme le Ca^{2+} . La méthode utilisée permet l'immobilisation des cellules, enzymes ou autres agents bioactifs, mais les microsphères sont poreuses et ainsi moins performantes pour la livraison au côlon suite aux phénomènes de dénaturation à cause de la diffusion du fluide gastrique acide à l'intérieur des billes et de l'érosion dans le milieu intestinal neutre. Nous avons envisagé l'association du carboxyméthyl amidon (CMA) générateur d'hydrogel à l'alginate pour réduire la porosité des microsphères. Les microbilles ont été obtenues en distribuant, sous agitation, des gouttes de la suspension formatrice de complexe de CMA:alginate, contenant la DAO, dans une solution de CaCl_2 . L'inclusion de l'enzyme a été confirmée par la coloration de Coomassie, l'activité enzymatique, l'électrophorèse SDS-PAGE et la zymographie tandis que la structure du complexe a été évaluée par analyse en infrarouge (FTIR), diffraction des rayons X (DRX) et microscopie électronique à balayage (MEB). Les résultats ont montré un rendement d'inclusion de DAO de 82-95 % et une structure des microsphères restant compacte même en présence d'enzymes protéolytiques. Une rétention de 65 % de l'activité de la DAO dans les microsphères de CMA/Alginate a été observée durant 24 h en milieu intestinal contenant de la pancréatine, alors que, dans des conditions similaires, l'enzyme libre était totalement inactivée.

La nouveauté de ce projet réside dans l'association du CMA et de l'alginate pour obtenir des microsphères compactes qui pourraient présenter des intérêts dans l'industrie pharmaceutique pour l'administration orale et livraison au côlon de probiotiques, enzymes ou molécules sensibles aux enzymes protéolytiques.

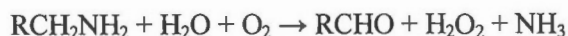
Mots clés : *Diamine oxydase, maladie de Crohn, maladie inflammatoire de l'intestin, microspheres de carboxyméthyl amidon/alginate, résistance au milieu gastro-intestinal*

CHAPITRE I

LES AMINES OXYDASES ET LEURS RÔLES PHYSIOLOGIQUES

1.1 Les amine oxydases – généralités

Les amine oxydases (AO) sont des enzymes essentielles impliquées dans divers processus biochimique, tel, la dégradation des amines exogènes et endogènes incluant les neurotransmetteurs et les polyamines. Une autre fonction est la réticulation du collagène et de l'élastine par oxydation de la lysine (Reiser et al., 1992). Les AO catalysent la déamination oxydative d'un grand nombre d'amines biogènes pour former l'aldéhyde correspondant, du peroxyde d'hydrogène et de l'ammoniaque (Mondovi et Finazzi-Argo, 1982) selon la réaction :



Les amine oxydases sont divisées en deux sous classes en fonction de la nature du cofacteur organique impliqué dans la réaction catalytique : les amines oxydase à cuivre (CuAO, *i.e* les diamine oxydase et les amines oxydases sensibles à la semicarbazide) et les amines oxydases à flavine adénine dinucléotide (FAD-AO, *i.e* monoamine oxydase A, monoamine oxydase B). Les CuAO catalysent habituellement l'oxydation des amines primaires alors que les FAD-AO peuvent catalyser l'oxydation des amines primaires, secondaires ou tertiaires (Binda et al., 2002).

1.1.1 La structure des amines oxydases à cuivre

Les CuAO sont des homodimers d'environ 70-90 kDa par sous-unité, qui se différencient des FAD-AO par la présence d'au moins un ion de cuivre et d'une quinone (2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone (TPQ) ou lysine tyrosylquinone (LTQ)) au site actif de l'enzyme à la place du FAD (Cai et Klinman, 1994; Dove et al., 1996).

Plusieurs études ont été effectuées sur la structure des CuOA provenant de diverses sources, tel: *Escherichia coli* (ECAO), *Arthrobacter globiformis*, *Aspergillus nidulans*, les petits pois et le sérum bovin (Parson et al., 1995; Kim et al., 2002; Mc Grath et al., 2011; Kumar et al., 1996; Lunelli et al., 2005). La diamine oxydase d'origine humaine a été aussi abordée à l'aide des ADN recombinants exprimés dans les cellules S2 de drosophile (Mc Grath et al., 2010). Toutes les CuAO sont des homodimères composés de sous-unités d'environ 700 résidus dont la structure s'apparente à celle de l'amine oxydase *E. coli* (Figure 1.1) (Parson et al., 1995). 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 seulement présent dans quatre espèces bactériennes dont *E. coli* (Guss et al., 2009). Les trois autres domaines sont assemblés de manière semblante à la partie supérieure d'un champignon (Figure 1.1). Le domaine D4, est composé de feuillets 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 dimer 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 (Parson et al., 1995).

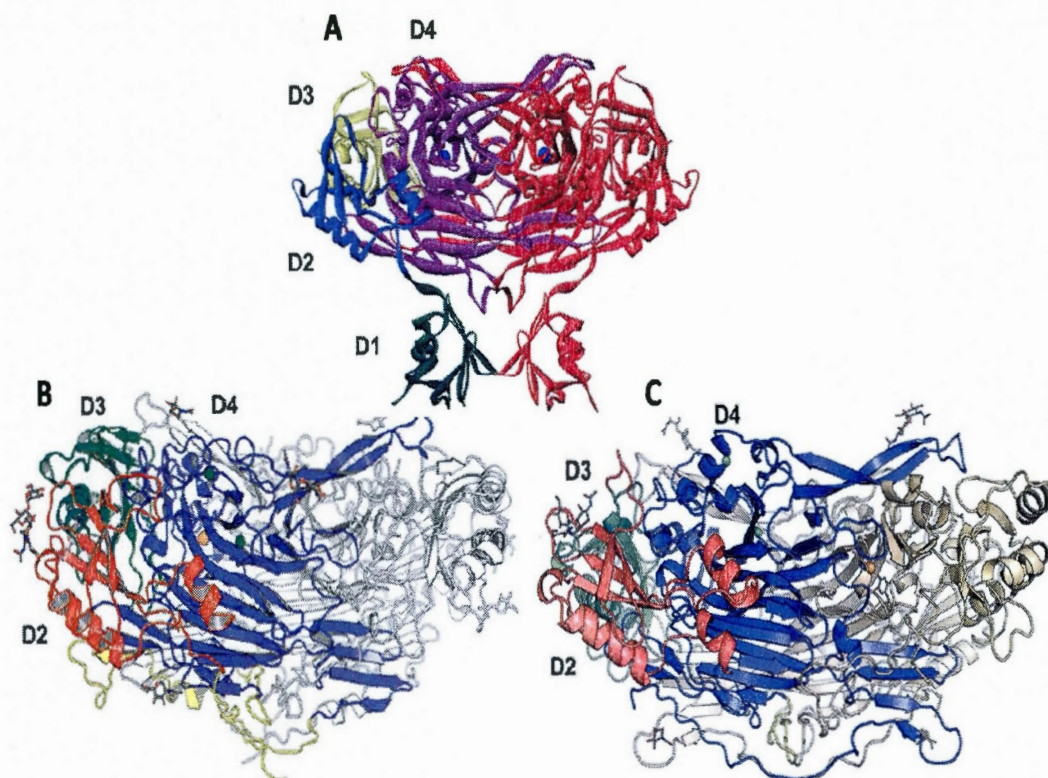
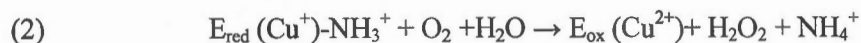
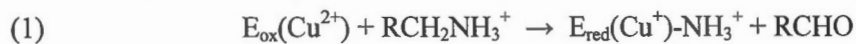


Figure 1.1 Structures des amines oxydase à cuivre provenant d'*Escherichia coli* (A) (Brazeau et al., 2004), d'*Aspergillus nidulans* (B) (McGrath et al., 2011) et de l'humain (C) (McGrath et al., 2010). Pour ECAO, une sous unité est colorée en rouge et l'autre colorée par ses domaines D1 (vert), D2 (bleu), D3 (jaune) et D4 (violet). Les sous-unités en (B) et (C) sont colorées selon les domaines; D2 (rouge), D3 (vert) et D4 (bleu).

1.1.2 Mécanisme catalytique des amines oxydase à cuivre

La catalyse exercée par des CuAO est un mécanisme de type « ping-pong » qui comprend :

- (1) Déamination oxydative avec la libération de l'aldéhyde et réduction du cuivre ($\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^+$) de l'enzyme ainsi que (2) la réoxydation de l'enzyme réduite à l'aide de l'oxygène avec la libération de NH_3 et H_2O_2 .



L'étape initiale de la réaction de réduction de l'enzyme débute par une attaque nucléophile sur le carbone C5 de la quinone TPQ oxydée par une amine primaire (Figure 1.2 A). La liaison covalente entre les deux molécules produit un intermédiaire de type base de Schiff (Fig 1.2 B). Ensuite, un résidu d'aspartate extrait un proton du carbone C1 du substrat, ce qui produit une seconde base de Schiff (Fig 1.2 D) au moyen d'un intermédiaire carbanion (Fig 1.2 C). L'hydrolyse de la base de Schiff libère l'aldéhyde, laissant la TPQ sous une forme d'aminoquinol réduite (Fig 1.2 E) et mettant fin à la réaction réductrice. En solution, l'intermédiaire aminoquinol/ Cu^{2+} (Fig 1.2 E) existe en équilibre avec l'intermédiaire semiquinone/ Cu^+ (Fig 1.2 F). La réaction de réoxydation de l'enzyme suit avec la réduction d'une molécule d'oxygène pour générer une iminoquinone (Fig 1.2 G) oxydée et du peroxyde d'hydrogène. Pour finir, l'hydrolyse de l'iminoquinone produit la TPQ (Fig 1.2 A) oxydée en libérant un ion ammonium. Dans une situation où la concentration de substrat est élevée, on suppose que l'iminoquinone réagit avec une autre amine primaire pour produire directement une base de Schiff (B).

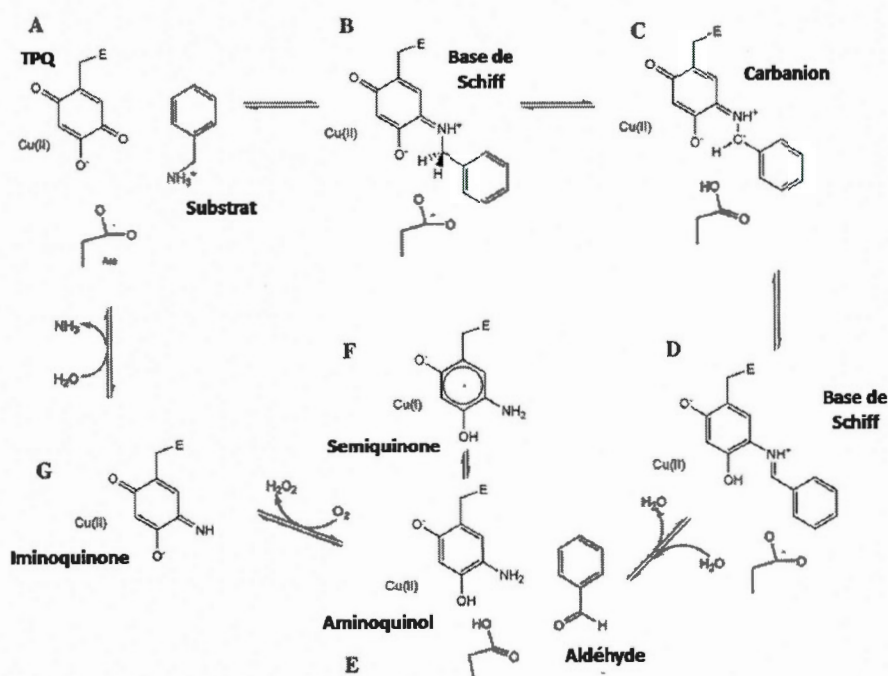


Figure 1.2. Schéma du mécanisme catalytique des CuAO TPQ (2,4,5-trihydroxyphénylalanine quinone, le cofacteur de la DAO) avec la bezylamine comme substrat (d'après Brazeau et al., 2004).

Les CuAO réagissent avec une grande variété d'amines primaires. Indépendamment de la source, la préférence d'un substrat à un autre varie beaucoup. 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 Les amines oxydases à cuivre et leur action sur les amines biogènes

Par le passé, 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 étaient exercées pour la même classe d'enzyme,

cette classification a été remplacée par : l'amine oxydase des amines primaires *EC 1.4.3.2* et la diamine oxydase *EC 1.4.3.22*. La sous classe d'amine oxydase des amines primaires représente un groupe de CuAO qui oxyde les monoamines primaires mais, ont une faible affinité pour les diamines comme la putrescine, cadaverine, spermidine et l'histamine ou les amines secondaires et tertiaires. Elles se différencient des amines oxydases à flavine adénine dinucléotide (*EC 1.4.3.4*), car les AO à cuivre sont sensibles à l'inhibition des fonctions carbonyles par la semicarbazide. De plus, l'enzyme possède une homologie proche de la protéines d'adhésion-vasculaire (VAP-1) et est généralement trouvée dans le sérum, l'endothélium, et le muscle lisse des mammifères (Stolen et al., 2004).

La diamine oxydase (DAO; *EC 1.4.3.22*), aussi connue sous le nom d'histaminase (Mondovi et al., 1964) dû à son rôle dans le catabolisme de l'histamine (Figure 1.3), oxyde les diamines ainsi que les monoamines primaire et les polyamines. Elle s'apparente aux amines oxydases des amines primaires par sa sensibilité à l'inhibition en présence de la semicarbazide. La DAO est une enzyme présente dans les organismes comme les champignons, les bactéries, les plantes et les mammifères (Cooper et al., 1992; McGuirl et al., 1994; Mondovi et al., 1967).

1.2.1 La diamine oxydase et le métabolisme de l'histamine

Les propriétés thérapeutiques de la diamine oxydase sont liées à son rôle dans le catabolisme de l'histamine. En effet, l'histamine (2-(4-imidazolyl)-éthylamine) 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 1.3). 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-allergènes) qui

participent à la dégranulation des vésicules et à sa libération (Vlieg-Boestra et al., 2005). L'histamine est aussi produite par les lymphocytes T helper de type 2 (Th2) et les cellules dendritiques et agit par un mécanisme autocrine et paracrine sur la différenciation de ces cellules immunocompétentes 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 ainsi qu'un effet inhibiteur sur le recrutement des neutrophiles (Ohtsu et Watanabe, 2003). L'histamine est impliquée dans les fonctions neurologiques (Hu et Chen, 2012), les fonctions gastriques (Coruzzi et al., 2001), la cicatrisation (Li et al., 2007) et l'inflammation de la muqueuse intestinale (Smolinska et al., 2013). Les effets de l'histamine sont contrôlés par quatre récepteurs (H1-H4) présents sur la surface d'une multitude de cellules, entre autres sur les cellules épithéliales, musculaires, endothéliales 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, entre autre, une vasodilatation et une extravasation des protéines plasmatiques, une bronchoconstriction, une hypersécrétion de mucus et une stimulation des terminaisons nerveuses sensibles. Donc, l'activation du récepteur H1 peut 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, sur le cerveau, 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 al., 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 les fonctions proinflammatoires induites par la production d'IL-16 des lymphocytes T CD8 (Gantner et al., 2002) ainsi que les fonctions anti-inflammatoires induites par la production d'IL-10 des monocytes (Takeshita et al., 2003; Dunford et al., 2006).

Le métabolisme de l'histamine est présenté dans la figure 1.3. Tout d'abord, l'histamine est synthétisée par la décarboxylation de l'histidine en présence de l'histidine décarboxylase. Ensuite, l'histamine 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, côlon et rein. Donc, l'histamine extracellulaire est dégradée par la DAO alors que 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.

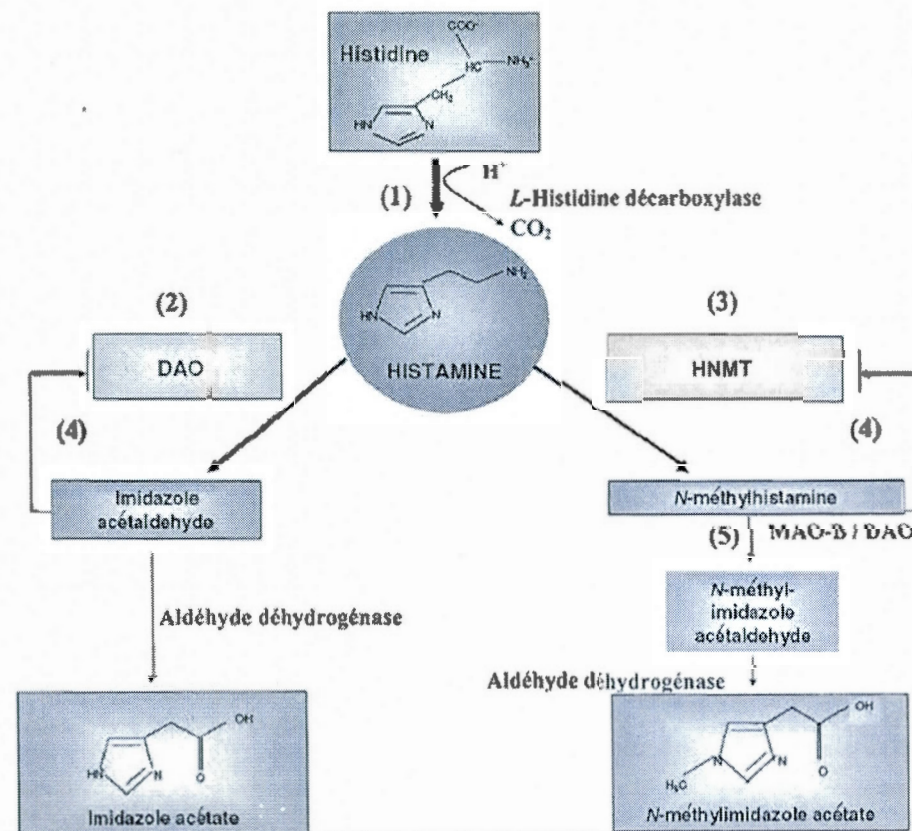


Figure 1.3 Métabolisme de l’histamine DAO : Diamine oxydase; MAO-B : monoamine oxydase B; HNMT : Histamine N-méthyltransférase (d’après Mainz et al., 2007)

1.2.2 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 DAO pourrait donc être impliquée comme agent antihistaminique pour les réactions allergiques et pseudo-allergiques. De plus, l’activité de la DAO n’est pas directement contrôlée par l’histamine endogène sécrétée. Ainsi, l’activité de la DAO 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, ou intolérance alimentaire, résulte d'une augmentation de la disponibilité de l'histamine au niveau de l'intestin due à des facteurs exogènes, comme une alimentation riche en histamine. De plus, une trop faible dégradation enzymatique de l'histamine pourrait être due à une déficience de la DAO. Les symptômes varient beaucoup, mais ils incluent des maux de tête, malaises gastro-intestinaux (colique, flatulence, diarrhée) et, dans des cas extrêmes, des crises d'asthme (Maintz et al., 2007). Il existe, sur le marché, une DAO d'origine animale (rein de porc) présentement commercialisée sous la forme de 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, toutefois une diminution des signes a été observée chez les patients qui ont consommé des capsules de DAO (DAOSin[®] ou Histame[®]) lors de l'étude (Komericki et al., 2011).

1.2.3 La diamine oxydase comme agent anti-inflammatoire

L'asthme allergique est une maladie respiratoire majeure dont l'incidence augmente 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 de bronchospasme, deux éléments clés de l'asthme allergique (Page et al., 2001). Masini et collaborateurs (2004) ont effectué une étude sur les effets de la DAO sur des cobayes dont une réaction similaire à l'asthme allergique a été induite. La DAO libre ou immobilisée sur BrCN-Sepharose (Federico et al., 2000) a été administrée par voie intrapéritoneale. Un pré-traitement par DAO par voie intrapéritoneale 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 et a réduit les lésions au tissu pulmonaire causées par l'inflammation (Masini et al., 2004).

1.3 Les amine oxydases cuivriques d'origine animale

Chez les mammifères, trois types d'amine oxydase à cuivre ont été identifiées comme appartenant aux classifications *EC 1.4.3.21* et *1.4.3.22* (Buffoni, 2009). Le premier type, l'oxydase des amines primaire, est une enzyme qui oxyde les monoamines primaires, mais qui a peu d'activité pour les diamines, les amines secondaires et tertiaires. Elle est sensible à l'inhibition par les réactifs des groupes carbonyle comme le semicarbazide et possède un segment transmembranaire (Yu et al., 2003). Le deuxième est une CuAO soluble que l'on retrouve dans le plasma sanguin (Morris et al., 1997). Cette enzyme, la sérum amine oxydase ou benzylamine oxydase, catalyse l'oxydation d'une grande variété de monoamines, diamines et amines aromatiques et est probablement synthétisée dans le foie (Mu et al., 1994). La dernière classe correspond à la 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 DAO dans le plasma augmente durant la grossesse ou sous des conditions pathologiques comme différents types de cancer (Agostinelli et al., 2010) ou les maladies inflammatoires de l'intestin (Fogel et Lewinski, 2006).

1.4 La diamine oxydase végétale

La DAO (EC 1.4.3.22) peut aussi 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 dicotylédons des légumineuses (Scoccianti et al., 1990). La putrescine, une diamine aliphatique, est dégradée par l'enzyme et produit le 4-aminobutanal qui peut être transformée en acide gamma-aminobutyrique (GABA) en présence d'une aldéhyde déshydrogénase. Le GABA est un composé impliqué dans plusieurs processus physiologiques tel que la régulation du pH cytosolique, la protection contre le stress oxydatif et la signalisation, intervenant 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 réaction, joue un rôle important dans la mort cellulaire, ainsi que dans le développement et 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 amines oxydases, ainsi que la DAO, contribuent donc à des processus physiologiques importants chez les plantes à travers leurs produits de réaction. Une étude comparative sur la spécificité des substrats pour les DAO végétales purifiées à partir de *Lathyrus cicera*, *Pisum sativum* ainsi que celle provenant du sérum bovin a montré une activité similaire pour les mêmes substrats chez les enzymes végétales. De plus, ces enzymes 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.

CHAPITRE II

LES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) sont des maladies chroniques, principalement représentées par la colite ulcéreuse (C.U) et la maladie de Crohn (MC), touchant totalement ou partiellement le tube digestif. Les MII sont complexes et présentent plusieurs facteurs. Des études épidémiologiques (Figure 2.1) ont montré une incidence élevée de MII en Amérique du nord (Bernstein et al., 2006), au nord de l'Europe (Vind et al., 2006) et en Angleterre (Rubin et al., 2000). De plus, une émergence des MII a été observée pour les pays en voie d'occidentalisation telle que, le Japon, Singapour et la Corée du Sud (Thia et al., 2006) ce qui mène à croire qu'un facteur environnemental serait impliqué. Une étude d'association pangénomique a confirmé l'existence d'au moins 99 loci génétiques susceptibles d'être associés aux MII, dont 28 sont partagés entre la MC et la C.U (Franke et al., 2010; Anderson et al., 2011). Par exemple, le gène NOD2 active les protéines MAP-kinase p38 et le facteur de transcription NF- κ B causant une réponse pro-inflammatoire et une augmentation de l'autophagie. Une mutation sur ce gène entraîne une diminution de l'expression des protéines et des facteurs pro-inflammatoires (Ogura et al., 2001). La possibilité que les MII soient causées par des agents infectieux demeure une hypothèse plausible malgré un certain manque de preuves. Toutefois, l'hypothèse que les MII soient le résultat d'une réponse immunitaire contre la flore commensale intestinale semble être plus probable puisqu'une dysbiose intestinale, déséquilibre de la microflore

intestinale, est observée chez des patients souffrant de MII (Ianitti et Palmieri, 2010). Une étude sur un modèle animal a montré que les souris ne développent pas de maladie dans un environnement dépourvu de germes et, pour la plupart des cas, il y a amélioration de la maladie lorsque les souris sont traitées aux antibiotiques qui agissent sur certaines classes de micro-organismes au niveau de la muqueuse intestinale (Strober et al., 2002). De plus une augmentation du nombre de bactéries sur la muqueuse intestinale a été constatée chez les patients atteints de la MC, avec des lésions au niveau des segments de l'intestin où la concentration de bactéries est la plus élevée comme la valvule iléo-caecale et le colon. Donc, la perte de tolérance envers la flore microbienne intestinale entraîne une réponse immunitaire d'inflammation chronique inappropriée qui semble à l'origine des MII (Duchmann et al., 1995; Fiocchi et al., 2005). L'inflammation est médiée par une réponse immunitaire contre des agents pathogènes ou contre la flore microbienne et le type de réponse constitue un facteur lié à la pathogénèse des MII. Ces études génétiques et épidémiologiques suggèrent qu'une prédisposition génétique, des facteurs environnementaux, la flore commensale et des réponses immunitaires sont des facteurs impliqués dans la pathogénèse des MII (Fiocchi, 2005; Scaldaferrri et Fiocchi, 2007; Franke et al., 2010).

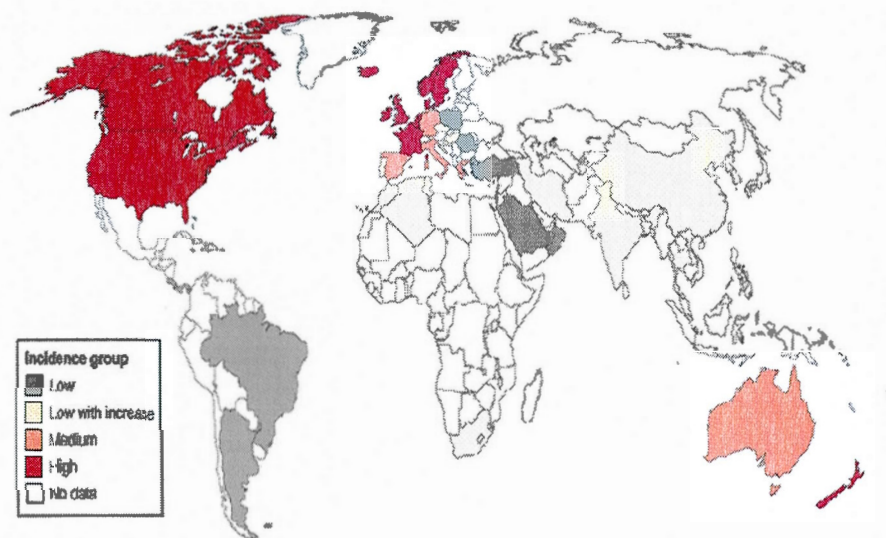


Figure 2.1 La distribution des MII. Les pays sont classés selon l'incidence annuelle: élevée en rouge; moyenne en orange; faible avec croissance en jaune; faible incidence en vert; en absence de donnée la coloration est blanche (*d'après Cosnes et al., 2011*)

Le traitement des MII repose sur des médicaments anti-inflammatoires pour réduire l'inflammation anormale du colon afin de contrôler les symptômes et de maintenir la rémission induite si échéant. Les options médicales sont centrées sur les 5-aminosalicylates (5-ASA; mésalazine, sulfasalazine, olsalazine) pour des patients présentant des symptômes d'intensité moyennes ou légères (Carter et al., 2004; Kornbluth et al., 2004). Les 5-ASA sont plus efficaces pour la C.U que pour la MC et peuvent être combinées aux probiotiques afin de renforcer la flore intestinale. Les corticostéroïdes comme la prednisone ou le budénoside, peuvent être utilisés comme traitement pour les cas de colite modérée ou grave. Ils sont généralement administrés sous forme orale (prednisone) ou topique (budénoside) par voie rectale (énéma) et peuvent présenter des effets secondaires tel que l'hypertension artérielle, la prise de poids et des troubles psychiques. Ceci les rend utiles pour l'induction d'une rémission, mais dangereux si utilisés à long terme. L'utilisation d'anticorps,

médicaments biologiques, constitue une autre option dans le traitement de la colite ulcéreuse. Ils ont pour but d'agir de façon sélective sur des molécules impliqués dans le processus inflammatoire. Par exemple, l'infliximab et l'adalimumab ciblent et se lient au facteur de nécrose TNF- α , une cytokine capable d'induire une réponse inflammatoire par l'activation de NF- κ B (Guo et al., 2013). Toutefois, ces approches peuvent rendre le patient à risque d'infections, donc des recherches sur des anticorps dirigés contre l'intégrine α 4 β 7, comme le vedolizumab, sont en cours (Feagan et al., 2013). Finalement, des agents immunosuppresseurs tel que la cyclosporine sont utilisés pour réduire la dépendance aux corticostéroïdes (Pannacione et al., 2008).

Malgré leurs ressemblances, la MC et la C.U se distinguent à quelques niveaux tel que l'étendue de l'inflammation, les individus à risque ainsi que les voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire. Il est donc important de faire la différence entre les deux maladies.

2.1 La colite ulcéreuse

La C.U est une maladie impliquant le rectum et le colon. Elle débute généralement dans la région du rectum, puis s'étend de manière continue le long du colon. La section touchée est enflammée, ulcérée et des lésions généralement diffuses et superficielles sont observées, ne touchant que la muqueuse interne du colon. Bien que la C.U se limite uniquement au colon, l'inflammation peut toucher quelques centimètres de l'iléon chez les patients atteints de pancolite. Toutefois, les lésions à ce niveau demeurent superficielles et ne présentent pas d'ulcérations (Moum et al., 1999). La C.U, contrairement à la MC, touche légèrement plus les hommes (60% des cas dans les zone de fortes incidences). Également dans les zones à faible incidences des MII le pourcentage d'hommes atteints est nettement supérieur (Cosnes et al., 2011). Les premiers symptômes impliquent des selles liquides accompagnées de sang. Ensuite, des douleurs abdominales s'apparent à des crampes et des diarrhées

soudaines, saignements au niveau du rectum (Talley et al., 2013) et ténésmes (des tensions douloureuses au niveau de l'anus). Une perte d'appétit et de poids, avec de la fatigue sont aussi des symptômes communs associés. De plus, chez les enfants atteints de C.U, un retard du processus de croissance peut être observé (Hanauer, 1996). L'évolution de la maladie se produit par poussées en alternance avec des périodes de rémissions. Les complications reliées incluent des abcès au niveau de l'intestin, des polypes et la colectasie: une dilatation partielle ou totale et un amincissement de la paroi du colon. Les patients atteints de C.U sont 2 à 3 fois plus à risque de développer le cancer colorectal que les individus sains (Bernstein et al., 2001). La sévérité des crises et leurs réponses aux traitements sont imprévisibles et peuvent varier entre des symptômes mineurs et majeurs comme une colite nécessitant une colectomie. Il est possible d'atteindre une rémission avec cicatrisation de la muqueuse et une absence d'ulcères et d'érosions sur la muqueuse (Dave et Loftus, 2012). Après une rémission avec cicatrisations observée par endoscopie, il y a diminution de risque de rechute chez les patients atteint de MII (Neurath, 2014). La pathogénicité de la C.U est associée à une réponse Th2 atypique par les cellules NK (Fuss et al., 2004). La réponse est atypique car la production des cytokines comme l'interleukine IL-3, IL-5 et TNF- α augmentent, mais l'IL-4, cytokine impliquée dans la différenciation des cellules Th2, n'augmente pas (Strober et Fuss, 2011).

2.2 La maladie de Crohn

La MC implique l'ensemble du tractus gastro-intestinal allant de la bouche jusqu'à l'anus, mais débute généralement au niveau de l'iléon terminal. Elle peut débuter dans n'importe quelle section et peut s'étendre de manière continue ou discontinue. L'inflammation peut toucher la muqueuse interne et s'étendre à travers la paroi intestinale; se manifestant par des sténoses ou fistules intestinales. La MC est classée de légère à grave dépendant de l'âge du patient lors du diagnostique, la localisation de

l'inflammation et l'étendu de la maladie (Silverberg et al., 2005). Cette maladie touche plus les femmes (au moins 20 % - 30 % plus que les hommes) dans les zones à fortes incidences, mais mondialement, l'incidence chez les hommes et chez les femmes semblent s'égaliser (Cosnes et al., 2011). Les symptômes de la MC varient en fonction de la partie intestinale touchée. On observe notamment, des diarrhées persistantes, des crampes abdominales, une fièvre et dans certains cas, un saignement anal. Une perte d'appétit engendrant une perte de poids et de la fatigue peuvent aussi être observées. Une différence entre la C.U et la MC, est que les symptômes ne sont pas seulement limités au tube digestifs, de telle sorte que certains patients souffrant de MC peuvent ressentir des douleurs aux jointures, os, yeux et foie. Les enfants atteints peuvent souffrir d'ostéoporose qui, comme pour la colite, peut compromettre leur croissance (Thearle et al., 2000). L'évolution de la maladie se produit par poussées en alternance avec des périodes de rémissions plus ou moins longues mais sans une vraie guérison. Les complications engendrées impliquent des abcès et fistules au niveau de l'anus qui peut sécréter du mucus ou pus lors de complications majeures ainsi qu'un risque élevé de développer le cancer colorectal. Des rémissions avec cicatrisation au niveau des muqueuses sont aussi observables chez les patients souffrant de la MC. La MC est associé à une réponse de type lymphocyte T helper 1 (Th1) et T helper 17 (Th17). Les cytokines impliqués sont les interleukines IL-12 (Th1), IL-17 et IL-23 (Th17) et l'interféron gamma (Strober et Fuss, 2011).

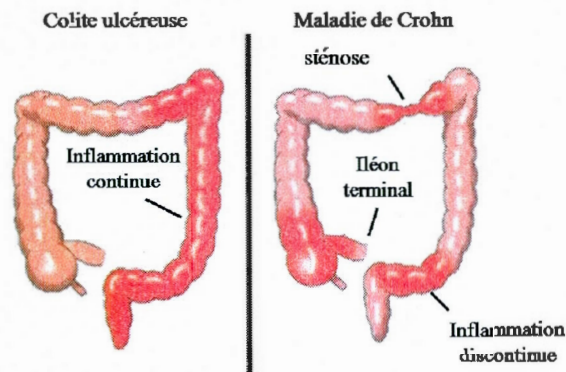


Figure 2.2 Zone d'inflammation de la colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn (d'après <http://medchrome.com/basic-science/pathology/crohns-disease-vs-ulcerative-colitis-ibd/>)

2.3 L'histamine et les maladies du colon enflammé

Depuis les dernières décennies, une forte attention a été portée sur le rôle des mastocytes dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire des maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, le nombre de mastocytes présents chez les patients atteints de C.U est plus élevé que pour le groupe témoin et les patients souffrant de MC. De plus chez un individu, les tissus enflammés ont un plus grand nombre de mastocytes que les tissus normaux (Nolte et al., 1990). Pour ce qu'il est de l'histamine, la quantité retrouvée ainsi que le taux de sécrétion sont augmentés de manière significative particulièrement dans les muqueuses enflammées par les MII en comparaison avec un tissu en santé (Raithel et al., 1995). De plus, le métabolisme de l'histamine est aussi modifié, car une diminution de l'expression du gène codant pour l'histamine-N-méthyltransférase ainsi qu'un polymorphisme de nucléotides du gène de la DAO ont été identifiés chez les sujets atteints de MII (Garcia-Martin et al., 2006; Schulze et al., 2008). Malgré tout, les rôles pathogènes ou protecteurs de l'histamine en fonction de ses différents récepteurs n'ont toujours pas été officiellement validés par des organisations réglementaires. Une étude récente a montré que l'utilisation d'antagonistes du récepteur H₂ (cimétidine ou ranitidine) augmente de manière significative les risques d'hospitalisation et de chirurgie pour

les patients souffrant de MII ce qui permet de supposer que l'histamine à l'aide du récepteur H2 pourrait avoir un effet protecteur pour la muqueuse des patients (Juillerat et al., 2012). Toutefois, les effets des antagonistes du récepteur H2 chez l'homme ne concordent pas avec ceux observés sur le rat. En effet, une protection de la muqueuse intestinale a été observée après une administration journalière de lafutidine, un antagoniste du récepteur H2, sur des rats dont la C.U a été induite par le sulfate de dextran. Sur ce même modèle, la cimétidine n'a eu aucun effet (Okayama et al., 2004). En contrepartie, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs H1 tels que le kétotifène et la loratadine n'ont pas exercé d'effets négatifs (Jones et al., 1998; Raithel et al., 2010). Cependant, ces études ont besoin d'être continuées sur des plus grandes populations pour être validées.

2.4 La diamine oxydase et les maladies du colon enflammé

Chez les patients souffrant de MII, les changements de la muqueuse intestinale sont reliés à ceux de l'activité de la DAO et de la quantité d'histamine, de telle sorte qu'une augmentation des concentrations de l'histamine et une diminution en activité de la DAO, possiblement due au polymorphisme du gène codant pour la DAO, ont été remarquées au niveau de la muqueuse intestinale et dans le sérum des patients atteints de la colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn. Il est possible de suggérer que l'activité réduite de la DAO soit un indicateur potentiel sur des possibles modifications au niveau de la muqueuse intestinale lors des MII. En effet, l'activité de la DAO dans le sérum de patients souffrant de MII est inférieure comparativement au tissu normal (Honzawa et al., 2011).

La possibilité d'un traitement antihistaminique contre les MII ouvre la porte vers une thérapie impliquant la DAO. Menningen et collaborateurs (1990) ont constaté une augmentation de l'activité de la DAO chez les patients en rémission d'une C.U et une diminution de DAO chez les patients lors de l'inflammation du côlon. De plus,

l'administration intrapéritonéale de DAO de manière journalière a généré une diminution de l'inflammation au niveau du côlon de rats dont la C.U a été induite par une administration intrarectale d'acide acétique 4 % (Fogel et al., 2006). Un concept basé sur l'administration orale de DAO végétale associée à la catalase pour traitement antihistaminique des allergies, des MC et de la C.U a été récemment proposé (Mateescu et al., 2012). Le traitement consiste à diminuer l'histamine au niveau du tractus intestinal. Les produits générés sont l'imidazole acétaldéhyde et l'ammoniac (NH_3) par la déamination oxydative de l'histamine ainsi que du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La catalase, une enzyme antioxydante, catalyse la décomposition des deux molécules de H_2O_2 en H_2O et O_2 . Les bienfaits potentiels de l'association de la DAO et de la catalase seraient la prévention de stress oxydatif par H_2O_2 au niveau du tractus intestinal et la production d'oxygène supplémentaire (par la catalase) qui peut servir de substrat pour la DAO et favoriser l'oxydation de l'histamine.

Des transporteurs de cations organiques (OCT) sont situés aux jonctions des cellules intestinales. Ils contribuent au transport de l'histamine de la lumière intestinale à la circulation et de la circulation à la lumière intestinale (figure 2.2) (Aschenbach et al., 2009). Le traitement par voie orale avec de la DAO en association à la catalase pourra diminuer la réabsorption de l'histamine dans la circulation en favorisant aussi sa bio-élimination (de la circulation vers la lumière intestinale).

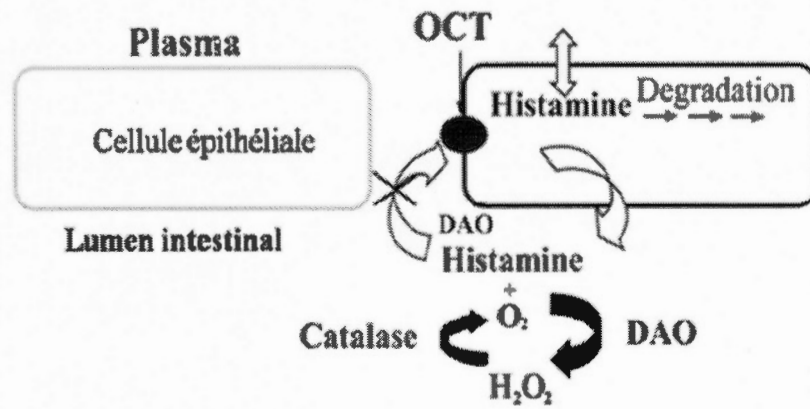


Figure 2.3 Modèle représentant élimination intestinale de l'histamine (*d'après Mondovi et al., 2013*)

CHAPITRE III

EXCIPIENTS POLYCARBOXYLIQUES POUR LA LIVRAISON D'AGENT BIOACTIF AU NIVEAU INTESTINAL

De la multitude d'excipients pharmaceutiques utilisés pour différents types de formulations, dans ce mémoire, seront traités seulement les excipients polymériques 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; Mateescu et al., 2012b). Les excipients de ce type peuvent être d'origine synthétique (dérivés d'acide acryliques comme le polyacrylate de méthyle connu sous le nom commercial d'Eudragit®) ou d'origine naturelle comme l'acide poly(lactique-glycolique), le carboxymethylcellulose et l'alginate. Le carboxymethylamidon également d'origine naturelle et modifié chimiquement par réticulation et carboxymethylation est utilisé comme agent désintégrant (Primojel® et Explotab®) (Edge et al., 2002). Depuis 2004, dans une forme modifiée (sans réticulation) il a été proposé pour différents systèmes de libération contrôlée d'agents bioactifs (Mulhbacher et al., 2004; Calinescu et al., 2005 et 2010; Lemieux et al., 2010; Friciu et al., 2013).

3.1. L'amidon et ses dérivés polycarboxyliques

L'amidon est un polysaccharide semi-cristallin d'origine végétale retrouvé dans les graines, les racines, les tubercules et les rhizomes des plantes. Il est la principale réserve glucidique chez les plantes. L'amidon industriel retrouvé sur le marché

provient généralement du maïs ou de la pomme de terre. Ce polysaccharide est composé d'une association de deux polymères: l'amylopectine et l'amylose. L'amylopectine, le composant majeur de l'amidon, a une structure hautement ramifiée qui est constituée d'unités D-glucose agencées en chaînes entrelacées par des liaisons 1,4- α -glycosidiques et 1,6- α -glycosidiques. L'amylose est un polysaccharide nonramifié formé de longues chaînes de D-glucose jointes par des liaisons α -1,4-glycosidiques (Alger et al., 1997). L'amidon est largement utilisé dans l'industrie alimentaire dû à son faible coût et à ses propriétés fonctionnelles. Par exemple, l'amidon à haute teneur en amylose est utilisé pour remplacer la gélatine, un autre agent gélifiant, dans la fabrication de confiseries (Lacourse et al., 1988). Du côté pharmaceutique, la compagnie Labopharm a produit le Contramid® (présentement distribué par Altus Formulation), un amidon riche en amylose, réticulé, comme matrice pour la libération contrôlée des médicaments (Lenaerts et al., 1991; Mateescu et al., 1994). Un faible taux de réticulation de l'excipient permettant une bonne flexibilité des chaînes et une forte association par liaisons d'hydrogène le rend idéal 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' α -amylase (Dumoulin et al., 1999). Présente dans les comprimés, en milieu de dissolution l' α -amylase hydrolyse les liaisons 1,4- α -glycosidiques de l'amidon ce qui peut moduler le temps de libération du principe actif. L'amidon peut être chimiquement, physiquement ou enzymatiquement modifié afin d'améliorer ses fonctions. Les modifications physiques mènent généralement à la gélatinisation tandis que les modifications chimiques conduisent à différents dérivés. Par exemple le carboxyméthylamidon ou le succinylamidon offre une gastroprotection. Ainsi leur utilisation est possible pour la formulation des enzymes pancréatiques (Massicotte et al., 2008).

Le carboxyméthylamidon

Le carboxyméthylamidon (CMA) est un polymère anionique dérivé de l'amidon. Sa synthèse implique une substitution de groupements hydroxyles de l'amidon avec l'agent de substitution, l'acide monochloracétique (ou le sodium chloracétate), en présence de l'hydroxyde de sodium (Sloan et al., 1962). Ainsi, des groupements carboxyliques peuvent être introduits sur l'amidon par étherification (Figure 3.1). Le degré de substitution (DS) du CMA équivaut au nombre de groupements carboxyméthyl par unité de glucose. Il varie entre zéro et trois, car chaque unité de glucose ne possède que trois groupes hydroxyles : un primaire et deux secondaires (Tijssen et al., 2001). Le DS peut être évalué par plusieurs méthodes qui sont plus ou moins précises, tels que le titrage direct ou le titrage de retour (Stojanovic et al., 2005). Récemment, une nouvelle méthode de dosage du DS par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) semble plus précise et efficace (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; Heinz et al., 2004; Lemieux et al, 2009; Liu et al, 2012). En effet, un DS inférieur à 0,3 ainsi qu'un faible rendement ont été observés pour le CMA synthétisé dans un milieu aqueux (Volkert et al., 2004). En contrepartie, un DS de 1,74 et un bon rendement ont été obtenus pour une synthèse dans un milieu non aqueux (Lemieux et al., 2009). Il y a donc un lien entre le rendement, le DS et le milieu de réaction. En effet, on obtient du CMS possédant un DS plus élevé lorsque la carboxymethylation de l'amidon se produit dans le solvant organique (méthanol, éthanol, isopropylalcool) en présence d'une très petite quantité d'eau. L'importance du DS pour différentes applications du CMA est généralement due à son influence sur ses propriétés physiques et sur sa capacité d'agir comme excipient pour la libération d'agents actifs dans différents milieux (gastrique et intestinal). En général, plus le DS est élevé, plus longue sera la libération de l'agent actif (Lemieux et al., 2009).

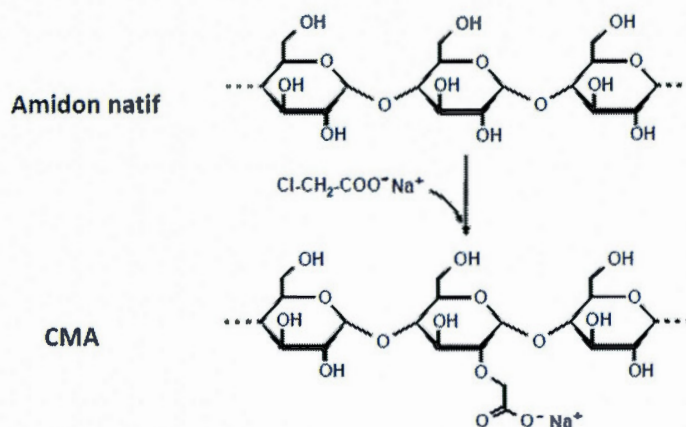


Figure 3.1 Schéma de la synthèse du carboxyméthylamidon

Applications pharmaceutiques

Parmi les dérivés d'amidon, le carboxyméthylamidon est très utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Des travaux récents ont proposé le CMA sous une forme réticulée (Mulhbacher et al., 2001) et non réticulée (Mulhbacher et al., 2004; Calinescu et al., 2005) comme excipients pour la libération contrôlée de médicaments. De plus, son efficacité a été montrée pour la libération de petites molécules ou d'agents bioactifs (Mulhbacher et al., 2004; Lemieux et al., 2010; Friciu et al., 2013) et de microorganismes (Calinescu et al., 2005; Calinescu et Mateescu, 2010). Sous forme de comprimés, le CMA offre une protection des agents actifs dans le milieu gastrique acide grâce à la protonation des groupements carboxyliques, ce qui provoque un compactage de la matrice et limite la pénétration du fluide gastrique (acidité) dans le comprimé. Au niveau intestinal, il y a déprotonation et ionisation des groupements carboxyliques par l'échange des protons pour des cations. Le comprimé s'hydrate et un gonflement est observé dans le milieu intestinal simulé contenant de la pancréatine suivi de l'érosion du CMA dépendante de l' α -amylase (présente dans la pancréatine) et du degré de substitution du CMA. L'agent actif est ainsi libéré dans l'intestin.

En dépit des propriétés adéquates du CMA pour la libération d'agents actifs au niveau de l'intestin, il n'est pas l'excipient idéal pour une libération ciblée vers l'intestin gros, car il peut être solubilisé dans l'intestin avant d'arriver dans le côlon. Afin de pallier cet inconvénient, 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 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 (charge négative) et du chitosane (charge positive) offre une stabilité mutuelle des polymères grâce aux interactions ioniques qui assurent une double protection face à l'acidité pour les principes actifs sensible 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 (figure 3.2) (Assaad et al., 2011).

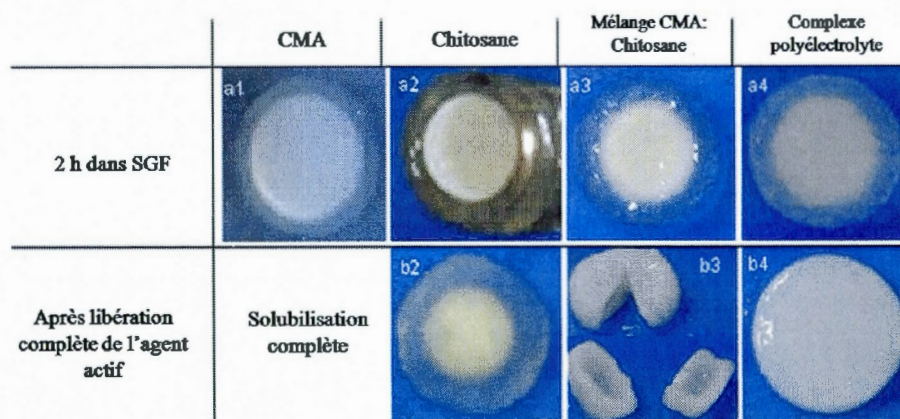


Figure 3.2 Photo de comprimés de CMA, chitosane, mélange 50% CMA : 50% Chitosane et le complexe polyélectrolyte durant différents tests de dissolutions (d'après Assaad et al., 2011).

3.2 L'alginate

3.2.1 La structure de l'alginate

L'alginate est un polysaccharide polycarboxylique hydrosoluble naturel produit par les algues de la classe *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 comme *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* et *Macrocystis pyrifera* et est principalement commercialisé sous la forme d'alginate de sodium. Il peut aussi être isolé à partir des bactéries *Azotobacter vinelandii* et plusieurs espèces de *Pseudomonas* (Schurks et al., 2002). L'alginate forme un sel soluble qui peut précipiter en présence d'alcool. La structure de l'alginate est celle d'un polymère carboxylique non-ramifié composé de blocs à base de résidus d'acide β -D-mannuronique (mannuronate; M) et d'acide α -L-guluronique (guluronate; G) dans une séquence intercalée tout le long de la chaîne. La géométrie des liaisons M-M, M-G et G-G est différente en raison de la forme des monomères et de leurs modes de liaison. Plus précisément, les liaisons G-G sont en forme de « boucle » tandis que les liaisons M-M sont plus étendues (figure 3.2). La forme de la chaîne au niveau des régions G-G donne une conformation idéale pour la liaison des cations Ca^{2+} (Haug et al., 1967). L'arrangement des séquences des blocs M et G ainsi que le poids moléculaire déterminent les propriétés physiques et chimiques de l'alginate et le ratio entre M/G ont un effet sur l'élasticité du gel de l'alginate. Par exemple, pour des microsphères d'alginate, un faible gonflement et une haute porosité sont les caractéristiques de l'alginate riche en guluronate alors qu'une meilleure élasticité, une faible porosité et une désintégration plus rapide par gonflement ont été observé pour l'alginate riche en mannuronate (Simpson et al., 2003).

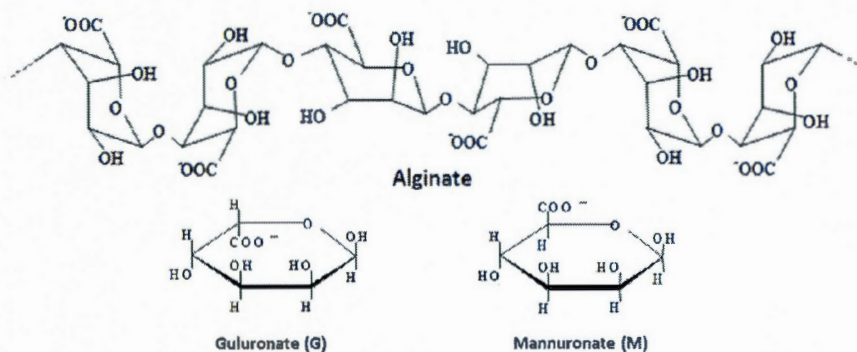


Figure 3.3 Structure partielle de l'alginate arrangée dans une séquence intercalée (...GGMMGG...) de guluronate et mannuronate (*citée par Le, 2004*).

3.2.2 La formation de gel : la gelation ionotropique

Grâce aux groupements carboxyliques, l'alginate peut former un gel insoluble par l'entremise de liaisons ioniques entre les groupes carboxyles de deux chaînes de l'alginate et un cation bivalent. La gélification par chélation de l'alginate est une propriété très intéressante pour la formation de matrices à libération contrôlée de médicaments. Elle permet aussi l'immobilisation des agents actifs par inclusion via la gélation ionotropique: méthode 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 Ca^{2+} , Sr^{2+} ou 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 Ca^{2+} , sous agitation. Les cations monovalents et l'ion Mg^{2+} n'entraînent pas la formation d'un gel, alors que les ions Ba^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} et Cu^{2+} produisent des microsphères plus fortes

et plus élastiques que le 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 Ca^{2+} est le seul acceptable et donc il est le cation le plus souvent utilisé, grâce à sa non toxicité et sa tendance à préserver la viabilité des cellules et autres microorganismes (Bashan et al., 2002; Smidsrød et al., 1990). En détail, la gélification de l'alginate est atteinte par un échange d'ions de sodium provenant des blocs de guluronate pour le cation bivalent Ca^{2+} suivi d'un empilement des groupements guluronate pour former une structure dénommée « boîte d'œuf » (Figure 3.4). Chacune des chaînes d'alginate se lie à plusieurs chaînes et forme un gel.

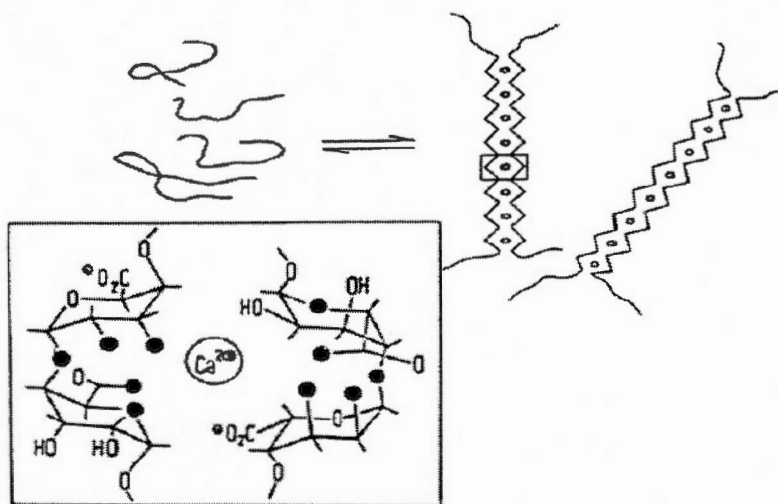


Figure 3.4 Représentation schématique de la structure « boîte d'œuf » obtenue par l'association de la séquence guluronate de l'alginate avec un cation divalent (Ca^{2+}) (d'après Gombotz et Wee, 2012).

Les billes dont le diamètre est d'environ 1,0 mm peuvent être obtenues à petite échelle à l'aide de seringues, aiguilles et pipettes. L'agent actif est solubilisé dans la solution 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 la viscosité de la solution d'alginate: plus la viscosité est grande, plus larges seront les billes. Ouwerx et collab (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 Ca^{2+} en utilisant un agent chélatant comme le lactate, le citrate, le phosphate ou des ions (Na^+ , Mg^{2+}) à une concentration plus élevée que le Ca^{2+} . Après la chélation, le gel devient instable et une perte de l'agent actif immobilisé dans les microsphères peut survenir. 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 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).

3.2.3 Applications thérapeutiques et alimentaire

L'alginate est largement utilisé dans les industries pharmaceutique et alimentaire pour sa simplicité, sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, ses propriétés mécaniques et sa faible toxicité lorsqu'il est administré oralement. Pour l'industrie alimentaire, il est utilisé comme agent épaississant ou stabilisant, alors que dans l'industrie pharmaceutique, il est largement utilisé comme matrice pour la livraison de médicament. Des études précédentes ont montré que l'immobilisation d'agents bioactifs dans les microsphères ou films d'alginate ont offert une protection ainsi qu'une libération satisfaisante pour les bactéries, les composés organiques et les enzymes (Le et al., 2004; Rastogi et al., 2007; Hung et al., 2008).

L'alginate, étant un polyanion comme le CMA, se comporte de manière similaire dans le milieu gastrique. C'est-à-dire, dans un milieu acide, il y a protonation des

groupements carboxyles et le compactage de la matrice (Assaad et Mateescu, 2010). Dans le milieu entérique, le gel d'alginate, généralement sous forme de microsphères, se dégrade rapidement due au phosphate intestinal. Tout comme le CMA, pour pallier à ce problème l'alginate est généralement complexé avec un polymère comme le chitosane (Pasparakis et al., 2006).

CHAPITRE IV

PRESENTATION DU PROJET

Le développement de systèmes à libération efficaces et sécuritaires constitue une étape importante dans la conception de nouveaux médicaments. Plusieurs études ont été consacrées sur des méthodes capables de protéger le principe actif contre la dégradation par l'acidité gastrique et de moduler la livraison de ce dernier. Les matrices utilisées comme transporteurs de principe actif sont les facteurs qui influencent la performance de toute formulation.

Les polymères biodégradables synthétiques présentent plusieurs désavantages tels qu'un coût élevé, une faible biocompatibilité et une certaine toxicité. En contrepartie, les polymères d'origines naturelles sont des excipients d'intérêt majeur pour l'administration par voie orale d'agents actifs. En effet l'alginate, un polymère naturel, est un excipient fortement utilisé, car il est simple, modérément coûteux, biodégradable et biocompatible. De plus, l'alginate n'est pas toxique lorsqu'il est administré oralement et montre aussi des effets protecteurs sur la muqueuse de la partie supérieure du tractus gastro-intestinal. Un autre polymère naturel, l'amidon, est peu coûteux et largement utilisé dans différentes formes pharmaceutiques.

Notre équipe de recherche à l'UQAM a proposé un excipient, obtenu par l'introduction de fonctions carboxyliques sur de l'amidon à haute teneur en amylose, non réticulé, comme matrice pour la livraison d'agents bioactifs au niveau du tractus intestinal (Mulbacher et al, 2005; Calinescu et al., 2005, Calinescu et al., 2007; Mateescu et al., 2012). Le CMA est un polymère hydrophile qui, sous forme de

comprimés monolithiques, possède la capacité d'assurer la stabilité du principe actif lors de son passage au niveau gastrique, car il forme un hydrogel insoluble à pH acide. Pour améliorer les conditions d'administration orale, nous avons envisagé d'élargir la gamme de formulation à base de CMA sous forme de comprimés, vers des formes de type microsphères administrable dans des capsules ou directement comme suspensions.

Les microsphères à base d'alginate seul présentent une haute porosité, générant un risque d'inactivation des agents actifs durant le transit stomacal à une forte acidité. Cependant, le carboxyméthylamidon seul forme difficilement des microsphères. D'autre part, les deux polymères sont biocompatibles et possèdent des propriétés physiques similaires telles qu'une certaine stabilité gastrique, solubilité au milieu intestinal, effet antiacide, etc. Dans ce contexte, nous avons énoncé l'hypothèse qu'une combinaison du CMA et de l'alginate permettra de réduire la porosité de la structure et augmenter la stabilité des microsphères. La nouveauté de ce projet réside dans l'association du CMA et de l'alginate sous forme d'un nouveau complexe (CMA/Alginate) et son utilisation comme matrice pour l'inclusion d'agents actifs, dans des microsphères, en vue d'un transport vers le colon.

Dans cette étude, nous avons abordé la diamine oxydase (DAO) d'origine végétale comme agent bioactif afin de réaliser une formulation pharmaceutique pour le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin et établir ainsi un lien avec les études précédentes de l'équipe Mateescu (Calinescu et al., 2012; Mateescu et al., 2012).

L'objectif principal de ce projet consiste d'utiliser des matériaux de type biopolymères comme matrices pour protéger l'intégrité d'un agent bioactif (la diamine oxydase) dans les conditions dénaturantes gastro-intestinales et lui permettre de pouvoir exercer son activité dans le côlon sans être dégradé par les enzymes protéolytiques.

La matrice proposée sous forme de microsphères, comme une alternative de celle sous forme de comprimé, déjà utilisée par Calinescu *et al.* (2012). Ces microsphères ont été produites par la gélation ionotrope du CMA associé à l'alginate en présence de la DAO selon la figure 4.1.

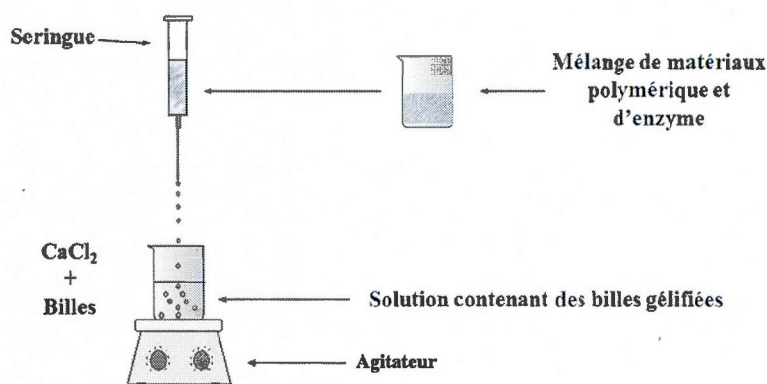


Figure 4.1 Procédure de préparation de microsphère par gélation ionotrope

L'utilisation de matrices sous forme de microsphères présente plusieurs avantages :

- Augmentation de la surface de contact (enzyme-substrat) ce qui permet d'améliorer l'efficacité
- Réduction des pertes du matériel biologique tout en conservant un bon rendement
- Immobilisation sous des conditions douces (température ambiante, pH neutre et sans compression, etc.)
- Administration facile lors des études *in vivo* chez des animaux (rats, souris, lapins) et possibilités d'administration chez l'humain.

Par ailleurs, les microsphères, une fois séchées, présentent une bonne stabilité pendant une longue période (plus de 6 mois, l'étude de stabilité est en cours). Un autre avantage est lié à l'utilisation de la DAO extraite de *Lathyrus sativus* : étant d'origine végétale, l'enzyme est facilement acceptable par les organismes

réglementaires (FDA et Santé Canada). D'autre part, la DAO végétale est 30-60 fois plus active que celle d'origine animale (rein de porc) commercialisée.

L'objectif principal du projet de maîtrise peut être divisé en plusieurs volets représentant diverses étapes dans la réalisation du expérimentale. Ces volets sont :

- Élaborer et préparer un complexe CMA/Alginate;
- Réaliser des microsphères contenant une quantité élevée de DAO par gélation ionotropique avec des ions Ca^{2+} ;
- Évaluer les propriétés mécaniques des microsphères, en vue de minimiser la dénaturation et les fuites de l'agent actif;
- Mettre au point une méthode de séchage;
- Déterminer la capacité de chargement en protéines dans des microsphères ainsi que les activités enzymatiques retenues;
- Étudier la stabilité de la DAO en conditions simulant le milieu gastrique (SGF pH 2) et intestinal (SIF pH 7,2) en présence des enzymes pancréatiques;
- Élucider la structure des microsphères par: spectrométrie infrarouge (FT-IR), diffraction de rayons X (DRX) et microscopie électronique à balayage (MEB).

* * *

Tenant compte de l'activité retenue de 65% suite au transit stomacal (acidité) et intestinal (protéases pancréatiques) pour une durée de plus de 6 h (temps pour le passage d'une formulation de l'administration orale jusqu'au colon), il est possible de considérer que l'objectif principal du projet de maîtrise à été accompli.

L'ensemble des travaux effectués durant la maîtrise est présenté schématiquement à la Figure 4.1.

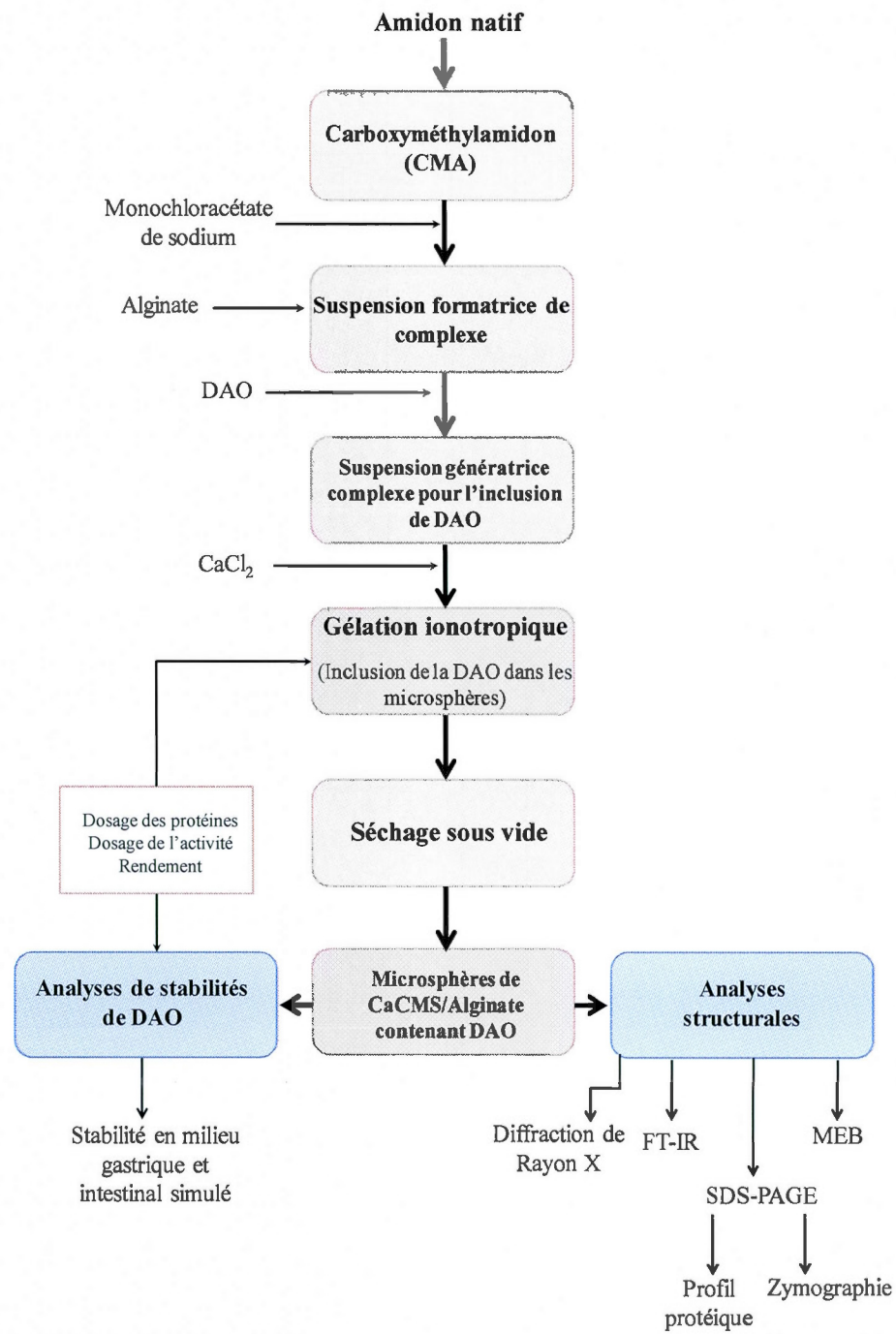


Figure 4.2 Présentation schématique des différents volets du projet de maîtrise

SECTION II

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE V

MICROSPHÈRES DE CARBOXYMÉTHYLAMIDON/ALGINATE POUR LA
LIVRAISON INTESTINALE DE LA DIAMINE OXYDASE

5.1 Microsphères de carboxyméthylamidon/alginate pour la livraison intestinale de la diamine oxydase

Lindsay Blemur*, Tien Canh Le*, Lucia Marcocci †, Paola Pietrangeli†,
Mircea Alexandru Mateescu* ‡

* Department of Chemistry & Centre BioMed, Université du Québec à Montreal, CP 8888, Succ. 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

Les symptômes associés aux maladies inflammatoires de l'intestin (MII) sont, en partie, causés par un niveau élevé d'histamine, un facteur pro-inflammatoire. Les traitements antihistaminiques actuels qui agissent sur les récepteurs H1 et H2 de l'histamine peuvent présenter plusieurs effets secondaires. Notre projet propose un agent antihistaminique naturel administré par voie orale, qui implique l'action d'une oxydase à cuivre végétale : la diamine oxydase (DAO, aussi connue sous le nom d'histaminase). L'hypothèse consiste que la DAO (EC 1.4.3.22) dégrade l'histamine au niveau du tractus intestinal, ce qui limite l'inflammation du côlon. Dans cette étude, la DAO provenant de la gesse commune (*Lathyrus sativus*) a été immobilisée par inclusion dans des microsphères de carboxyméthyl amidon (CMA) et d'alginate complexés avec le Ca^{2+} par gélation ionotropique. Le rendement d'inclusion de 82-95 % et la structure compacte des microsphères a été capable de limiter l'accès du fluide gastrique à la DAO incluse. L'enzyme immobilisée demeure active et catalyse l'oxydation des amines et ce, même en présence d'enzymes protéolytiques. D'autre part, elle conserve jusqu'à 70 % de son activité initiale dans le fluide gastrique simulé (pH 2,0). Dans le fluide intestinal simulé (pH 7,2) en présence de pancréatine, une rétention de 65 % de l'activité de la DAO dans les microsphères de CMA/Alginate a été mesurée durant 24 h, alors que, dans des conditions similaires, l'enzyme libre était totalement inactivée.

‡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

Article soumis à *Biotechnology and Applied Biochemistry* (2014)

Carboxymethyl-Starch/Alginate Microspheres containing Diamine Oxidase for Intestinal Delivery

Lindsay Blemur*, Tien Canh Le*, Lucia Marcocci †, Paola Pietrangeli†,

Mircea Alexandru Mateescu* ‡

* Department of Chemistry & Centre BioMed, Université du Québec à Montreal, CP 8888, Succ. 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

Running title: DAO entrapped in CM-Starch/Alginate Microspheres

‡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

Abstract

Inflammatory bowel diseases are considered, in part, caused by an elevated level of histamine, a pro-inflammatory factor. Current antihistaminic drugs, acting on H1 and H2 Histamine receptors can present several side effects. Our project proposes an antihistamine agent orally administered, which involves a vegetal copper-oxidase: the diamine oxidase (DAO, also known as Histaminase). DAO (*EC 1.4.3.22*) is expected to degrade histamine at the intestinal tract, limiting thus the colon inflammation. In this study, DAO from White Pea (*Lathyrus sativus*) was immobilized by inclusion in microspheres formed by ionotropic gelation from sodium alginate and carboxymethyl starch (CMS) complexation with Ca^{2+} and the entrapment yield was of about 82-95%. This material generates a more compact structure which was able to decrease the access of gastric fluid inside the microspheres. Furthermore, the entrapped enzyme remained active was able to oxidize the substrate, even in the presence of pancreatin. The DAO entrapped in CaCMS/Alginate beads retained up to 70% of its initial activity in simulated gastric fluid (pH 2.0). In simulated intestinal fluid (pH 7.2) with pancreatin, an overall retention of 65 % of activity for the immobilized DAO was observed over 24 h, whereas in similar conditions the free enzyme was totally inactivated.

Keywords: antihistaminic diamine oxidase, carboxymethyl starch/alginate microspheres, colon delivery, Crohn's disease, gastro-intestinal resistant therapeutic enzymes, inflammatory bowel diseases

Abbreviations: DAO, diamine oxidase; CMS, carboxymethyl starch; SGF, simulated gastric fluid; SIF, simulated intestinal fluid; FTIR, Fourier-transform Infra-Red; SEM, scanning electron microscopy; IBD, inflammatory bowel diseases

Introduction

For oral dosage forms, tablets, capsules or microspheres have been proposed for various bioactive agents. Drug delivery systems employ biodegradable and biocompatible polymeric excipients that are able to protect and to afford controlled or sustained release of active agents. For compliance of patients, there is an interest for smaller and soft dosage forms for children, elders or post-surgery subjects. Microspheres are easy to administrate orally and various bioactive agents and biopolymers as poly(lactic-glycolic) acid (Makadia et Siegel, 2011), chitosan (Ma et Liu 2010), and alginate (Soni et al., 2011) have been used as polymeric matrices for active principle encapsulation. Poly(lactic-glycolic) acid microspheres require a relatively complex processing often involving solvents (Makadia et Siegel, 2011). Chitosan would liberate only a part of bioactive agents in the colon tract due to its degradation by bacterial enzymes (Tozaki et al., 1997). Sodium alginate is largely used as matrix in controlled delivery due to its biocompatibility, low toxicity and good mechanical properties (George et al., 2006; Tønnesen et Karlsen, 2002). Alginate is a natural polysaccharide from seaweed that consists of β -D-mannuronic and α -L-guluronic acid residues with β -1,4 glycosidic links (Haug et al., 1966). Alginate gel beads may be formed by spreading a solution of sodium alginate into a divalent Ca^{2+} cation solution. Mechanical properties of the beads depend on concentration of alginate and of the cation solution (Ouwere et al., 1998). Previous studies showed that entrapment in alginate microbeads or films offered good protection and satisfactory delivery for organic compounds (Rastogi et al., 2007), bacteria (Le et al., 2004) and enzymes (Hung et al., 2008). However, a certain porosity of microspheres can limit the stability of the entrapped bioactive agents (Le et al., 2004). The association of alginate with other polymers can improve the properties of the matrix. For example, chitosan has been used as a coating for alginate microspheres via a polyelectrolyte association to delay the diffusion rate of the

encapsulated substances (Anal et Steven, 2005) or as an additive that modifies the structure of the beads (Gotoh et al., 2004).

We have hypothesized that the association of a hydrogel material can reduce the porosity and thus to delay the diffusion. Carboxymethyl starch (CMS) is a biodegradable polymer that has been proposed as an excipient for controlled release of small molecules and bioactive agents in oral solid dosage form such as monolithic tablets (Mulhbacher et al., 2005). CMS is an anionic starch modified by treatment with monochloroacetic acid in order to introduce carboxylic groups by etherification. As powder, CMS hydrophilic polymer can be compressed to produce tablet forms that, when submerged in aqueous fluids (i.e. gastric fluid) [Calinescu et al., 2005], form an outer gel layer. This gel forming capacity in acidic medium is related to the protonation of surface carboxylic groups (Assaad et al., 2011). The association of alginate with the anionic carboxymethyl starch could present a novel and interesting approach to prepare microspheres with low porosity and enhanced gastric stability, improving the delivery of bioactive agents to the colon.

Recently oral administration forms of diamine oxidase (DAO), formulated as monolithic tablets with Carboxymethyl starch (CMS) and chitosan for colonic delivery were proposed as an oral antiallergic agent to treat food histaminosis and as a tentative to reinforce the treatment of inflammatory bowel diseases (Calinescu et al., 2012). We are now proposing DAO entrapped in CMS/Alginate microspheres for oral administration. The present study is aimed to investigate the capacity of calcium CMS/Alginate complex to form microspheres and to entrap DAO by ionotropic gelation and to evaluate the enzyme release from microspheres in simulated intestinal conditions.

DAO (*EC 1.4.3.22*), also known as histaminase, is an ubiquitous enzyme that exists in micro-organisms such as fungi and bacteria (Cooper et al., 1992), plants (pea seedling) [McGuirl et al., 1994] and mammals (pig kidney) [Mondovi et al., 1967].

DAO is a copper-containing amine oxidase that catalyzes the oxidative deamination of primary biogenic amines, i.e. polyamines (putrescine, spermine, spermidine) and histamine with the release of corresponding aldehydes, hydrogen peroxide and ammonia. Copper-amine oxidases possess a covalently linked cofactor, the topaquinone (Janes et al., 1992), that comes from the modification of an endogenous tyrosine residue (Cai et al., 1994). Previous kinetic studies indicated a higher oxidation rate of aliphatic diamines and histamine for vegetal DAO when compared with animal amine oxidase (Pietrangeli et al., 2007). Plant copper-containing amine oxidases have been a point of interest in therapeutic studies since other copper oxidases, as ceruloplasmin (Atanasiu et al., 1995) and bovine serum amine oxidases have been shown to possess antioxidant (Atanasiu et al., 1998), cardioprotective (Mateescu et al., 2009) and even antitumoral properties (Averill-Bates et al., 1993). It has also been suggested that pea seedling DAO can reveal an antioxidant-like protection by reducing tissue damage induced by reactive oxygen species generated during anaphylactic reaction (Masini et al., 2007). Furthermore, pea seedling DAO was found to counteract cardiac anaphylaxis and pulmonary asthma-like reaction to aerosolized allergens in sensitized guinea pigs by an antioxidant activity and by inactivation of endogenously released histamine (Masini et al., 2007b).

The efficacy of DAO to degrade histamine suggests a possible therapeutic application of DAO in the treatment of histamine-related intestinal disorders. Indeed, DAO is the main histamine degrading enzyme in the intestinal tract and is responsible for extracellular histamine degradation by oxidative deamination after mediator release (Sessa et al., 1994). Food-induced histaminosis can be developed through both an increased presence of biogenic amines (histamine, putrescine, cadaverine) and a decreased histamine degradation capacity. Symptoms of histaminosis can range from a simple vascular headache caused by nitric oxide (Gallai et al., 2000), to gastrointestinal ailments such as colics, flatulence and diarrhea. At intestinal tract, high mucosal histamine and a change in mucosal DAO

activity have been observed in various dysfunctions including food allergies (Raithel et al., 1999) and inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease (Schmidt et al., 1990) and ulcerative colitis (Mennigen et al., 1990). A lower DAO activity was found on the intestinal mucosa of patients suffering from Crohn's disease or ulcerative colitis (Schmidt et al., 1990). Reduction of inflammation in ulcerative colitis induced in rats was observed after 5 days of intraperitoneal administration of DAO (Fogel et Lewinski, 2006).

Materials and methods

Reagents and Chemicals

High amylose corn starch was purchased from National Starch (Hylon VII, Bridgewater, NJ, USA). Sodium alginate (Keltone® LVCR, NF grade) was from FMC Biopolymer (Newark, DE, USA). Horseradish peroxidase (Type I, 96 purpurogallin units/mg solid), putrescine (1,4-diaminobutane dihydrochloride), *ortho*-phenylenediamine dihydrochloride, *N,N*-diethyl *para*-phenylenediamine, hydrogen peroxide (30%) and pancreatin from porcine pancreas were from Sigma-Aldrich. The chromatographic ion exchange resin YMC-BioPro S75 was from YMC (Japan). Other chemical reagents were ACS grade and used without further purification.

Preparation of diamine oxidase

Lathyrus sativus extract enriched with DAO activity was obtained from 1 Kg *Lathyrus sativus* seedlings homogenized in 1 L phosphate buffer 50 mM pH 5.5 containing NaCl 400 mM and squeezed through a liquid filter jute bag. The filtrate was centrifuged at 8000 g for 40 min to remove remaining fibers and the supernatant was diluted with water to a conductivity of 9 mS. The suspension was centrifuged at 8000 g for 30 min and supernatant loaded on a 5x8 cm strong exchange column

(YMC-BioPro S75) equilibrated with phosphate buffer 50 mM pH 5.5. After washing with 1 L of the same buffer the column was eluted with phosphate buffer 50 mM pH 5.5 containing NaCl 300 mM. The eluate was collected in 50 mL fractions. Those of highest DAO specific activity were pooled and concentrated to about 10 mL final volume, then dialyzed in phosphate buffer 50 mM pH 7.4 overnight. After dialysis, the suspension was centrifuged at 15000 g for 15 min, frozen at -20 °C then lyophilized without addition of a stabilizing agent. The lyophilized samples were stored at -20 °C until used.

Preparation of carboxymethyl starch

Carboxymethyl starch (CMS) was synthesized in aqueous medium from high amylose starch as previously described (Assaad et al., 2011, 2012). Briefly, 40 g of starch were dispersed in 100 mL of distilled water under continuous stirring in a jacketed beaker at 55 °C. For gelatinization, a volume of 135 mL of 1.5 M NaOH was incorporated under stirring (1 h) followed by the addition of 30 mL of 10 M NaOH and 15 g of sodium chloroacetate in a minimal volume of water. After 1 h, a volume of 155 mL of distilled water were added to the reaction which was then neutralized with acetic acid. The CMS was precipitated with 80% methanol and then repeatedly washed with the methanol 80% solution until a conductivity of 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ or lower. Finally, it was washed with a methanol/acetone mix (40:60, v/v), air-dried at 40 °C for 24 h and sieved through a 300 μm screen.

Preparation of carboxymethyl starch and alginate bead forming solution

The CMS/Alginate composition was prepared by first dissolving CMS (2.5%) in distilled water followed by the addition of alginate up to 3%. The solution was stirred until the CMS/Alginate mixture suspension was uniformly homogenized (without bubble formation).

Entrapment of diamine oxidase

A volume of DAO (9 mg/mL) freshly dissolved in phosphate buffer 20 mM (pH 7.2) was added in the suspension of CMS/Alginate in order to obtain a final concentration of 3 mg/mL. The resulting homogenized mixture was transferred into a syringe and placed approximately 4 cm above a chilled calcium chloride (10%) solution. Microspheres of entrapped enzyme were obtained by dripping the bead forming solution containing DAO into an excess of chilled CaCl₂ solution under stirring. The bead size is regulated by using a 26G ½ needle and by stirring velocity. The beads have been left to stabilize in the 10% CaCl₂ for 15 min and stored in 0.5% CaCl₂ solution at 4 °C.

Vacuum drying of entrapped enzyme

The beads were withdrawn from the 0.5% CaCl₂ solution and placed on a Whatman filter paper inside a vacuum desiccator. They were then dried under vacuum at 4 °C for 5 days until a constant mass. The collected dry beads presented a loss of approximately 91.7% of their initial weight and were stored away from light at 4 °C.

Evaluation of diamine oxidase microspheres in simulated gastric and intestinal fluid

Amounts of 300 mg vacuum dried beads (containing approximately 900 µg of proteins) were first left in water for 2 min. This procedure allows preswelling and washes eventual traces of CaCl₂. The DAO microspheres were incubated in 10 mL of simulated gastric fluid (SGF pH 2.0) after 1 h and 2 h samples were withdrawn to detect the retained enzymatic activity of entrapped DAO. Separately, amounts of 300 mg of microspheres were incubated in various tubes containing 10 mL SIF, pH 6.8 with and without 1% pancreatin (Convention U.S.P, 2009) under shaking at 50 rpm and 37 °C. At different intervals, supernatants and beads for further DAO extraction

were withdrawn from the tubes and stored at 4 °C until enzymatic activity and protein determination assays.

Determination of DAO enzymatic activity

The enzymatic activity of DAO entrapped in microspheres was determined using a peroxidase coupled reaction allowing to quantify the released H₂O₂ as previously described (Calinescu et al., 2012). The assay mixture containing 3.2 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 50 µL of peroxidase solution (0.1 mg/mL), 250 µL of 30 mM N,N-diethyl *para*-phenylenediamine solution and 1 mL of 30 mM putrescine solution was incubated for 5 min at 37 °C. The assay started with the addition of 300 mg of DAO entrapped in microspheres for the dosage. After incubating for 10 min at 37 °C, the absorbency was read at 515 nm using Ocean Optic[®] fiber optic spectrometer. The standard curve was prepared using various concentration of H₂O₂ ranging from 0 to 0.4 mM. One enzymatic unit (EU) of DAO was considered as the amount of enzyme required to catalyze the oxidation of 1.0 µmole of putrescine per min at pH 7.2 and 37 °C.

The enzymatic activity was also determined for free DAO and for DAO after extraction with 8 mL of 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.2). The previously described assay mixture was incubated for 5 min at 37 °C and determination started by addition of 500 µL protein sample of DAO (free or released from microspheres) for the dosage. Protein concentrations were determined by Bradford assay using bovine serum albumin as standard.

Entrapment of peroxidase in polyacrylamide gels for zymography

Enzymatic detection of DAO by zymography was carried out on peroxidase entrapped in polyacrylamide gel electrophoresis as described by Calinescu et al. (2010). For the entrapment of peroxidase 1 mL of horseradish peroxidase (1 mg/mL)

was incorporated in the solution of polyacrylamide (final volume of 5 mL), just prior to trigger the polymerisation. The stacking gel contained no peroxidase.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The experiments were conducted using a Mini-Protean® tetra cell (Bio-Rad) electrophoresis system. Free DAO and DAO samples extracted from beads (as described in a previous section) were treated (4:1 v/v) with glycerol while the molecular weight standard was prepared according to the manufacturer (Bio-Rad). A volume of 30 µL of each sample and 10 µL of molecular weight standards (Broad Range) were loaded and run by SDS-PAGE for 1 hour (room temperature, 160 V) on 10% polyacrylamide gel for Coomassie blue staining. For each sample, a comparable volume was run on 10% polyacrylamide gel containing entrapped peroxidase for zymographic revelation of DAO enzymatic activity. The electrophoresis buffer used for both Coomassie staining and zymography runs contained 0.025 M Tris-Base, 0.192 M glycine, and 0.1% SDS.

After electrophoresis, the polyacrylamide (peroxidase-free) gels were incubated for 30 min in fixation solution containing methanol:acetic acid:water (50:10:40, v/v/v) followed by 1 h staining with 0.5% Coomassie Brilliant Blue G-250 in a methanol:acetic acid: water (40:10:50, v/v/v) solution. For zymography, the gels containing entrapped peroxidase were rinsed with distilled water and placed in a solution of putrescine (30 mM) for a few minutes followed by addition of an equal volume of *ortho*-phenylenediamine solution (30 mM) and incubation at 37 °C for 1 h under agitation in dark.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Samples were prepared by mixing vacuum dried microbeads (50 mg) with dried potassium bromide (150 mg) and compressed in flat-faced punches at 1 T/cm² in a Carver (Wabash, IN, USA) hydraulic press and maintained for about 20 sec. The

resulting tablet of 12 mm was then used for FTIR analysis (Assaad et al., 2011). Spectra were recorded (16 scans at a resolution of 2 cm^{-1}) using a Thermo-Nicolet 6700 FTIR spectrometer with a deuterated triglycine sulphate-KBr detector and a diamond smart attenuated total reflection platform.

X-ray diffractometry

An amount of 1 g of vacuum dried microbeads were used without modifications or treatment in a Siemens D-5000 diffractometer (Munich, Germany) SOL-X detector and operating in reflectance mode of CoK_α at a wavelength of 1.789 \AA , over an angular range of 2θ from 0° to 30° and a scan rate of 2° per minute. The spectra recorded were smoothed using the software Match 2.

Scanning electron microscopy (SEM)

Amounts of 1 g of vacuum dried DAO containing microspheres were treated by incubation in water for 4 h or in SGF with pepsin for 2 h or in SGF with pepsin for 2 h followed by 4 h in SIF containing pancreatin or directly in SIF for 4 h and 24 h. Samples were promptly dried using the vacuum drying procedure. After drying, samples were mounted on metal stubs using double-sided carbon conductive tape and were sputter-coated with gold for SEM analysis. Microspheres shape and surface were examined with a JSM-6010LV InTouchScope™ (SEM) (JEOL Ltd., Tokyo, JP) using a secondary electron image detector. The images were obtained with accelerating voltages of 1.5 kV and high vacuum.

Results and discussion

Alginate was initially selected to immobilize enzyme due to its compatibility, stability and ease to form microspheres by ionotropic gelation (complexation with bivalent metal ions such as Ca^{2+}). Microspheres formulated with alginate alone presented a

porous structure from which enzyme can promptly diffuse from the microspheres into gastro-intestinal media and undesired acidity can diffuse into the microspheres. To prevent these phenomena, the association with other gel-forming polymers such as chitosan, hydroxypropyl cellulose (HPC) or carboxymethyl starch appeared more interesting, as it improves the bead structure and reduces its porosity. Chitosan (positively charged) can interact ionically with alginate (with negative charges) to form a polyelectrolyte complex. However, microspheres based on Chitosan/Alginate presented similar porosity as native alginate and allowing a rapid diffusion of the enzyme. When combining the HPC (no ionic charges) with alginate, the structure was more compact and the protein was successfully kept inside of the microspheres. However, the mechanical properties of the microspheres were not satisfactory in gastric and intestinal fluids because of the lack of interaction of HPC with alginate. For these reasons, CMS (negatively charged and hydrogel forming) was used in combination with alginate for co-complexation with calcium. It was supposed that CMS, due to its strong capacity to form a hydrogel and its swelling properties (Assaad et al., 2011), will reduce the porosity of alginate when complexed with calcium. In fact, the mechanical properties of the CaCMS/Alginate were definitely improved with a good stability in biological media and no marked protein diffusion out of microspheres after 24 h. For these reasons, our formulation was based on the complexation of alginate with CMS in presence of DAO with Ca^{2+} .

Characterization of microspheres

Previous studies of the effects of alginate concentration on enzyme entrapment have shown that a 2-3% sodium alginate concentration offered a good immobilization efficiency (Hung et al., 2008; Quiroga et al., 2011). After optimization, a concentration of 2.5 for CMS and 3% for alginate provided satisfactory mechanical properties and good stability for the microspheres. At concentrations of CMS greater than 3% the polymeric solution was difficult to handle due to a high viscosity. Wet microspheres

obtained by ionotropic gelation of CaCMS/Alginate in presence of DAO presented predominantly a spherical shape and the enzyme inside microspheres as highlighted by Coomassie Blue staining (Figure 5.1) whereas enzyme-free microspheres showed no significant coloration. The protein inclusion yield was of about 82-95% entrapped DAO and the water content was of approximately 91% in wet microspheres.

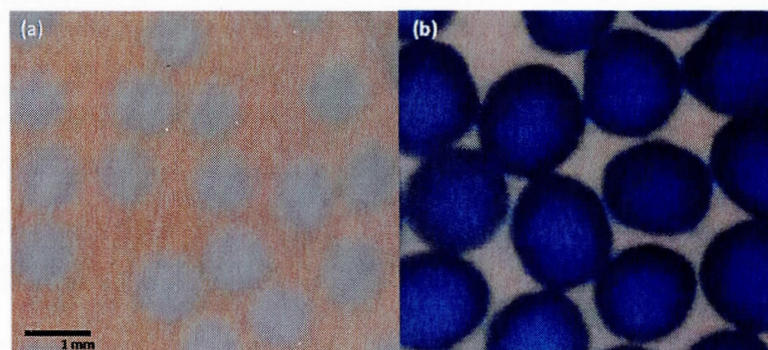


Figure 5.1 Macroscopic image of CMS/Alginate microbeads after Coomassie Blue staining: (a) without enzyme, (b) with entrapped enzyme.

After vacuum drying, the specific enzymatic activity was measured in order to ensure that the chosen entrapment and drying methods did not denature the enzyme. The results confirmed the presence of active enzyme in CaCMS/Alginate microspheres before and after extraction of protein from microspheres, with a yield of about 45-60% of the initial activity. The results also suggest a certain porosity affording a permeability of the matrix for small molecules only since the substrate, putrescine, is able to rapidly diffuse through the matrix and be oxidized by the enzyme inside the microspheres, whereas the DAO still remained within the beads.

Electrophoresis studies

In order to further identify the protein profiles, samples of free DAO and of DAO extracted from microspheres were run in SDS-PAGE under non-reducing conditions. Previous studies indicated the presence of a single band at 72 kDa in denaturing SDS-PAGE (Calinescu et al., 2010; Federico et al., 2006) for vegetal DAO extracted from

Lathyrus sativus and a band at 95 kDa for DAO extracted from *Pisum sativum L* (Ebrahimnejad et al., 2013). The molecular mass of pea seedling amine oxidase was also investigated using the method of gel filtration, indicating a value of 184.0 ± 2.6 kDa (Kirivand et Rincken, 2007). Our Coomassie staining of DAO on non-reducing SDS-PAGE (Figure 5.2A) showed bands of similar mobility for both free DAO and DAO extracted from microspheres. Enzyme activity on zymography on peroxidase entrapped in polyacrylamide gel (Mateescu et al., 2012) showed bands (Figure 5.2B) at the same mobility as those detected by Coomassie staining. The fact that DAO presented activity in zymography confirms that the enzyme remains active after the entrapment and drying process.

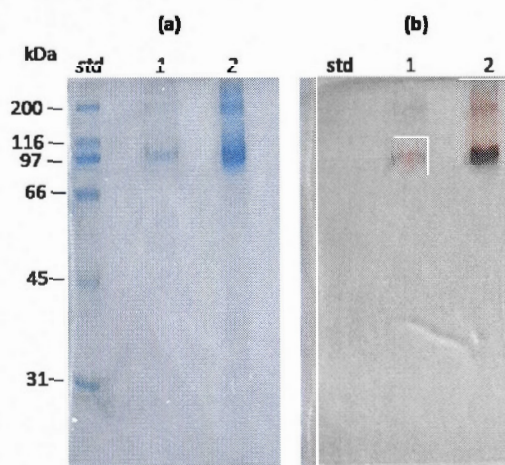


Figure 5.2. Electrophoresis pattern of diamine oxidase in (a) Coomassie staining and (b) zymography (with peroxidase entrapped in 10% polyacrylamide gel) of DAO encapsulated in microbeads and extracted with 1M phosphate buffer (lanes 1) and of free enzyme (lane 2).

FTIR analysis

FTIR spectra of different types of microspheres, loaded and unloaded with DAO are presented in Figure 5.3. For calcium alginate beads without DAO, the spectrum showed a broad band assigned mainly for -OH stretching vibration at approximately

3200-3400 cm^{-1} and a band at 2980 cm^{-1} attributed to the alkyl -CH bond of alginate. The band at 1630 cm^{-1} was related to the asymmetric stretching vibration of carboxylate group. Similar spectra were observed for calcium alginate microspheres with DAO. However, an increase of intensity for the bands at 1630 cm^{-1} may be due to overlapping of stretching vibration from carboxylate group (alginate) and amide (peptide) bonds of DAO. The combination of CMS and alginate (w/w 5:6) in microspheres (Figure 5.3C) presents a large absorption band located at 3350 cm^{-1} assigned to -OH group stretching vibration. This high intensity is probably due to additional effect of -OH groups from alginate and CMS. The bands at 1600 cm^{-1} and 1430 cm^{-1} were ascribed to asymmetric and symmetric stretching vibrations of carboxylate groups. In the presence of DAO (Figure 5.3D), there is a decrease in the absorption intensity of 3350 cm^{-1} band (-OH group), probably due to a decrease of relative amount of -OH groups for dry microspheres.

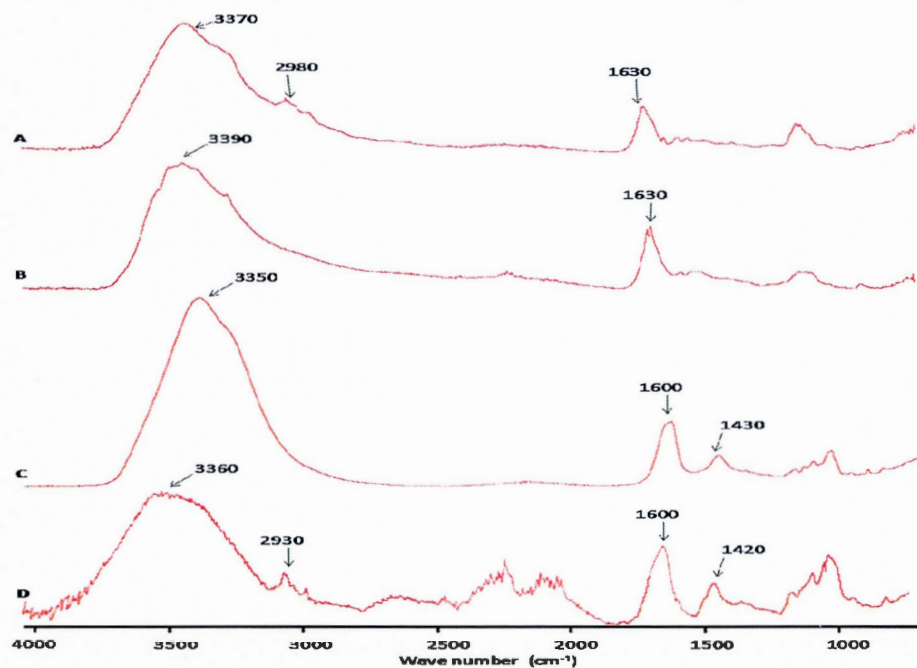


Figure 5.3 FTIR spectra of air dried microbeads: (A) Alginate, (B) enzyme loaded Alginate, (C) CMS/Alginate, (D) enzyme loaded CMS/Alginate.

Also, a hydrogen bonding between DAO and CMS/Alginate complex may not be excluded. The band at 2930 cm^{-1} (assigned to $-\text{CH}$ alkyl) presented an increased absorption which may be related to the $-\text{CH}$ groups of DAO.

X-ray diffraction analysis

X-ray diffractograms (Figure 5.4) of CaAlginate microspheres (Figure 5.4A) revealed two peaks, one at 6° - 8° and another at 13° whereas for alginate associated with CMS and complexed with calcium (Figure 5.4B) a minor shift for band at 13° and the loss of the peak at 6° - 8° were observed.

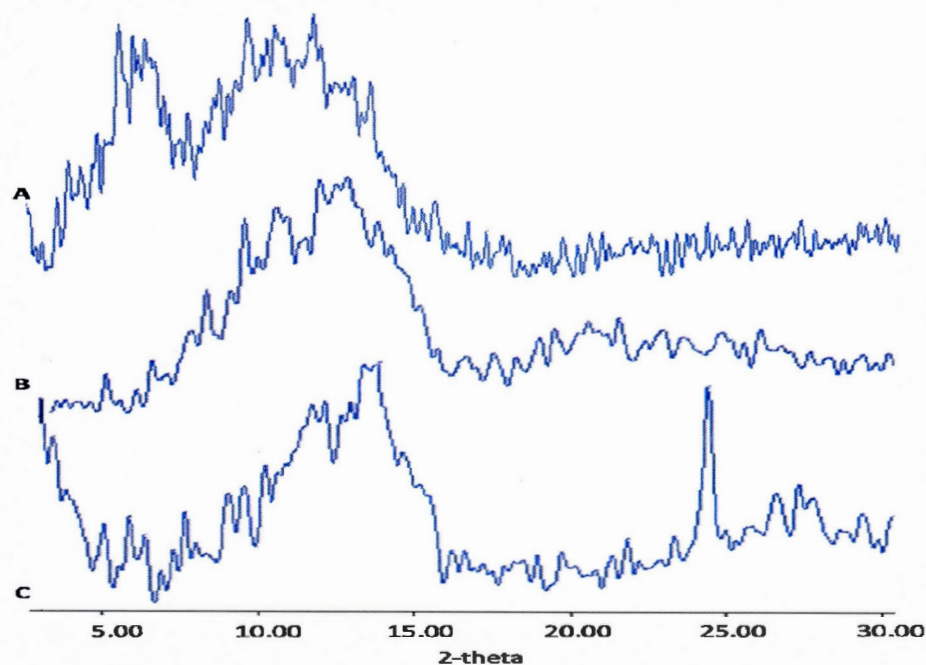


Figure 5.4 X-ray diffraction patterns of (A) Alginate microspheres, (B) CMS/Alginate microspheres, (C) CMS/Alginate microspheres with entrapped enzyme.

Similar profiles were noticed for DAO entrapped in CaCMS/Alginate (Figure 5.4C). In addition, the band at 13° seemed slightly sharper suggesting a more organized structure, probably due to interactions between carboxylic polysaccharide matrix and DAO enzyme.

Scanning electron microscopy (SEM) analysis of microspheres

SEM of vacuum dried CaCMS/Alginate microspheres loaded with DAO and following treatment in various conditions are presented in Figure 5.5. Non treated microspheres showed a diameter of approximately 1 mm with an almost spherical shape (Figure 5.5A). Detailed examination of the surface structure reveals a smooth surface of microspheres, probably due to CMS forming an outer hydrogel. When hydrated (water for 4 h) the microspheres retained the spherical form with a diameter of about 900 μm (Figure 5.5C) with a change of the smooth surface for a rough and porous exterior. After 2 h in SGF, a decrease to 800 μm of diameter was observed for the spherical microspheres probably due to protonation phenomena which replaces the electrostatic repulsions among carboxylate groups with hydrogen association: carboxyl-carboxyl (dimerisation) or carboxyl-hydroxyl (Assaad et Mateescu, 2010) and thus a shrinkage is favored (Ouwertx et al., 1998). In SGF the surface appeared more contracted than before the treatment or when treated in water probably due to the tightening of the CMS and alginate gel meshwork (Kim et Lee, 1992). Microspheres incubated in SGF for 2 h and then in SIF for 4 h, presented a similar size to that of microspheres incubated only in SGF for 2 h. When treated in SIF with pancreatin for 4 h and 24 h microspheres retained their spherical shape with a size of about 800 μm , but the surface showed a kind of dilatation after 4 h and even more pronounced after 24 h which may be due to CMS/Alginate swelling in neutral or low alkaline pH (Pasparakis et Bouropoulos, 2006) and to a slow erosion due, at least in part, to alpha-amylase activity of pancreatin.

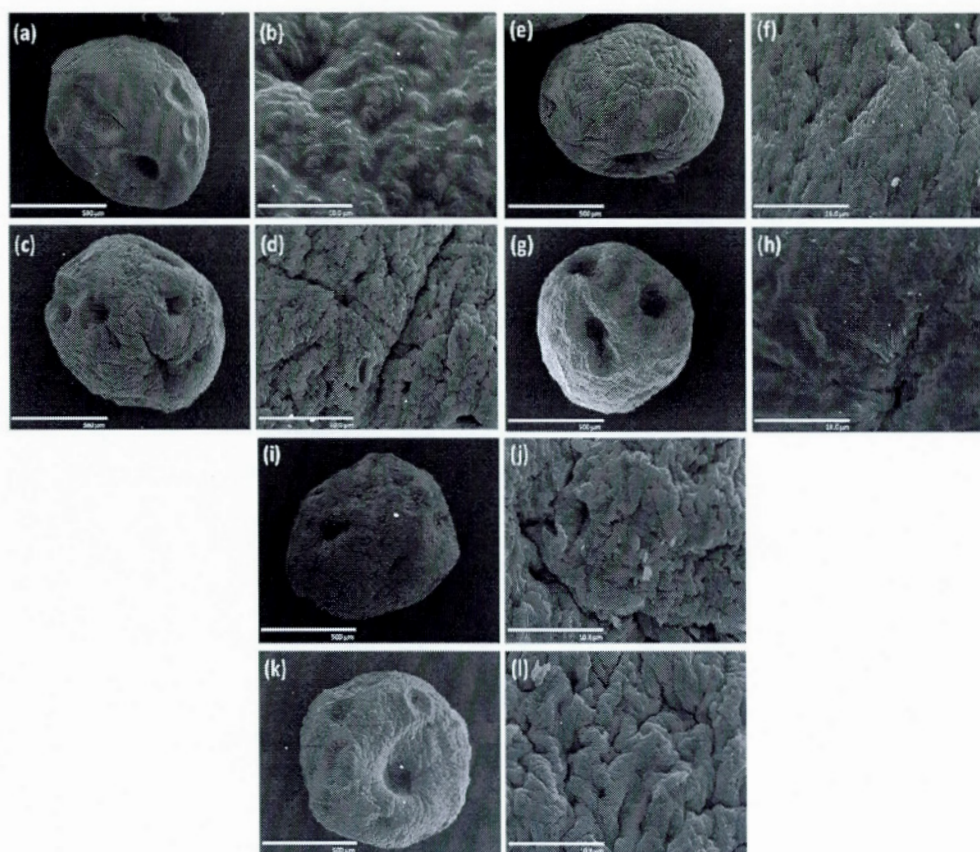


Figure 5.5 Scanning electron micrographs of CMS/Alginate air dried microbeads without any treatment (a), or incubated in water during 4 h (c), in SGF (pH 1.2) for 2 h (e), in SGF for 2 h followed by SIF (pH 7.4) for 4 h (g), in SIF only for 4 h (i) and in SIF for 24 h (k). Surface shapes are shown for each corresponding incubation time (b, d, f, h, j, l). The enlargements were of 50x for microbeads or of 5000x for surface shape and were obtained at 10 kV voltage.

Activity of free DAO and of DAO entrapped in microspheres

One of the roles of the enzyme microencapsulation is to maintain its stability in biological fluids, protecting it against gastric acidity and degradation by proteases. Microspheres can be given orally as free-flowing suspensions but the effective dose is not precise enough and thus can lead to failure of treatment. To facilitate oral administration, microsphere dosage forms are often filled within hard gelatin

capsules (Convention U.S.P, 2009). Furthermore, there are commercially available enteric coatings such as Eudragit® to render capsules resistant against gastric acidity for oral delivery (Sonaje et al., 2010). Our uncoated microspheres have been investigated in SGF and in SIF in order to evaluate the physicochemical properties of the CaCMS/Alginate complex. Previous studies showed that free DAO is sensitive to gastric acidity (Calinescu et al., 2010; Federico et al., 2000). It is also known that alginate microspheres (with porous structure) allow the diffusion of gastric acidity into microspheres inducing a rapid inactivation of enzyme. It was of interest to investigate the stability of DAO entrapped in CaCMS/Alginate microspheres against gastric acidity. For DAO entrapped in CaCMS/Alginate microspheres, a retained activity of approximately 70% was observed after 2 h in SGF pH 2.0. This conservation of activity with the CaCMS/Alginate microspheres may be due to the high amount of carboxylate groups from both alginate and CMS which can intercept the access of protons damaging the entrapped enzyme (Le et al., 2004). A similar protection was reported with various peptides and probiotics by Calinescu et al. (2005, 2008). Furthermore, monolithic tablets based on CMS were able to protect sensitive DAO, during gastric transit and to release them in the lower intestine tract (Calinescu et al., 2012). Now it was also of interest to evaluate if CaCMS/Alginate microspheres can protect DAO against proteolytic degradation in SIF.

The retained activities of free and of entrapped DAO were tested in SIF at various intervals (Figure 5.6). Although DAO is known for possessing a certain resistance to proteolysis in SIF with pancreatin (Calinescu et al., 2012), this resistance was limited for a period of about 8 h. The activity of free enzyme in SIF with pancreatin during the first 8 h was of about 80% from the initial activity. Then, its retained activity decreased gradually and was completely lost after 24 h. Differently, for DAO entrapped in microspheres, its retained activity was stabilized at about 65% and maintained for at least 24 h. The decreasing activity of entrapped DAO during

the first hour of incubation may be due to several factors such as the loss of the enzyme from the surface of microspheres or a slow hydration and swelling of microspheres which is necessary for the activation of the enzyme (Willmot et al., 1997; Su et al., 1998) and renders the enzyme accessible to the substrate. These factors explain why the activity of microspheres was initially moderately lower than that of the free enzyme but then remained stable for a longer period of time. These data suggest that the entrapping of DAO in CaCMS/Alginate microspheres can afford a protection against proteolysis probably because proteases are unable to diffuse into the microspheres. The role of CMS acting as a filler, increasing the compactness of microspheres appeared beneficial for the maintaining of catalytic properties of the entrapped DAO in this novel CMS/Alginate matrix.

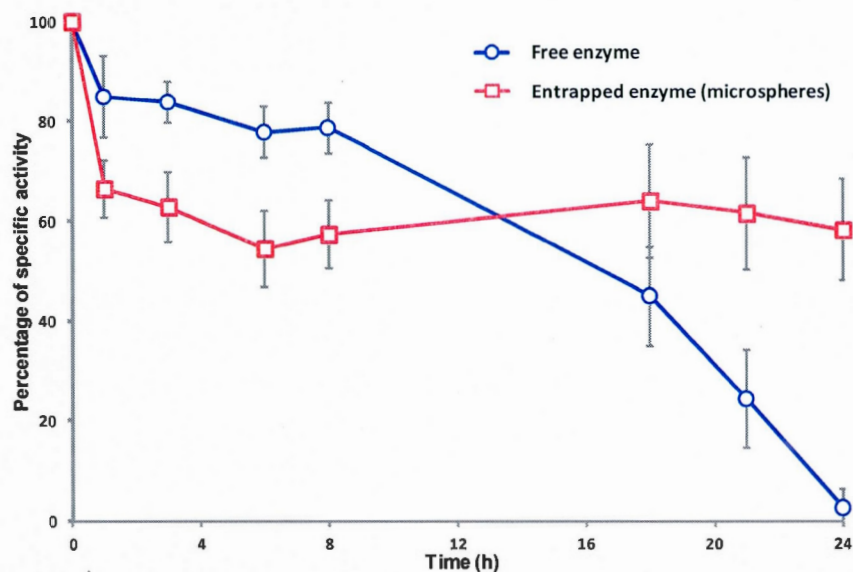


Figure 5.6 Enzyme activity of free and entrapped enzyme at various incubation times in SIF (with pancreatin, pH 7.2). The initial specific activity (considered as 100%) of the entrapped enzyme was established as the enzymatic activity of DAO extracted after microbeads treatment in 1 M phosphate buffer (pH 7.2) without pancreatin. For the free enzyme the 100% was considered the activity determined without modifications and in the absence of pancreatin.

In conclusion, the inclusion of DAO in CaCMS/Alginate microspheres appears as a procedure able to afford protection of the entrapped enzyme against gastro-intestinal degradation. Further investigations will be devoted to highlight the possible role of microspheres loaded with DAO orally administered in animal models for the treatment of inflammatory enteric diseases.

Acknowledgements

Financial supports from Natural Science and Engineering Reserved Council (NSERC) of Canada (Discovery Grant N° 386421) and from Fondation Courtois (Montreal, Quebec, Canada) are gratefully acknowledged. Thanks are due to Drs Bruno Mondovi, Rodolfo Federico and Pompilia Ispas-Szabo for helpful discussions.

CHAPITRE VI

DISCUSSIONS ET CONCLUSION

La C.U et la MC sont les deux formes principales de MII. Elles sont des maladies chroniques, considérées incurables, qui requièrent un traitement d'entretien et peuvent nécessiter une ou plusieurs chirurgies abdominales majeures. Plusieurs facteurs sont reconnus comme étant à risque (Cosnes et al., 2011). Des facteurs, comme l'histamine et des immunomédiateurs associés à la réponse des cellules TH2 sont suspectés d'être impliqués dans ces maladies inflammatoires (He, 2004; Kurosawa et al., 2013). Dans le cas de l'histamine, elle est retrouvée à une forte concentration au niveau du tractus intestinal des patients souffrant d'allergies alimentaires et des MII (Raithel et al., 1995; Knutson et al., 1990; Menningen et al., 1990). De plus, une baisse d'activité de la DAO, principale enzyme dégradant l'histamine au niveau de l'intestin, a aussi été observée dans les muqueuses intestinales ainsi que dans le sérum des patients souffrant de MII (Schmidt et al. 1990; Honzawa et al., 2011). Finalement, chez les patients en rémission, une augmentation de l'activité de la DAO a été constatée (Menningen et al., 1990). Un traitement antihistaminique utilisant la DAO semblait donc une approche à considérer. Toutefois, la DAO est sensible au milieu gastrique et au niveau intestinal pourrait aussi être dégradée par les protéases pancréatiques (trypsine, chymotrypsine). Ainsi, il était nécessaire de réaliser une formulation à base de biopolymères-excipients capable de protéger l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la diamine oxydase.

Dans ce contexte, nous avons proposé une formulation basée sur l'immobilisation de la DAO par inclusion dans des microsphères en utilisant une association du carboxyméthylamidon (CMA) et de l'alginate, comme matrice et la gélation ionotropique pour stabiliser les billes. Le choix de cette matrice a été fait après avoir comparé expérimentalement la capacité de différents biopolymères seuls ou en combinaison (Alginate, Hydroxypropylcellulose (HPC)/Alginate, Chitosane/Alginate ou CMA/Alginate) de former des billes dans une solution de chlorure de calcium. Les microsphères d'alginate sont stables, poreuses et rigide. Par contre, elles se dégradent trop rapidement dans le milieu intestinal simulé (SIF). De plus, à cause de la porosité, il y a une diffusion non désirable de l'acidité vers l'intérieur des billes ou de l'enzyme à travers les pores des microsphères d'alginate. Les microsphères formées par l'association de l'HPC (composé neutre) et l'alginate (charge négative) sont plus compactes que celles d'alginate seules et la DAO ne semble pas être sortie des microsphères. Toutefois, ces microsphères n'ont pas montré de stabilité satisfaisante dans le milieu gastrique et intestinal. Le chitosane (charge positive) interagit ioniquement avec les biopolymères de charge négative comme l'alginate pour former un complexe polyélectrolyte par coacervation. Par contre, les microsphères ont présenté une porosité similaire à celle de l'alginate. Le chitosane s'est avéré être un polymère inadéquat, car le dosage de l'activité a montré une inactivation de la DAO possiblement due à la fréquence élevée des fonctions amine de chitosane. Une autre raison derrière cette inactivation pourrait être le fait que le chitosane est soluble dans le milieu acide permettant un certain accès de l'acidité dans les microsphères alors que la DAO est très sensible au milieu acide (Calinescu et al., 2012).

Le CMA (charge négative) est un biopolymère qui présente des propriétés semblables à l'alginate. Ainsi, il se compacte dans le milieu gastrique et se dissout dans le milieu intestinal. Les microsphères à base de CMA/Alginate complexés avec du Ca^{2+} présentent de bonnes propriétés mécaniques lorsque les polymères sont mélangés à un ratio de 5 : 6 (p/p). Ce ratio a donné des sphères stables et semi-élastiques qui ont

permis d'immobiliser la DAO dans un réseau polymérique à un rendement d'inclusion d'environ 95 %. La masse électrophorétique observée de DAO dans nos conditions dénaturante (en présence de SDS et en absence de 2-mercaptoéthanol et chaleur) était d'environ 90 kDa. Quand à la zymographie, l'activité enzymatique de la DAO a été détectée au même emplacement que sur le gel polyacrilamide.

Le séchage des microsphères par vacuum à 4 °C est une méthode plus douce que l'utilisation de solvants ou une température élevée. Pour les microsphères d'alginate seul, la procédure de séchage est une étape importante, car elle influence la porosité des microbilles: plus elles sont séchées, plus la porosité diminue (Gombotz et Wee, 2012; Bajpai et Sharma, 2004). Toutefois, lorsque les billes d'alginate sont trop séchées, leur surface se casse et risque de faciliter l'érosion de la surface des sphères lors de la réhydratation. Par exemple, pour le bleu de dextran, une grosse molécule dont le poids moléculaire est de 2 000 kDa, immobilisé par inclusion dans les microsphères la libération était plus rapide lorsque les billes ont été totalement séchées (Kim et Lee, 1992). Nous avons envisagé que l'association du CMA à l'alginate pourrait diminuer les cassures sur la surface des microsphères et la libération rapide observée lors d'un séchage.

Les analyses structurales (FTIR, diffraction des rayons X, SEM) ont permis de mettre en évidence la structure des microsphères à base de CMA et d'alginate. Les spectres FTIR des microsphères de CMA/Alginate avec et sans DAO (Figure 5.3) montrent une allure différente au niveau des bandes à environ 3360 et 2930 cm^{-1} . L'augmentation de la bande à 2930 cm^{-1} pour le profil de CMA/Alginate en présence de DAO pourrait être due aux groupes -CH alkyl appartenant à l'enzyme. La diminution de l'intensité d'absorption de la bande hydroxyle (-OH) correspondrait aux effets des liaisons hydrogène entre DAO et le complexe CMS/Alginate. Ainsi le CMS et l'alginate semblent former une matrice stable via une co-complexation avec le calcium qui possède la capacité de stabiliser la DAO immobilisée par inclusion.

Les analyses par diffraction des rayons X (DRX) ont montré une différence importante au niveau de la structure cristalline de l'alginate comparativement à celle du complexe d'inclusion (Figure 5.4), ce qui peut justifier la stabilité observée. Les analyses par microscopie électronique à balayage dévoilent une surface à l'apparence lisse sur les microsphères qui pourrait être due à la formation d'un hydrogel externe par le CMA associé à l'alginate. Les billes de CMA/Alginate présentent aussi des fissures dues au séchage excessif. Ces fissures pourraient signifier une perte de l'intégrité de l'association CMA/Alginate en surface des sphères comme il était mentionné pour les microsphères d'alginate enrobé de chitosane (Shu et Zhu, 2002). Par contre, le comportement des microsphères dans le fluide intestinal simulé (SIF) n'était pas semblable à celui des sphères d'alginate-chitosane avec perte de l'activité enzymatique due au chitosane, donc il est probable que les microsphères de CMA/Alginate ont acquis un certain renforcement, une réduction de la porosité et une plus grande stabilité au niveau de la surface, même après un retrait complet de l'eau tout en conservant l'activité enzymatique. Après une incubation dans diverses solutions, les surfaces semblent être contractées dans le fluide gastrique simulé (SGF) probablement dû à la protonation au niveau des groupements carboxylate ce qui favorise le rétrécissement (Assaad et Mateescu, 2010). Finalement, la surface des microsphères semble se dilater dans SIF ce qui est attribué aux propriétés des fonctions carboxyles du CMA et de l'alginate, qui sont déprotonées, ionisées et rapidement dégradées dans le SIF. À partir de ces résultats, il a été possible de proposer la complexation avec des ions Ca^{2+} et d'une structure hypothétique du complexe CaCMA/Alginate (figure 6.1). Différemment de l'alginate seul qui forme une structure poreuse via la complexation avec le calcium, le CMA seul forme un hydrogel mou qui possède une forte capacité d'hydratation à l'intérieur et à la couche externe des microsphères. Cependant, les analyses structurelles ont montré que le complexe CMA/Alginate présente des propriétés adéquates et qu'il permet l'inclusion de la DAO dans des microsphères par gélation ionotrope.

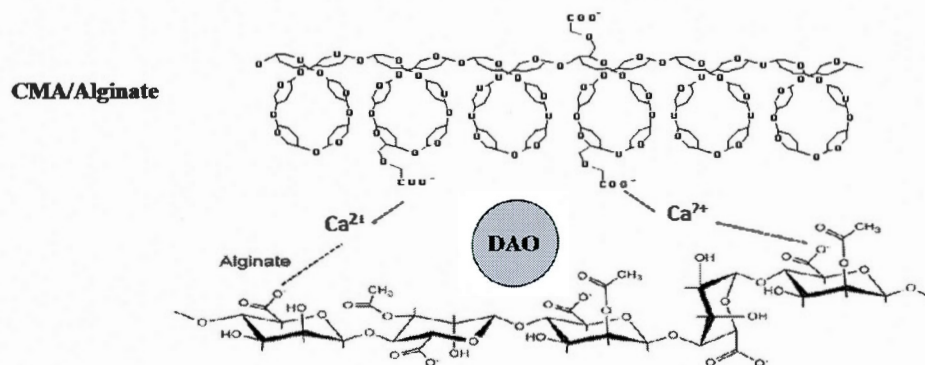


Figure 6.1 Structure hypothétique du complexe CMA/Alginate

Un avantage des microsphères est qu'il est possible de les insérer dans des capsules de gélatine munies d'un enrobage entérique afin de contrecarrer une éventuelle dégradation du principe actif par l'acidité gastrique et l'action de la pepsine. Pour cette raison, il est plus intéressant de s'attarder sur l'état des microsphères dans le milieu intestinal. Toutefois, afin d'élucider le comportement des microsphères CMA/Alginate dans un milieu acide, le profil d'activité de l'enzyme dans le milieu gastrique a été investigué. Les déterminations de l'activité enzymatique dans le milieu simulé gastrique et intestinal ont montré que la matrice constituée d'une association entre le CMA et l'alginate en complexation avec le calcium offre une protection contre l'acidité gastrique, avec environ 70% de l'activité enzymatique conservée dans les microsphères après 2 h d'incubation dans une solution SGF à pH 2.0 alors que, pour la DAO libre, une désactivation totale est constatée dans ce milieu. Dans le fluide gastrique, les groupes carboxylates ont tendance à attirer les protons, ce qui crée un effet de tampon et rend peu disponible l'acidité à interagir avec la DAO dans les microsphères. Les groupes carboxylates du CMA qui ne sont pas liés au Ca^{2+} et ceux appartenant au D-mannuronate de l'alginate offrent donc une certaine protection à la DAO. Des résultats similaires ont été observés par Le (2004) et Calinescu (2005). De plus, Le *et al* (2004) ont montré que la capacité de protection des microsphères est dépendante de la disponibilité des groupes

carboxyates de la matrice polymérique. Dans le milieu SIF en présence de protéases pancréatiques, la DAO libre est capable de résister à la protéolyse et de conserver 80% de son activité durant les premières 8 h avant de perdre graduellement la totalité de son activité enzymatique dans 24 h d'incubation. Cependant, lorsque la DAO est immobilisée par inclusion dans les microsphères, elle conserve 65% de son activité initiale durant les premières 8 h et reste stable jusqu'à 24 h. La baisse d'activité durant la première heure peut être attribuée à une perte d'enzymes à la surface des microsphères. En effet, dans SIF, le polymère s'hydrate et après gonfle et se dégrade suite au déplacement des ions Ca^{2+} du complexe CMA/Alginate par le phosphate pour former le phosphate de calcium (Gombotz et Wee, 2012). La stabilité accrue de la DAO dans les microsphères face à la protéolyse par les enzymes pancréatiques peut être attribuée à l'hydratation des microsphères qui forment un hydrogel. Puisque le CMA et le séchage lent à vide réduisent la porosité, l'érosion des microsphères se produit probablement plus lentement ce qui ralentit aussi la livraison de la DAO dans le milieu intestinal. Le contrôle de la diffusion à travers la couche externe des microsphères pourrait aussi expliquer la résistance de DAO face à la dégradation protéolytique. En effet, dans les microsphères d'alginate, les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 20 kDa (glucose, L-tryptophane, α -lactalbumine) peuvent diffuser à travers les pores de l'alginate indépendamment de la concentration de CaCl_2 utilisé pour gélifier les sphères. La diffusion de grosses molécules (γ -globuline, fibrinogène) est limitée par la concentration de l'alginate. De plus, considérant les lois de l'équilibre, il est possible que la concentration élevée de DAO incluse fait que les protéases du fluide intestinal ne diffusent probablement pas vers l'intérieur des microsphères. Par contre, les molécules immobilisés par inclusion dans les microsphères peuvent lentement diffuser vers l'extérieur (Tanaka et al., 1984). La DAO, une enzyme à grand poids moléculaire, diffuse donc lentement hors des microsphères surtout avec l'érosion tandis que, les enzymes protéolytiques ne peuvent pas passer à l'intérieur pour la dénaturer. Il est aussi probable que les amines biogènes (substrats) présentes dans l'intestin (putrescine, cadaverine, histamine)

diffusent dans les microsphères, un processus probablement favorisé par les fonction carboxylates, leur oxydation en étant catalysée par la DAO. Ainsi, les substrats, qui possèdent des groupes amines (charge positive), pourraient se lier aux groupes carboxyles (charge négative) situés à la surface des microsphères créant une concentration locale de substrats (amine) plus élevée et favorisant ainsi la réaction enzymatique. Ce type de recrutement favorise la pénétration du substrat dans les microsphères et une meilleure conversion enzymatique.

En conclusion, les résultats suggèrent que le rôle du CMA est d'agir comme « filler », c'est-à-dire un agent de remplissage capable d'augmenter la compaction de la surface externe des microsphères. Le CMA semble bénéfique pour le maintien de l'intégrité de la DAO contre la dénaturation gastro-intestinale et contre le séchage excessif.

Pour des futurs travaux, il serait intéressant d'investiguer plus en détail la caractérisation de notre matrice. Par exemple, le CMA pourrait-il modifier la diffusion de différents agents (ex : la lactalbumine) à l'intérieur et l'extérieur des microsphères. Friciu et al., (2013) ont élaboré un complexe à base de lécithine (diglycéride), permettant la livraison ciblée au niveau du côlon de différents agents bioactifs i.e. la mésalamine (acide 5-aminosalicylique) par l'inclusion de la lécithine à l'intérieur de l'hélice du CMA. Dans ce contexte, il a été possible d'immobiliser et de stabiliser, de façon similaire, des huiles oméga-3 dans le CMA. Les oméga-3, naturellement sous forme mono-, di- et triglycérides, sont des antioxydants et pourraient être utiles contre le peroxyde d'hydrogène produit durant la déamination oxydative de l'histamine par la DAO.

ANNEXE

Abstract pour le 97ème Canadian
Chemistry Conference and Exhibition (CSC) à Vancouver 1-5 juin 2014

Carboxymethyl-Starch/Alginate Microspheres
containing Diamine Oxidase for Intestinal Delivery

Lindsay Blemur¹, Tien Canh Le¹, Lucia Marcocci², Paola Pietrangeli², Mircea Alexandru Mateescu^{1*}

¹ Department of Chemistry & Centre BioMed, Université du Québec à Montreal, CP 8888, Succ. A. Montreal (Québec) H3C 3P8, Canada

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

* Corresponding author

Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) including Crohn's disease and ulcerative colitis are considered, in part, caused by an elevated level of histamine, a pro-inflammatory factor. Current antihistaminic drugs, acting on H1 and H2 Histamine receptors can present several side effects. Our project proposes an antihistamine treatment orally administered, which involves a copper oxidase, the diamine oxidase (DAO) also known as Histaminase, of vegetal origin. DAO is expected to degrade histamine at the intestinal level, thus limiting the colon inflammation. In this study, DAO from White Pea (*Lathyrus sativus*) was immobilized by inclusion in microbeads formed by ionotropic gelation from sodium alginate and carboxymethyl starch (CMS) association. Practically, the DAO enzyme was mixed with the solubilized polycarboxylic polymers and the bead-forming solution was dropped into CaCl₂ under fast stirring for formation of microbeads. The microspheres (approximately 900 µm) presented good mechanical properties and an entrapment efficiency of about 82-95%. FTIR, X-ray and SEM data suggested a tightly consistent structure which was able to stabilize and prevent the enzyme leaking from the microbeads. Furthermore, the entrapped enzyme remained active and catalyzed efficiently the substrate oxidative deamination, even in the presence of pancreatin (containing alpha-amylase and proteolytic enzymes). The DAO entrapped in CaCMS/Alginate beads retained up to 70% of its activity in simulated gastric fluid. In simulated intestinal fluid with pancreatin, an overall retention of 65 % of activity for the immobilized DAO was observed over 24 h, whereas in similar conditions the free enzyme was totally inactivated.

BIBLIOGRAPHIE

- Agostinelli, E., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Grancara, S., Toninello, A. et Stevanato, R. (2010). 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.
- Anal, A.K. et Stevens, W.F. (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *Int J Pharm*, 290, 45-54.
- Anderson, C.A., Boucher, G., Lees, C.W., Franke, A., D'amato, M., Taylor, K.D., Lee, J.C., Goyette, P., Imielinski, M. et Latiano, A. (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*, 43, 246-252.
- Argento-Ceru, M. et Autuori, F. (1985). Localization of diamine oxidase in animal tissues. Dans *Structure and functions of amine oxidases* (Mondovì, B. eds), 89-104. Boca Raton : CRC Press.
- Aschenbach, J.R., Honscha, K.U., Vietinghoff, V. et Gaebel, G. (2009). Bioelimination of histamine in epithelia of the porcine proximal colon of pigs. *Inflamm Res*, 58, 269-276.
- Assaad, E., Blemur, L., Lessard, M. et Mateescu, M.A. (2012). Polyelectrolyte Complex of Carboxymethyl Starch and Chitosan as Protein Carrier: Oral Administration of Ovalbumin. *J Biomater Sci Polym Ed*, 23, 1713-1728.
- Assaad, E. et Mateescu, M.A. (2010). The influence of protonation ratio on properties of carboxymethyl starch excipient at various substitution degrees: Structural insights and drug release kinetics. *Int J Pharm*, 394, 75-84.
- 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. *Carbohydr Polym*, 84, 1399-1407.
- Atanasiu, R., Dumoulin, M.-J., Chahine, R., Mateescu, M.A. et Nadeau, R. (1995). Antiarrhythmic effects of ceruloplasmin during reperfusion in the ischemic isolated rat heart. *Can J Physiol Pharmacol*, 73, 1253-1261.

- 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. *Mol Cell Biochem*, 189, 127-135.
- 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. *Arch Biochem Biophys*, 300, 75-79.
- Bajpai, S.K. et Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *React Funct Polym*, 59, 129-140.
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L.A. et Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertility Soils*, 35, 359-368.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliewer, E. et Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 91, 854-862.
- Bernstein, C.N., Wajda, A., Svenson, L.W., Mackenzie, A., Koehoorn, M., Jackson, M., Fedorak, R., Israel, D. et Blanchard, J.F. (2006). The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol*, 101, 1559-1568.
- Binda, C., Mattevi, A. et Edmondson, D.E. (2002). Structure-function relationships in flavoenzyme-dependent amine oxidations. A comparison of polyamine oxidase and monoamine oxidase. *J Biol Chem*, 277, 23973-23976.
- Brazeau, B.J., Johnson, B.J. et Wilmot, C.M. (2004). Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Arch Biochem Biophys*, 428, 22-31.
- Buffoni, F. (2009). History. Dans *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology* (Floris, G. et Mondovi, B. eds). Boca Raton : CRC Press.
- Cai, D. et Klinman, J.P. (1994). Evidence for a self-catalytic mechanism of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in yeast copper amine oxidase. *J Biol Chem*, 269, 32039-32042.

- 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. *Anal Bioanal Chem*, 396, 1281-1290.
- Calinescu, C. et Mateescu, M.A. (2008). Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 70, 582-589.
- 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. *Int J Pharm*, 428, 48-56.
- Calinescu, C., Mulhbachter, J., Nadeau, E., Fairbrother, J.M. et Mateescu, M.A. (2005). Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 60, 53-60.
- Calinescu, C., Nadeau, E., Mulhbachter, J., Fairbrother, J.M. et Mateescu, M.A. (2007). Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation. *Int J Pharm*, 343, 18-25.
- Carter, M.J., Lobo, A.J. et Travis, S.P.L. (2004). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 53 Suppl 5, V1-16.
- 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.
- Clark, A.H. et Ross-Murphy, S.B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Adv Polym Sci*, 83, 57-192.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. et Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci*, 11, 80-88.
- Convention, U.S.P. (2009). *USP 32 NF 27: United States Pharmacopeia [and] National Formulary. Supplement 2.* : United States Pharmacopeial Convention.
- Cooper, R., Knowles, P., Brown, D., Mcguirl, M. et Dooley, D. (1992). Evidence for copper and 3, 4, 6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochem J*, 288, 337-340.

- Coruzzi, G., Morini, G., Adami, M. et Grandi, D. (2001). Role of histamine H3 receptors in the regulation of gastric functions. *J Physiol Pharmacol*, 52, 539-553.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P. et Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140, 1785-1794.
- Dave, M. et Loftus Jr, E.V. (2012). Mucosal healing in inflammatory bowel disease—a true paradigm of success? *Gastroenterol Hepatol (Qué)*, 8, 29.
- Dove, J.E., Smith, A.J., Kuchar, J., Brown, D.E., Dooley, D.M. et Klinman, J.P. (1996). Identification of the quinone cofactor in a lysyl oxidase from *Pichia pastoris*. *FEBS Lett*, 398, 231-234.
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K. et Büschenfelde, K.H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*, 102, 448-455.
- Dumoulin, Y., Cartilier, L.H. et Mateescu, M.A. (1999). Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: an enzymatically-controlled drug release system. *J Control 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 H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol*, 176, 7062-7070.
- Ebrahimnejad, H., Gheisari, H. et Khan Nazer, A. (2013). Pea Seedling Amine Oxidase Application: an Emerging Antihistamine Strategy in Tuna Fish. *J Food Process Technol*, 4, 2.
- Edge, S., Belu, A.M., Potter, U.J., Steele, D.F., Young, P.M., Price, R. et Staniforth, J.N. (2002). Chemical characterisation of sodium starch glycolate particles. *Int J Pharm*, 240, 67-78.
- Feagan, B.G., Rutgeerts, P., Sands, B.E., Hanauer, S., Colombel, J.-F., Sandborn, W.J., Van Assche, G., Axler, J., Kim, H.-J., Danese, S., Fox, I., Milch, C., Sankoh, S., Wyant, T., Xu, J. et Parikh, A. (2013). Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 369, 699-710.
- Federico, R., Befani, O., Mondovi, B., Mulhbacher, J. et Mateescu, M.A. (2000). Immobilization of plant histaminase for medical applications. *Inflamm Res*, 49, S60-S61.

- Federico, R., Cona, A., Caliceti, P. et Veronese, F.M. (2006). Histaminase PEGylation: preparation and characterization of a new bioconjugate for therapeutic application. *J Control Release*, 115, 168-174.
- Fiocchi, C. (2005). Inflammatory bowel disease pathogenesis: Therapeutic implications. *Chin J Dig Dis*, 6, 6-9.
- Fogel, W.A. et Lewinski, A. (2006). The effects of diamine oxidase administration on experimental ulcerative colitis in rats. *Inflamm Res*, 55, S63-S64.
- Fogel, W.A., Toporowska-Kowalska, E. et Stasiak, A. (2009). Copper amine oxidases in intestinal diseases. Dans *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology* (Floris, G. et Mondovi, B. eds). Boca Raton : CRC Press.
- Fogel, W.A., Wagner, W., Sasiak, K. et Stasiak, A. (2005). The role of histamine in experimental ulcerative colitis in rats. *Inflamm Res*, 54, S68-S69.
- Franke, A., Mcgovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., Anderson, C.A., Bis, J.C., Bumpstead, S., Ellinghaus, D., Festen, E.M., Georges, M., Green, T., Haritunians, T., Jostins, L., Latiano, A., Mathew, C.G., Montgomery, G.W., Prescott, N.J., Raychaudhuri, S., Rotter, J.I., Schumm, P., Sharma, Y., Simms, L.A., Taylor, K.D., Whiteman, D., Wijmenga, C., Baldassano, R.N., Barclay, M., Bayless, T.M., Brand, S., Buening, C., Cohen, A., Colombel, J.-F., Cottone, M., Stronati, L., Denson, T., De Vos, M., D'inca, R., Dubinsky, M., Edwards, C., Florin, T., Franchimont, D., Garry, R., Glas, J., Van Gossum, A., Guthery, S.L., Halfvarson, J., Verspaget, H.W., Hugot, J.-P., Karban, A., Laukens, D., Lawrance, I., Lemann, M., Levine, A., Libioulle, C., Louis, E., Mowat, C., Newman, W., Panes, J., Phillips, A., Proctor, D.D., Regueiro, M., Russell, R., Rutgeerts, P., Sanderson, J., Sans, M., Seibold, F., Steinhart, A.H., Stokkers, P.C.F., Torkvist, L., Kullak-Ublick, G., Wilson, D., Walters, T., Targan, S.R., Brant, S.R., Rioux, J.D., D'amato, M., Weersma, R.K., Kugathasan, S., Griffiths, A.M., Mansfield, J.C., Vermeire, S., Duerr, R.H., Silverberg, M.S., Satsangi, J., Schreiber, S., Cho, J.H., Annesse, V., Hakonarson, H., Daly, M.J. et Parkes, M. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 42, 1118-1125.
- 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. *Eur J Pharm Biopharm*, 85, 521-530.
- Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A. et Blumberg, R.S. (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*, 113, 1490-1497.

- Gallai, V. et Sarchielli, P. (2000). Nitric oxide in primary headaches. *J Headache Pain*, 1, 145-154.
- Gantner, F., Sakai, K., Tusche, M.W., Cruikshank, W.W., Center, D.M. et Bacon, K.B. (2002). Histamine H4 and H2 receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8+ T cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 300-307.
- Garcia-Martin, E., Mendoza, J.L., Martinez, C., Taxonera, C., Urcelay, E., Ladero, J.M., De La Concha, E.G., Diaz-Rubio, M. et Agundez, J.a.G. (2006). Severity of ulcerative colitis is associated with a polymorphism at diamine oxidase gene but not at histamine N-methyltransferase gene. *World J Gastroenterol*, 12, 615-620.
- George, M. et Abraham, T.E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *J Control Release*, 114, 1-14.
- Gombotz, W.R. et Wee, S.F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 194-205.
- Gotoh, T., Matsushima, K. et Kikuchi, K.-I. (2004). Preparation of alginate–chitosan hybrid gel beads and adsorption of divalent metal ions. *Chemosphere*, 55, 135-140.
- Guo, Y., Lu, N. et Bai, A. (2013). Clinical use and mechanisms of infliximab treatment on inflammatory bowel disease: a recent update. *Biomed Res Int*, 1-9.
- Guss, J.M., Zanotti, G. et Salminen, T.A. (2009). Copper amine oxidase crystal structures. Dans *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology* (Floris, G. et Mondovi, B. eds), 119-141. Boca Raton : CRC Press.
- Hanauer, S.B. (1996). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 334, 841-848.
- Haug, A., Larsen, B. et Smidsroed, O. (1966). A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chem Scand*, 20, 183-190.
- Haug, A., Larsen, B.R. et Smidsrod, O. (1967). Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem Scand*, 21, 691-704.
- He, S.-H. (2004). Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 309-318.

- Heinze, T., Liebert, T., Heinze, U. et Schwikal, K. (2004). Starch derivatives of high degree of functionalization 9: carboxymethyl starches. *Cellulose*, *11*, 239-245.
- 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. *Inflamm bowel dis*, *17*, E23-E25.
- Hu, W.-W. et Chen, Z. (2012). Role of histamine and its receptors in cerebral ischemia. *ACS Chem Neurosci*, *3*, 238-247.
- Hung, C.-P., Lo, H.-F., Hsu, W.-H., Chen, S.-C. et Lin, L.-L. (2008). Immobilization of *Escherichia coli* novablue γ -glutamyltranspeptidase in Ca-alginate-k-carrageenan beads. *Appl Biochem Biotechnol*, *150*, 157-170.
- Iannitti, T. et Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr*, *29*, 701-725.
- Janes, S., Palcic, M., Scaman, C., Smith, A., Brown, D., Dooley, D., Mure, M. et Klinman, J. (1992). Identification of topaquinone and its consensus sequence in copper amine oxidases. *Biochemistry*, *31*, 12147-12154.
- Jones, B. et Kearns, G. (2010). Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin Pharmacol Ther*, *89*, 189-197.
- Jones, N.L., Roifman, C.M., Griffiths, A.M. et Sherman, P. (1998). Ketotifen Therapy for Acute Ulcerative Colitis in Children (A Pilot Study). *Dig Dis Sci*, *43*, 609-615.
- Juillerat, P., Schneeweiss, S., Cook, E., Ananthakrishnan, A., Mogun, H. et Korzenik, J. (2012). Drugs that inhibit gastric acid secretion may alter the course of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharm Therap*, *36*, 239-247.
- Jutel, M., Watanabe, T., Akdis, M., Blaser, K. et Akdis, C.A. (2002). Immune regulation by histamine. *Curr Opin Immunol*, *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.
- Kim, C.-K. et Lee, E.-J. (1992). The controlled release of blue dextran from alginate beads. *Int J Pharm*, *79*, 11-19.

- 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. *Nat Struct Mol Biol*, 9, 591-596.
- Kivirand, K. et Rincken, T. (2007). Purification and properties of amine oxidase from pea seedlings. *Proc Estonian Acad Sci Chem*, 56, 164-171.
- Knutson, L., Ahrenstedt, O., Odland, B. et Hallgren, R. (1990). The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology*, 98, 849-854.
- 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. *Wien Klin Wochenschr*, 123, 15-20.
- Kornbluth, A. et Sachar, D.B. (2004). Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*, 99, 1371-1385.
- 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.
- Kurosawa, M. et Nagai, H. (2013). Accumulation of Mast Cells in the Lesions and Effects of Antiallergic Drugs on the Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Ulcers*, 2013
- Lacourse, N.L. et Zallie, J.P. (1988). Starch-based jelly gum confections. US patent US4726957.
- Lazik, W., Heinze, T., Pfeiffer, K., Albrecht, G. et Mischnick, P. (2002). Starch derivatives of a high degree of functionalization. VI. Multistep carboxymethylation. *J Appl Polym Sci*, 86, 743-752.
- Le, T.C., Millette, M., Lacroix, M. et Mateescu, M.A. (2004). Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents. *Biotechnol Appl Biochem*, 39, 189-198
- 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. *Int J Pharm*, 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. *AAPS PharmSciTech*, 11, 775-785.
- Lenaerts, V., Dumoulin, Y. et Mateescu, M.A. (1991). Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets. *J Control Rel*, 15, 39-46.
- Li, J., Chen, J. et Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*, 25, 9-18.
- 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 Chem*, 132, 2224-2230.
- Lunelli, M., Di Paolo, M.L., Biadene, M., Calderone, V., Battistutta, R., Scarpa, M., Rigo, A. et Zanotti, G. (2005). Crystal structure of amine oxidase from bovine serum. *J Mol Biol*, 346, 991-1004.
- Ma, L. et Liu, C. (2010). Preparation of chitosan microspheres by ionotropic gelation under a high voltage electrostatic field for protein delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75, 448-453.
- Maintz, L. et Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr*, 85, 1185-1196.
- Makadia, H.K. et Siegel, S.J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3, 1377-1397.
- Masini, E., Bani, D., Marzocca, C., Mateescu, M.A., Mannaioni, P.F., Federico, R. et Mondovì, B. (2007). Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. *Scientific World Journal*, 7, 888-902.
- Masini, E., Cuzzocrea, S., Bani, D., Mazzon, E., Muja, C., Mastroianni, R., Fabrizi, F., Pietrangeli, P., Marcocci, L. et Mondovì, B. (2007b). Beneficial effects of a plant histaminase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock*, 27, 409-415.
- Masini, E., Vannacci, A., Giannini, L., Befani, O., Nistri, S., Alexandru Mateescu, M., Mannaioni, P.F., Mondovì, B. et Federico, R. (2004). Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. *Eur J Pharmacol*, 502, 253-264.

- Masini, E., Vannacci, A., Marzocca, C., Francesco Mannaioni, P., Befani, O., Federico, R., Toma, A. et Mondovi, B. (2002). A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun*, 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. *Int J Pharm*, 356, 212-223.
- Mateescu, M., Lenaerts, V. et Dumoulin, Y. (1994). Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds. Canadian patent 2041774/1994; USA 5 456 921/1995.
- 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. Dans *Protein Electrophoresis* (Kurien, B.T. et Scotfield, H.R. eds), 591-605. : Springer.
- Mateescu, M.A. et Nadeau, R. (2009). Copper amine oxidase as antioxydant and cardioprotectives agents. Dans *Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology* (Floris, G. et Mondovi, B. eds), 253-260. Boca Raton : CRC Press.
- Mateescu, M.-A., Calinescu, C., Ispas-Szabo, P., Mondovi, B. et Federico, R. (2012b). Oral Enzyme Compositions for Intestinal Delivery. US Appl. 61472726/2011.
- 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 Crystallogr F Struct Biol Commun*, 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 Physiol*, 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 Actions*, 30, 264-266.

- Mondovi, B., A Fogel, W., Federico, R., Calinescu, C., A Mateescu, M., C Rosa, A. et Masini, E. (2013). Effects of Amine Oxidases in Allergic and Histamine-Mediated Conditions. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 7, 20-34.
- Mondovi, B. et Finazzi-Agrò, A. (1982). Structure and function of amine oxidases. Dans *Structure and Function Relationships in Biochemical Systems* (Bossa, F., Chiancone, E., Finazzi-Agrò, A. et Strom, R. eds), 141-153. New York : Springer.
- Mondovi, B., Rotilio, G., Costa, M., Finazzi-Agro, A., Chiancone, E., Hansen, R.E. et Beinert, H. (1967). Diamine Oxidase from Pig Kidney Improved purification and properties. *J Biol Chem*, 242, 1160-1167.
- Mondovi, B., Rotilio, G., Finazzi, A. et Scioscia-Santoro, A. (1964). Purification of pig-kidney diamine oxidase and its identity with histaminase. *Biochem J*, 91, 408.
- 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. *J Biol Chem*, 272, 9388-9392.
- Moum, B., Ekbom, A., Vatn, M.H. et Elgjo, K. (1999). Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. *Am J Gastroenterol*, 94, 1564-1569.
- 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. *J Biol Chem*, 269, 9926-9932.
- 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. *J Control Rel*, 76, 51-58.
- 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. *Int J Pharm*, 278, 231-238.
- Mulhbacher, J., Mateescu, M.A. et Calinescu, C. (2005). Composition comprising polymeric material and uses thereof. US Patent Application, priority 60542,299.
- Neurath, M.F. (2014). New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunol*, 7, 6-19.

- Nolte, H., Spjeldnæs, N., Kruse, A. et Windelborg, B. (1990). Histamine release from gut mast cells from patients with inflammatory bowel diseases. *Gut*, 31, 791-794.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R. et Duerr, R.H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 603-606.
- Ohtsu, H. et Watanabe, T. (2003). New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochem Bioph Res Co*, 305, 443-447.
- Okayama, M., Tsubouchi, R., Kato, S. et Takeuchi, K. (2004). Protective effect of lafutidine, a novel histamine H₂-receptor antagonist, on dextran sulfate sodium-induced colonic inflammation through capsaicin-sensitive afferent neurons in rats. *Digest Dis Sci*, 49, 1696-1704.
- 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 Netw*, 6, 393-408.
- 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. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281, L1313-L1323.
- Panaccione, R., Rutgeerts, P., Sandborn, W.J., Feagan, B., Schreiber, S. et Ghosh, S. (2008). Review article: treatment algorithms to maximize remission and minimize corticosteroid dependence in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharm Ther*, 28, 674-688.
- Parsons, M., Convery, M., Wilmot, C., Yadav, K., Blakeley, V., Corner, A., Phillips, S., Mcpherson, M. et Knowles, P. (1995). Crystal structure of a quinoenzyme: copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure*, 3, 1171-1184.
- Pasparakis, G. et Bouropoulos, N. (2006). Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *Int J Pharm*, 323, 34-42.
- Pietrangeli, P., Federico, R., Mondovì, B. et Morpurgo, L. (2007). Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases. *J Inorg Biochem*, 101, 997-1004.
- Quiroga, E., Illanes, C.O., Ochoa, N.A. et Barberis, S. (2011). Performance improvement of *araujiain*, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads. *Process Biochem*, 46, 1029-1034.

- Raithel, M., Küfner, M., Ulrich, P. et Hahn, E. (1999). The involvement of the histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal allergies. *Inflamm Res*, 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 allergic enteropathy. *Int Arch Allergy Immunol*, 108, 127-133.
- Raithel, M., Nägel, A., Zopf, Y., Derossi, T., Stengel, C., Hagel, A., Kressel, J., Hahn, E. et Konturek, P. (2010). Plasma histamine levels (H) during adjunctive H 1-receptor antagonist treatment with loratadine in patients with active inflammatory bowel disease (IBD). *Inflamm Res*, 59, 257-258.
- Rastogi, R., Sultana, Y., Aqil, M., Ali, A., Kumar, S., Chuttani, K. et Mishra, A. (2007). Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. *Int J Pharm*, 334, 71-77.
- Reiser, K., McCormick, R. et Rucker, R. (1992). Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J*, 6, 2439-2449.
- Rubin, G., Hungin, A., Kelly, P. et Ling, J. (2000). Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharm Ther*, 14, 1553-1559.
- Scaldaferri, F. et Fiocchi, C. (2007). Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis*, 8, 171-178.
- Schmidt, W.U., Sattler, J., Hesterberg, R., Röher, 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 Actions*, 30, 267-270.
- Schulze, H., Häslar, R., Mah, N., Lu, T., Nikolaus, S., Costello, C. et Schreiber, S. (2008). From model cell line to in vivo gene expression: disease-related intestinal gene expression in IBD. *Genes Immun*, 9, 240-248.
- Schürks, N., Wingender, J., Flemming, H.-C. et Mayer, C. (2002). Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Biol Macromol*, 30, 105-111.
- 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. *Physiol Plant*, 80, 515-519.

- Sessa, A. et Perin, A. (1994). Diamine oxidase in relation to diamine and polyamine metabolism. *Agents Actions*, 43, 69-77.
- Shu, X. et Zhu, K. (2002). The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect. *Eur J Pharm Biopharm*, 53, 193-201.
- Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I., Bernstein, C.N., Brant, S.R., Caprilli, R., Colombel, J.-F., Gasche, C. et Geboes, K. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*, 19, 5-36.
- Simpson, N.E., Grant, S.C., Blackband, S.J. et Constantinidis, I. (2003). NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials*, 24, 4941-4948.
- Sloan, J., Mehlretter, C. et Senti, F. (1962). Carboxymethyl High-Amylose Starch. *J Chem Eng Data*, 7, 156-158.
- Smidsrød, O. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol*, 8, 71-78.
- Smolinska, S., Jutel, M., Cramer, R. et O'mahony, L. (2014). Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy*, 69, 273-281.
- Sonaje, K., Chen, Y.-J., Chen, H.-L., Wey, S.-P., Juang, J.-H., Nguyen, H.-N., Hsu, C.-W., Lin, K.-J. et Sung, H.-W. (2010). Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly (γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 31, 3384-3394.
- Soni, M.L., Kumar, M. et Namdeo, K. (2011). Sodium alginate microspheres for extending drug release: formulation and in vitro evaluation. *Int J Drug Deliv*, 2
- Stojanović, Ž., Jeremić, K., Jovanović, S. et Lechner, M.D. (2005). A comparison of some methods for the determination of the degree of substitution of carboxymethyl starch. *Starch* \square *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. *Circ Res*, 95, 50-57.
- Strober, W. et Fuss, I.J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140, 1756-1767. e1751.

- Strober, W., Fuss, I.J. et Blumberg, R.S. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation 1. *Annu Rev Immunol*, 20, 495-549.
- 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.
- Sutherland, I.W. (1991). Alginates. *Biomaterials; Novel Materials from Biological Sources*, Stockton, New York, 309-331.
- Szeberenyi, J.B., Pallinger, E., Zsinko, M., Pos, Z., Rothe, G., Orso, E., Szeberenyi, S., Schmitz, G., Falus, A. et Laszlo, V. (2001). Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol Lett*, 76, 175-182.
- Takehita, 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. *J Pharmacol Exp Ther*, 307, 1072-1078.
- Talley, N.J., Locke, G.R., Moayyedi, P., West, J.J., Ford, A.C. et Saito, Y.A. (2013). *GI Epidemiology: Diseases and Clinical Methodology*. New Jersey : Wiley-Blackwell.
- Tanaka, H., Matsumura, M. et Veliky, I. (1984). Diffusion characteristics of substrates in Ca²⁺alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng*, 26, 53-58.
- Thearle, M., Horlick, M., Bilezikian, J., Levy, J., Gertner, J., Levine, L., Harbison, M., Berdon, W. et Oberfield, S. (2000). Osteoporosis: An Unusual Presentation of Childhood Crohn's Disease 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2122-2126.
- Thia, K.T., Loftus, E.V., Sandborn, W.J. et Yang, S.-K. (2008). An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol*, 103, 3167-3182.
- Tijssen, C., Kolk, H., Stamhuis, E. et Beenackers, A. (2001). An experimental study on the carboxymethylation of granular potato starch in non-aqueous media. *Carbohydr Polym*, 45, 219-226.
- Tønnesen, H.H. et Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 28, 621-630.

- Tozaki, H., Komoike, J., Tada, C., Maruyama, T., Terabe, A., Suzuki, T., Yamamoto, A. et Muranishi, S. (1997). Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon. *J Pharm Sci*, 86, 1016-1021.
- Vind, I., Riis, L., Jess, T., Knudsen, E., Pedersen, N., Elkjær, M., Andersen, I.B., Wewer, V., Nørregaard, P. et Moesgaard, F. (2006). Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003–2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database. *Am J Gastroenterol*, 101, 1274-1282.
- Vlieg-Boerstra, B., Van Der Heide, S., Oude Elberink, J., Kluin-Nelemans, J. et Dubois, A. (2005). Mastocytosis and adverse reactions to biogenic amines and histamine-releasing foods: what is the evidence? *Neth J Med*, 63, 244-249.
- Volkert, B., Loth, F., Lazik, W. et Engelhardt, J. (2004). Highly substituted carboxymethyl starch. *Starch-Stärke*, 56, 307-314.
- Wilmot, C.M., Murray, J.M., Alton, G., Parsons, M.R., Convery, M.A., Blakeley, V., Corner, A.S., Palcic, M.M., Knowles, P.F. et Mcpherson, M.J. (1997). Catalytic mechanism of the quinoenzyme amine oxidase from *Escherichia coli*: exploring the reductive half-reaction. *Biochemistry*, 36, 1608-1620.
- Xie, H. et He, S.-H. (2005). Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 11, 2851-2857.
- Yu, G., Liang, J., He, Z. et Sun, M. (2006). Quantum dot-mediated detection of γ -aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco. *Chem Biol*, 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. *Biochim Biophys Acta*, 1647, 193-199.