



HAL
open science

Le frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) : Stratégies d'études sur l'identification de nouvelles molécules actives pour la dermacosmétique

Thao Nhi Le

► **To cite this version:**

Thao Nhi Le. Le frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) : Stratégies d'études sur l'identification de nouvelles molécules actives pour la dermacosmétique. Chimie analytique. Université d'Orléans, 2020. Français. NNT : 2020ORLE3143 . tel-03774129

HAL Id: tel-03774129

<https://theses.hal.science/tel-03774129>

Submitted on 9 Sep 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT
Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :
Thao Nhi LE

soutenue le : 13 mars 2020

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**
Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

Le frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) : Stratégies d'études sur l'identification de nouvelles molécules actives pour la dermacosmétique

THÈSE dirigée par :

Benoît MAUNIT
David DA SILVA

Professeur, Université Clermont Auvergne
Maître de Conférences, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Michel TREILHOU
Patrick CHAIMBAULT

Professeur, Institut National Universitaire Champollion
Professeur, Université de Lorraine

JURY :

Richard DANIELLOU
Michel TREILHOU
Patrick CHAIMBAULT
Estelle PUJOS-GUILLOT
Eric DARROUZET
David DA SILVA
Benoît MAUNIT

Professeur, Université d'Orléans, Président du jury
Professeur, Institut National Universitaire Champollion
Professeur, Université de Lorraine
Docteur-HDR, Université Clermont Auvergne
Maître de Conférences — HDR, Université de Tours (membre invité)
Maître de Conférences, Université d'Orléans
Professeur, Université Clermont Auvergne

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (**ICOA**) d'Orléans au sein de l'équipe « Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs ». Je tiens à remercier, le Professeur **Pascal BONNET**, directeur de l'ICOA, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie, tout particulièrement les **Professeurs Michel TREILHOU** et **Patrick CHAIMBAULT**, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier le **Docteur Estelle PUJOS-GUILLOT**, **Professeur Richard DANIELLOU**, **Docteur Éric DARROUZET** d'avoir accepté d'évaluer de ces travaux en qualité d'examineur.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le **Professeur Benoît MAUNIT**, qui m'a fait confiance en me permettant de réaliser ce projet de thèse, pour sa gentillesse, ses soutiens et ses conseils avisés malgré la distance.

Je tiens tout particulièrement à remercier le **Docteur David DA SILVA**, mon encadrant de thèse pour ses soutiens, sa disponibilité, son enthousiasme, sa patience et tous ses conseils ainsi que nos discussions tant sur le plan scientifique que le plan humain tout au long de ces trois années. Je tiens à lui adresser ma profonde reconnaissance.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude au **Docteur Cyril COLAS** pour ses conseils, son aide et nos échanges divers qui m'ont permis d'enrichir les compétences en spectrométrie de masse.

Je n'oublierai pas de remercier tous les membres du **consortium du projet Freloncosm'** d'avoir initié ce projet de thèse. Je remercie très sincèrement le **Docteur Patrick BARIL** pour sa collaboration et de m'avoir ouvert les portes de son équipe au CBM, de m'avoir facilité à réaliser les expériences biologiques ainsi qu'obtenir des résultats essentiels. J'adresse mes remerciements au **Docteur Éric DARROUZET** de l'IRBI pour sa collaboration dans les collectes des frelons asiatiques dans le cadre de notre échantillonnage. Je remercie également les **Docteurs Lucie PETIT-LESEURRE** et **Vincent AUCAGNE** pour ses collaborations.

J'adresse mon remerciement au **Docteur Emmanuel PERCHERON**, manager administratif et scientifique du programme **ARD 2020 Cosmétosciences** pour m'avoir aidé au long du projet du côté financier.

J'adresse mes remerciements au **Professeur Richard DANIELLOU** ainsi qu'au **Docteur Pierre LAFITE** de m'avoir accueilli dans leur équipe et leurs aides dans les manipulations biologiques (SDS-PAGE, essai Bradford, Spectrophotométrie).

Je tiens à remercier **M. Yoan LAURENT** du CBM pour ses aides, ses manipulations de ROS ainsi que de cicatrisation sur les cellules kératinocytes.

Je tenais également à remercier l'ensemble des permanents, des post-doctorants, des doctorants et stagiaires qui composent l'équipe « **Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs** » et **l'ICOA**. Je tiens à remercier particulièrement **Justine, Adrien, Ghassan, Thibault, Souhila, Jeremy, Angéline, Rouba, Laurine, Quentin, Elise, Syntia, Gaëlle, Laëticia, Emilie, Florian, Reine, Sandrine, Suong et Matéja, Philippe, Arnaud** de l'équipe « GlycoBio & Chimie » pour leurs gentilleses et pour l'ambiance du laboratoire sympathique et conviviale qu'ils m'ont apportée.

Enfin, un grand merci à toutes ma famille, particulièrement mes parents, ma sœur pour leurs soutiens et leur encouragement au long de ces années de thèse. Une profonde affection et un grand merci à mon mari, **Minh-Duc** pour son soutien, sa compréhension et malgré la distance, sa présence et encouragements dans tous les moments difficiles m'ayant permis d'avancer bien ma thèse et ma vie.

Liste des publications et des communications

Publications

“Asian hornet *Vespa velutina nigrithorax* venom: Evaluation and identification of the bioactive compound responsible for human keratinocyte protection against oxidative stress”

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *Toxicon*, 176 (2020), 1-9

“Development of an LC–MS multivariate nontargeted methodology for differential analysis of the peptide profile of Asian hornet venom (*Vespa velutina nigrithorax*): application to the investigation of the impact of collection period variation”

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *Anal Bioanal Chem* (2020), doi:10.1007/s00216-019-02372-2

Publication en cours

“Investigation of the Ligand/Enzyme interactions and identification of two new elastase substrates from the Asian hornet venom by enzyme-coupled magnetic nanoparticles approach with mass spectrometry”

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *en rédaction*.

Communications orales

Congrès international

« Evaluation of cosmetic interest of Asian Hornet venom (*Vespa velutina*) »

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *International Mass Spectrometry Conference (IMSC)*, Florence, Italie, 26-31 août 2018

Congrès national

« Évaluation du potentiel antioxydant et identification des composés actifs dans le venin de frelon asiatique »

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *XXIIIème RCJSM*, Saint-Martin-de-Londres, 26-30 mars 2018

«Evaluation du potentiel antioxydant du venin de frelon asiatique »

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *Séminaires Cosmetosciences*, Orléans, 2018

«L’HPTLC, outil de caractérisation d’activités enzymatiques et criblage d’actifs naturels végétales ou animaux»

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *Club CCM*, Montpellier, 27- 28 juin 2018

Communications par affiches

« Venin du frelon asiatique :la source des molécules bioactives dans le dermacosmétique»

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *Biotechnocentre*, Seillac 12 et 13 Octobre 2017

«Comparing the profiles of Yellow-legged hornet venom (*Vespa velutina nigrithorax*) to evaluate the influence of seasonal variation»

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *IMSC*, Florence, Italie, 26-31 août 2018

« Développement d'une approche peptidomique LC-HRMS dans le cadre de recherche d'actifs cosmétiques issus de différent "sourcing" de venin de frelons asiatiques (*Vespa velutina nigrithorax*)»

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *13^{ème} congrès francophones sur les Scientifiques Séparatives et les Couplage de l’AFSEP (SEP 19)*, Paris, 25-28 mars 2019. **Prix de CIFL pour le meilleur poster industriel.**

« Freloncosm’ : Stratégie de « sourcing » et d’identification des molécules bioactives à partir de venin de frelon asiatique pour la dermo-cosmétique »

Thao Nhi LE, David Da Silva, Cyril Colas, Eric Darrouzet, Patrick Baril, Lucie Leseurre, Benoît Maunit, *Colloque ARD 2020 Cosmétosciences*, Orléans, 15 février 2019

Abréviations

ALC : Average Local Confidence

ANOVA : Analysis Of Variance ».

BSA: Bovine Serum Albumin

CID: Collision-Induced Dissociation

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CV: Coefficient Of Variation

DoE : Design Of Experiment

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

ECM: Extracellular Matrix

EIC : Extracted-Ion Chromatogram

ESI : Electrospray Ionization

FC : Fold Change

FIA : Flow Injection Analysis

FRAP : Ferric Reducing-Antioxidant Power

HCCA : Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid

HPLC-DAD: High-Performance Liquid Chromatography–Diode Array

HRMS/MS: High Resolution Mass Spectrometry/Tandem Mass Spectrometry

IC50: Half Maximal Inhibitory Concentration

IF: Ion Fading

IH: Ion Hunting

IQR: Interquartile Range

L-DOPA: L-3,4-Dihydroxyphenylalanine

LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LMWC : Low Molecular Weight Compounds

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

MMP : Matrix Metalloproteinase

MPs : Magnetic Particles

MRM : Multiple Reaction Monitoring

MW: Molecular Weight

MWCO : Molecular Weight Cut-Off

PC : Principal Component

PCA : Principal Component Analysis

PLS-DA : Partial Least Square Discriminant Analysis

PTM : Post-Translational Modification

QC: Quality Control

QTOF : Quadrupole-Time Of Flight

RI: Reliability Index

RMSE: Root Mean Square Error

ROS : Reactive Oxygen Species

RP: Reliable Peaks

RSA : Radical Scavenging Activity

SDS PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SEC: Size-Exclusion Chromatography

SOD : Superoxide Dismutase

SPE : Solid Phase Extraction

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TLC: Thin Layer Chromatography

TOF : Time-Of-Flight

UHPLC : Ultra-High Performance Liquid Chromatography

UP : Unreliable Peaks

UV : Ultraviolet

V. *Velutina*: *Vespa Velutina nigrithorax*

VIP : Variable Importance In The Projection

Sommaire général

Introduction générale	1
Références.....	7
Chapitre I: Évaluation du potentiel moléculaire du venin de frelon asiatique dans le domaine de la dermacosmétique.....	9
Table des matières	10
Introduction.....	11
1 Le domaine de la dermacosmétique	11
1.1 La structure de la peau	11
1.2 Les traductions du vieillissement de la peau	14
1.3 L'intérêt de la recherche des molécules bioactives d'origine naturelle pour l'application cosmétique	39
2 Potentiel moléculaire des venins du monde animal	47
2.1 Qu'est-ce qu'un venin ?	47
2.2 Ordre des Hyménoptères	49
2.3 Apport du venin en cosmétique	54
3 Le Frelon asiatique (<i>Vespa velutina nigrithorax</i>) et son venin	56
3.1 Organisation sociale du frelon asiatique	56
3.2 La composition du venin de frelon asiatique.....	60
Conclusion	61
Références.....	62
Chapitre II: Recherche des molécules bioactives issues du venin frelon asiatique : Stratégies et méthodologies	69
Introduction.....	71
1 Présentation schématique des deux stratégies développées dans le cadre de notre étude	72
2 La méthodologie d'échantillonnage et protocole	73
2.1 La collecte du venin brut: description des différentes méthodologies	73
2.2 Les Techniques de séparation et quantification des protéines de venin.....	77
2.3 Protocole mis en place pour la collecte du venin de frelon asiatique à partir de frelons congelés	81
3 Stratégie ciblant l'activité du venin brut ou fractionné.....	86
3.1 Criblage basé sur des allégations cosmétiques.....	86
3.2 Techniques de fractionnement du venin	87
3.3 Apport de la spectrométrie de masse dans l'identification et caractérisation de venin	102
4 Stratégie ciblant l'étude de « sourcing » (discrimination des fractions peptidiques < 10 kDa), leurs interactions Ligand/enzymes et leurs identifications.....	117
4.1 Criblage de molécules dicriminantes : Procédure de processing des données et analyse statistique (PCA, PLS-DA)	118
4.2 Criblage d'interactions ligands/enzymes par spectrométrie de masse ESI-QTOF-HRMS	121
4.3 Stratégies de caractérisation des structures primaires des peptides par spectrométrie de masse	125
Conclusion	129
Référence	130
Chapitre III: Mélange complexe du venin - La recherche des molécules bioactives pour l'application cosmétique	135
Table des matières	136
Introduction.....	137
1 Action potentielle du venin de frelon sur les activités enzymatiques cutanées	138

1.1	Evaluation de l'action inhibitrice sur l'enzyme élastase du pancréas porcin	139
1.2	Evaluation de l'action inhibitrice sur l'enzyme collagénase extraite de <i>Clostridium histolyticum</i>	141
1.3	Évaluation de l'action inhibitrice sur la tyrosinase de champignon	143
2	Activité anti-oxydante du venin brut de frelon asiatique <i>V. velutina</i>	145
2.1	Caractérisation de molécule responsable de l'activité scavenging des radicaux libres.....	145
2.2	Étude des différents mécanismes antioxydants du venin et de la sérotonine	166
3	Activité antimicrobienne du venin	174
3.1	Protocoles d'évaluation l'activité antimicrobienne	175
3.2	Étude sur l'activité antimicrobienne du venin Vv et de la fraction Vv < 10 kDa	176
3.3	Tests d'activité antimicrobienne sur les fractions F'2 à F'6 issues du venin brut	177
	Conclusion	178
	Références.....	180
	Chapitre IV: Apport d'une approche multivariée dans l'étude de « sourcing » et caractérisation des molécules discriminantes	185
	Table des matières	186
	Introduction.....	187
	Partie I : Étude du « sourcing » de venin de frelon asiatique : Approche peptidomique pour une investigation de variation intraspécifique et recherche de marqueurs potentiels dans le venin	188
1	Développement d'une méthode analytique multivariée pour comparer les profils peptidiques des différents venins	188
2	Influence des comportements (ouvrière prédatrice) sur la composition du venin de frelon asiatique.....	207
2.1	Échantillonnage des venins : ouvrières prédatrices et ouvrières au sein du nid	208
2.2	Comparaisons des profils.....	209
2.3	Effet prédateur ou non : molécules discriminantes et communes entre 2017-2018.....	211
3	Influence de la nature de la caste du frelon asiatique sur la composition du venin de frelon asiatique.....	212
3.1	Echantillonnage des venins : castes (reines, fondatrices et ouvrières) au sein du nid	213
3.2	Comparaisons des profils.....	213
3.3	Molécules discriminantes en 2017	215
	Partie II : Mise en place d'une méthode de criblage d'interaction Ligand/enzymes immobilisée basée sur la spectrométrie de masse : Apport de l'approche Ion-Fading/Ion-Hunting couplée à l'ESI-MS sur le criblage de venin de frelon	220
4	Criblage de candidat possédant une interaction ligand/enzyme au sein des fractions peptidiques de venin de frelon	220
4.1	Préparation des fractions peptidiques.....	220
4.2	Mise en place de l'approche d'immobilisation des enzymes sur un support solide de billes magnétiques	223
	Partie III : Séquençage <i>de novo</i>	235
5	Mise en place d'une approche de séquençage <i>de novo</i> pour une caractérisation préliminaire des peptides de venin de frelon asiatique	235
5.1	Preuve de concept de l'approche séquençage <i>de novo</i> sur les peptides de BSA digérée par logiciel PEAKS Studio et Biotools	236
5.2	Séquençage <i>de novo</i> sur les peptides du venin de <i>V. velutina</i>	243
	Conclusion	256
	Références.....	259
	Conclusion générale et perspectives	263
	Table des figures	269

Table des tableaux	274
Annexe	277
ANNEXE 1 : Protocoles	278
ANNEXE 2 : Figures et Tableaux supplémentaires	285

Introduction générale

Le développement industriel et technologique, les sources de stress, la pollution environnementale de par l'utilisation des pesticides, des insecticides entraînent un vieillissement prématuré de la peau. D'autres facteurs tels qu'un mode de vie de plus en plus sédentaire, une mauvaise alimentation riche en sucres et en graisses saturées, le manque de sommeil contribue également à accélérer le vieillissement de la peau. Compte tenu d'une demande toujours plus importante pour de nouveaux soins anti-âge toujours plus performants, la mise sur le marché de nouveaux ingrédients est un défi à la fois pour les chercheurs et les industriels. Depuis des siècles, les composés d'origine naturelle sont largement employés pour l'usage traditionnel en cosmétiques. Il existe aujourd'hui, sur le marché, une grande variété de produits cosmétiques contenant des extraits de plantes ou des principes actifs naturels. À titre d'exemple, les Chinois emploient l'extrait de champignon *Ganoderma* dans la médecine traditionnelle comme un anti-âge grâce à sa capacité stimulante et régulatrice du système immunologique [1]. Autre exemple, l'extrait de feuille de mûrier est largement ajouté dans les crèmes anti-âge dues à sa capacité d'inhiber l'activité enzymatique de l'élastase et de la métalloprotéinase-1 qui dégrade la fibre de collagène.

[1] Depuis quelques années, une nouvelle source naturelle exploitée par les enseignes cosmétiques dans la formulation de soins anti-âges concerne le venin du règne animal, tel que le venin de vipère *Tropidolaemus wagleri* [2] présent par exemple dans la crème anti-ride Syn®Ake Centerchem (Norwalk, US). Elle est composée principalement d'un tripeptide synthétisé mimant l'effet de waglerin 1, un peptide naturel issu du venin de cette vipère *Tropidolaemus wagleri* induisant la réduction de la contraction musculaire en bloquant le récepteur de nicotine musculaire acétycholine (mnAChR) [3]. D'autres venins sont également utilisés dans le domaine cosmétique tel que le venin d'abeilles ou apitoxine (*Apis mellifera* [4]) dû aux effets tenseur et relaxant sur la peau de la mellitine et de l'apamine qu'il contient. D'ailleurs, le venin d'araignée appartenant au genre *Argiope* ou *Araneus* peut prévenir l'hyperpigmentation grâce à des analogues synthétiques de l'argiotoxine ayant une activité DOPA oxydase inhibitrice et une activité DHICA oxydase inhibitrice (FR2994847A1, 2013, laboratoire In'Oya, France) [5]. En 2017, un nouveau produit neurocosmétique le SensAmoné P5 a été introduit sur le marché par Mibelle Biochemistry (Buchs, Suisse). Il a pour effet principal de réduire la sensibilité de la peau (anti rougeurs). Ce produit est composé d'un pentapeptide possédant une séquence de la protéine active présente dans le venin de l'anémone de mer qui inhibe le récepteur de douleur TRPV1 dans la peau.

Ainsi, le screening du venin d'origine animale par différentes méthodes analytiques et tests biologiques in-tubo est une étape primordiale afin d'identifier un ou plusieurs composants bioactifs

vis-à-vis d'allégations cosmétiques telles que blanchiment de la peau, anti-âge, régénération, cicatrisation. Effectivement, un venin est un milieu complexe de biomolécules de masse moléculaire étendue pouvant être réunies en deux fractions : une fraction protéique et peptidique qui représente environ 90 % du poids sec du venin et une fraction non peptidique dans laquelle on retrouve des amines biogènes, des sucres, des nucléotides, des nucléosides et acides nucléiques. Cette diversité moléculaire confère potentiellement aux venins un intérêt tout particulier en tant que source de molécules bioactives dans le domaine dermocosmétique. En final, le venin, la ou les molécules montrées comme bioactives ou bien les analogues synthétiques dérivés de celles-ci pourront alors être utilisés comme agent cosmétiques.

C'est dans ce contexte que nos études, au sein du projet **FrelonCosm'** financé par la Région Centre Val de Loire dans le cadre de **l'ARD 2020 Cosmétosciences**, se sont concentrées sur **la recherche de nouveaux agents bioactifs issus du venin de frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) en vue d'une application cosmétique**. Le projet FrelonCosm' regroupe trois partenaires spécialisés dont trois unités de recherche académiques l'Institut de Chimie Organique et Analytique (**ICOA**) UMR CNRS 7311 de l'Université d'Orléans, Centre de Biophysique Moléculaire (**CBM**) UPR4301 de CNRS, l'Institut de Recherche sur la Biologie des Insectes (**IRBI**) UMR CNRS 7261 de l'Université de Tours, et la société **CHIMEX** (groupe L'Oréal) en tant que partenaire industriel.

Le mémoire présenté ici s'articulera autour de quatre chapitres qui seront présentés comme suit :

Tout d'abord, le **chapitre I** présentera le **contexte général** de cette étude concernant les mécanismes et acteurs impliqués dans le vieillissement de la peau avant d'explicitier les stratégies scientifiques engagées pour rechercher de nouveaux ingrédients cosmétiques afin d'atténuer les signes de vieillissement. Nous nous intéresserons à décrire l'intérêt des venins animaux pour un usage cosmétique basé sur leur contenu moléculaire en insistant particulièrement sur les connaissances actuelles sur le frelon asiatique *Vespa velutina*.

Le **chapitre II** présentera les **méthodologies et protocoles** mis en place répondant à quatre principaux objectifs de nos recherches dont les deux premiers concernent le développement d'une méthode d'échantillonnage de venin à partir de frelon asiatique afin de récupérer la composition du venin en protéines, peptiques et petites molécules, et le criblage des activités cosmétiques du

venin de frelon asiatique sur une série des tests chimiques et enzymatiques (collagénase, élastase, tyrosinase) en parallèle des tests cellulaires (activités antioxydantes et antimicrobiennes et cytotoxicité). Parmi ces tests, le venin a présenté un potentiel antioxydant à la fois qualitativement et quantitativement au niveau de tests chimiques tels que le DPPH (Free radical scavenging assay) et FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), mais également cellulaire sur les cellules HaCAT lors d'un test ROS (Reactive Oxygen Species). Les deux derniers objectifs visent : **i)** la mise en place d'approche analytique chromatographique en couche mince (TLC) et en phase liquide UHPLC-ESI-QTOF-HRMS permettant l'identification de(s) molécule(s) ayant montré une activité biologique d'intérêt cosmétique et **ii)** l'application des approches ciblées et non ciblées pour une identification d'actifs ainsi qu'une discrimination des profils peptidiques et de petites molécules issues des différents venins par UHPLC-HRMS (MS/MS) et le recours à des traitements statistiques des données type PCA. Les molécules ou peptides discriminants identifiés à partir de cette démarche statistique comparative seront alors évalués sur leur capacité d'interagir avec des enzymes spécifiques (tyrosinase, élastase) en utilisant les stratégies originales « Ion Fading » ou « Ion Hunting » basées sur des enzymes immobilisées sur support solide. Cette méthodologie a pour objectif de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs ou de substrats dans des fractions plus ou moins complexes à travers l'évaluation de leurs interactions avec l'enzyme par spectrométrie de masse. À l'issue de ces stratégies, une approche de séquençage *de novo* sera alors appliquée afin de proposer les structures des peptides d'intérêt.

Le **Chapitre III** présentera dans un premier temps les **résultats des réponses en termes d'activité** du venin brut du frelon asiatique et ses fractions peptidique ou protéique sur les cibles enzymatiques **tyrosinase, élastase, collagénase** impliquées dans les processus de vieillissement de la peau. En parallèle, les résultats concernant la recherche de molécules issues du venin brut à activité **antioxydante** sur l'activité de piégeage d'espèces réactives oxygénées et **antimicrobiennes** seront également abordés et discutés.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec l'Institut de Recherche sur la Biologie des Insectes (IRBI) UMR CNRS 7261 de l'Université de Tours qui a fourni les frelons, le Centre Biophysique Moléculaire de l'Université d'Orléans au sein duquel ont été menés les tests cellulaires, l'équipe GlycoBio&Chimie de l'Institut de Chimie Organique et

Analytique de l'Université d'Orléans pour les tests spectrophotométriques et les méthodes SDS-PAGE et l'entreprise GlycoDiag pour les études sur les approches antimicrobiennes.

Le **chapitre IV**, concernera le développement d'une **méthode peptidomique**, basée sur une approche classique de métabolomique dite « non ciblée », afin de comparer les profils peptidiques des différents venins issus de frelons collectés à **différentes saisons** ou correspondant à **différentes castes**. L'application de cette méthodologie permettra de mettre en évidence, à l'aide **d'outils statistiques** (analyse multivariée non supervisée ou supervisée), la discrimination ou la similarité des profils de venin de frelon collectés dans différentes conditions à travers l'identification de **marqueurs discriminants** parmi ces populations. À l'issue de cette identification, une approche préliminaire de criblage d'interaction **Ligand/Enzyme (Ion Fading/Ion Hunting)** basée sur une détection par spectrométrie de masse sera développée pour investiguer la capacité ligand-enzyme de certains peptides de venin avec l'enzyme élastase et tyrosinase. Les résultats de cette étude seront alors corrélés avec ceux obtenus lors de l'étude peptidomique et permettront ainsi de ressortir les molécules d'intérêts en vue d'une collecte ou d'une synthèse de petites molécules ou peptides, dont la séquence des acides aminés a été évaluée par **séquençage de novo**, en vue d'une validation d'activité et mesure de cytotoxicité telle que développée au chapitre III.

Les recherches présentées dans ce mémoire s'inscrivent dans la prospection de nouvelle source potentielle de nouveaux composés pour prévenir ou atténuer le vieillissement de la peau et également pour améliorer l'image de soi, priorités des recherches actuelles dans les cosmétiques actifs. Un des nombreux challenges est la conception, la fabrication ou l'isolement de nouvelles substances dépigmentantes non irritantes, non toxiques et/ou non allergisantes pour la peau aussi efficace que celles connues tout en étant stables dans une composition, challenge dans lequel entrent en plein ces travaux de thèse. De plus, ces derniers représentent également une manne d'informations contribuant à une meilleure connaissance de cet insecte : **le frelon asiatique *Vespa Velutina***.

◇◇◇

Références

- [1] P. Elsner, R. Sivamani, J. Jagdeo, and H. Maibach, *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*. CRC Press, 2015.
- [2] A. N. Balaev, K. A. Okhmanovich, and V. N. Osipov, "A shortened, protecting group free, synthesis of the anti-wrinkle venom analogue Syn-Ake (R) exploiting an optimized Hofmann-type rearrangement," *Tetrahedron Letters*, vol. 55, pp. 5745–5747, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.tetlet.2014.08.117.
- [3] A. C. Zimmerman and D. A. O'Toole, "Skin firming and lifting compositions and methods of use," US7700110B2, Apr. 20, 2010.
- [4] H. Lee *et al.*, "Anti-wrinkle Effect of PLA2-free Bee Venom against UVB-irradiated Human Skin Cells," *J. Agric. Life Sci.*, vol. 49, pp. 125–135, Feb. 2015, doi: 10.14397/jals.2015.49.1.125.
- [5] M. Verdoni *et al.*, "ArgTX-636, a polyamine isolated from spider venom: A novel class of melanogenesis inhibitors," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 24, no. 22, pp. 5685–5692, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.bmc.2016.08.023.

**Chapitre I: Évaluation du potentiel
moléculaire du venin de frelon
asiatique dans le domaine de la
dermacosmétique**

Table des matières

Chapitre I: Évaluation du potentiel moléculaire du venin de frelon asiatique dans le domaine de la dermacosmétique.....	9
Table des matières	10
Introduction.....	11
1 Le domaine de la dermacosmétique	11
1.1 La structure de la peau	11
1.2 Les traductions du vieillissement de la peau	14
1.2.1 Généralité de la sénescence.....	14
1.2.2 Tyrosinase – La clé d’or pour le traitement d’hyperpigmentation de la peau	16
1.2.3 L’élastine et le collagène : comment limiter une action trop importante des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire	24
1.2.4 Antioxydant sur l’anti-âge de la peau.....	32
1.3 L’intérêt de la recherche des molécules bioactives d’origine naturelle pour l’application cosmétique	39
1.3.1 Le végétal comme source de principes actifs.....	40
1.3.2 Les molécules actives issues des animaux.....	41
1.3.3 La place des peptides dans les cosmétiques	42
2 Potentiel moléculaire des venins du monde animal	47
2.1 Qu’est-ce qu’un venin ?	47
2.2 Ordre des Hyménoptères	49
2.2.1 La classification des insectes	49
2.2.2 La composition des venins des Hyménoptères	51
2.3 Apport du venin en cosmétique	54
2.3.1 Le venin d’abeille en cosmétique	54
2.3.2 Le venin de frelon en cosmétique	55
2.3.3 Le venin d’autres animaux en cosmétique.....	55
3 Le Frelon asiatique (<i>Vespa velutina nigrithorax</i>) et son venin	56
3.1 Organisation sociale du frelon asiatique	56
3.2 La composition du venin de frelon asiatique.....	60
Conclusion	61
Références.....	62

Introduction

Dans ce chapitre seront présentées des **notions générales** sur la dermacosmétique suivies par les stratégies utilisées pour lutter contre le vieillissement et l'amélioration de l'image de soi. Puis, nous nous focaliserons sur les modes d'utilisation des composés d'origine naturelle dans l'industrie cosmétique, et sur l'exploitation des potentiels dermacosmétiques des venins de la famille des hyménoptères en nous concentrant sur celui du frelon asiatique.

1 Le domaine de la dermacosmétique

Les cosmétiques sont constitués de produits appliqués sur les parties superficielles du corps humain pour protéger, parfumer et améliorer l'image de soi. Parmi les aspects cosmétiques, la dermacosmétique attire le plus grand intérêt des scientifiques dans la recherche de produits innovants. La peau est le plus grand organe de notre corps et joue un rôle de protection des organes intérieurs contre les impacts de l'environnement. De cette manière, elle constitue une barrière protectrice qui subit de nombreuses altérations provoquées par l'influence de l'environnement sur l'humain. Comprendre la structure et le mode d'action du système de la peau permettrait de déterminer une stratégie de recherche d'ingrédients bioactifs.

Dans cette partie sont présentées les connaissances générales sur la structure de la peau, les cibles enzymatiques impliquées et les mécanismes de vieillissement permettant de développer des stratégies de lutte contre le vieillissement de la peau

1.1 La structure de la peau

La peau agit comme une barrière naturelle couvrant la surface externe du corps, protégeant les organes et minimisant la déshydratation [1], [2]. La peau se compose de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure I.1**).

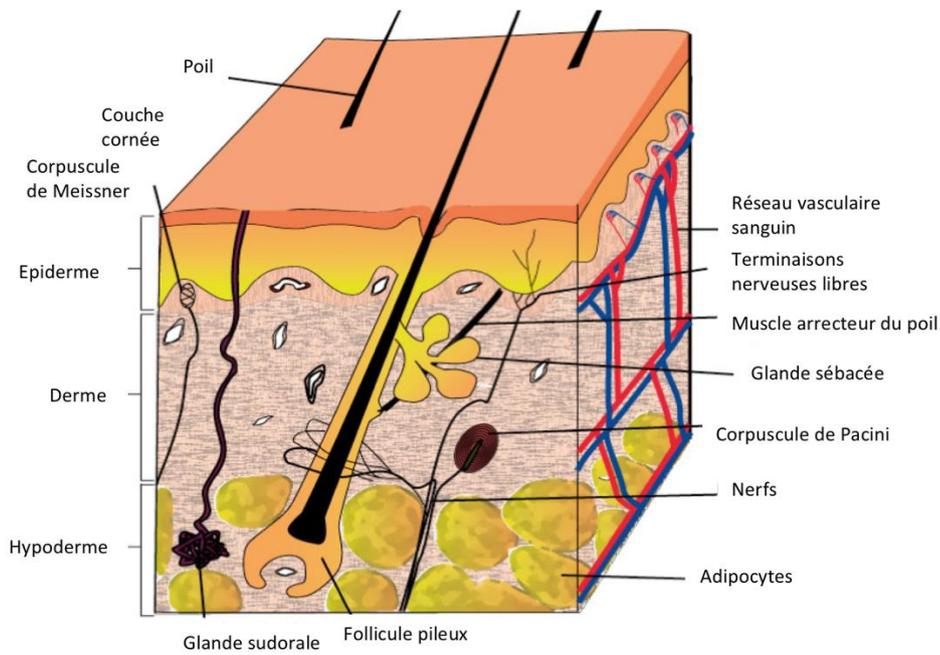


Figure I.1 : Structure de la peau [3]

✓ **L'épiderme** : C'est la partie superficielle et avasculaire dont la surface est constituée de l'épithélium squameux stratifié kératinisé. Il fonctionne comme une couche protectrice et imperméable pour le corps et il aide à réguler la température du corps. Les cellules constituées dans cette couche sont principalement des cellules de Merkel, des kératinocytes, des mélanocytes et des cellules de Langerhans [2] (Figure I.2).

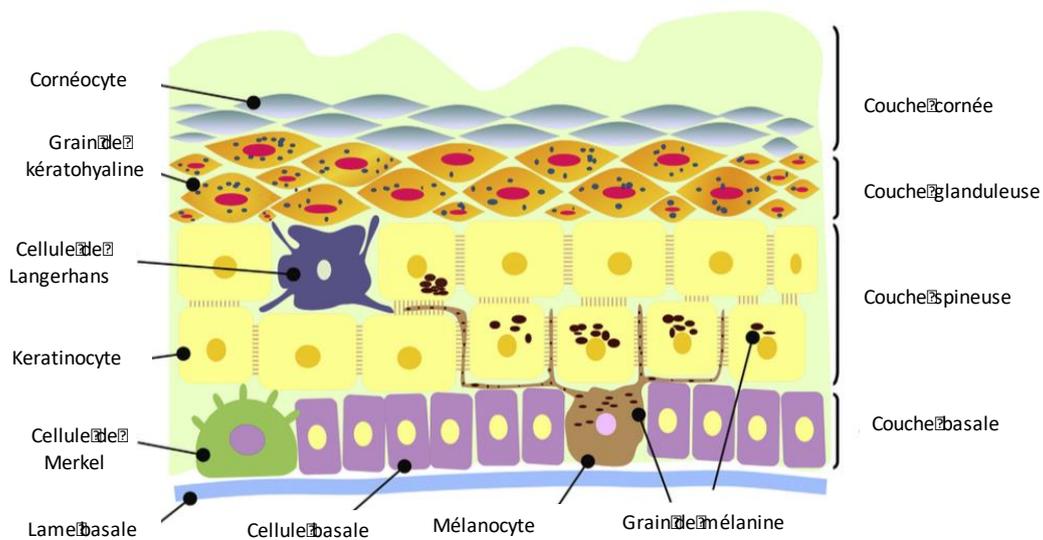


Figure I.2 : Structure de l'épiderme. Image traduite de référence [4]

Les kératinocytes, constituant 90 % de cette couche superficielle de la peau, synthétisent la kératine, une protéine fibreuse et insoluble dans l'eau, qui assure à la peau sa propriété d'imperméabilité et de protection extérieure. Les mélanocytes, quant à eux, sont responsables de la production de mélanines, pigments bruns foncés responsables de la coloration de la peau [4] et qui permettent sa protection face aux rayonnements ultraviolets du soleil.

✓ **Le derme** : Le derme, tissu conjonctif, est séparé de l'épiderme par la jonction derma-épidermique, marquée par une structure fine, linéaire, la membrane basale. Le derme est divisé en deux parties : la partie papillaire dans laquelle se trouvent les cellules principales du derme, **les fibroblastes**. La fonction principale des fibroblastes est de produire, de dégrader et d'organiser les composants de la matrice extracellulaire avec laquelle, ils interagissent à travers des récepteurs membranaires de type intégrine. Avec une forte activité synthétique, les fibroblasts sécrètent de l'élastine, du collagène, de la fibrilline, de la substance fondamentale, des facteurs de croissance, des enzymes comme des collagénases et des inhibiteurs de protéases matricielles pour altérer la matrice extracellulaire (assemblage de macromolécules : collagènes, protéoglycanes, élastine et glycoprotéines de structure), la renouveler et la réorganiser [5]. Les fibres de collagène sont fondamentales à la structure de la peau. Sa dégradation signe le **vieillessement cutané**. Les fibres élastiques, que l'on retrouve également dans le derme, sont moins nombreuses et donnent son **élasticité** à la peau.

La partie réticulaire, quant à elle, contient des **tissus connectifs** telle que des fibres collagènes épaisses et élastiques, des fibroblastes et des nerfs qui sont responsables de la sensation ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le derme contient également des follicules pileux, des glandes comme des glandes sudoripares (eccrines et apocrines) et des glandes sébacée.

✓ **L'hypoderme** : il s'agit d'un tissu conjonctif lâche de même structure que le derme, mais dominé par les protéoglycanes et les fibres de collagène. De plus, il y a la présence d'élastines, de fibroblastes, macrophages et de tissu adipeux constitué d'adipocytes, [1], [2], [6]. La fonction principale de l'hypoderme est avant tout sa réserve en énergie. En effet, il assure le stockage (*lipogenèse*) et la libération de l'énergie sous forme de lipides (*lipolyse*).

En tant que couche la plus externe du corps, la peau subit souvent des effets directs provoqués par l'environnement comme l'UV, la pollution, les agents chimiques ou le stress. Dans ce contexte, l'industrie cosmétique tente d'apporter des solutions pouvant protéger du vieillissement de la peau.

1.2 Les traductions du vieillissement de la peau

On peut distinguer deux types de vieillissement : intrinsèque et extrinsèque. Le vieillissement intrinsèque est celui qui est inscrit dans nos gènes, le vieillissement extrinsèque résulte de tous les facteurs extérieurs (stress, alimentation, hygiène de vie) qui interviennent pour accélérer ses conséquences.

Parmi les communications au sein de la peau, la communication entre les kératinocytes, les fibroblastes et les mélanocytes s'altèrent avec l'âge. Il y a d'autres facteurs intervenant tels que radicaux libres oxygénés qui sont des molécules très « agressives » et très réactives, responsables notamment des processus d'oxydation en général. Aussi, le vieillissement peut être visible au niveau macroscopique. Toutes sortes de défauts de la peau peuvent être observés, dont les plus fréquents sont des taches (hypo ou hyperpigmentation) ou des problèmes au niveau de la microcirculation cutanée [7].

1.2.1 Généralité de la sénescence

La sénescence est inévitable pour tous les organes dans le corps au cours du temps, y compris la peau. Cette procédure est le résultat d'une accumulation d'effets intrinsèques et extrinsèques.

1.2.1.1 *Le vieillissement intrinsèque*

Le vieillissement intrinsèque (ou la sénescence chronologique) est causé par le temps pendant lequel l'effet délétère des métalloprotéinases (enzymes protéolytiques) de la matrice cutanée (MMP-1) dégrade des fibres protéiques dermiques comme le collagène [8]. Ce type de sénescence est marqué par la réduction de prolifération dans la couche cellulaire basale située entre l'épiderme et le derme. Par conséquent, la prolifération des cellules telles que les kératinocytes, les fibroblastes, et les mélanocytes dans la peau va diminuer. De plus, dans la peau âgée, le vieillissement intrinsèque conduit à la dégénération des matrices extracellulaires ainsi que des oligosaccharides, induisant une perte significative de capacité de rétention d'eau [9].

1.2.1.2 *Le vieillissement extrinsèque*

Le vieillissement extrinsèque (essentiellement photo-vieillescence) est engendré par des facteurs externes de l'environnement, tels que la pollution de l'air, les rayonnements ultra-violet du soleil, le stress, le tabagisme... Parmi eux, les rayonnements UV sont l'un des plus important facteur qui contribue jusqu'à 80% du vieillissement du visage [10]. En effet, la capacité de

pénétration des UVB s'arrête à l'épiderme alors que les UVA peuvent pénétrer jusqu'au derme. Cependant, l'intensité des UVA est 1000 fois inférieure à celle des UVB [11], ce qui fait des UVB la cause principale du vieillissement de la peau. Il y a alors apparition de rides profondes, et la peau devient plus sèche et fragile jusqu'à aller à l'apparition d'excroissances bénignes et malignes [12]. Le vieillissement extrinsèque a pour autre conséquence l'accroissement de capacité de certaines métalloprotéases (MMP-1 et MMP-3) à dégrader la matrice extracellulaire et à d'autres protéases comme l'élastase à initier la détérioration des composants du tissu conjonctif [13], [14].

1.2.1.3 Stratégie de l'anti-âge – Les cibles du vieillissement cellulaire cutané

Afin de lutter contre le vieillissement de la peau, les actifs cosmétiques visent à cibler des mécanismes cellulaires propres à l'épiderme et/ou au derme.

✓ Protéger la peau des rayonnements UV – Limiter l'action des Reactive oxygen species (ROS). Protection de la peau contre des facteurs accélérant le vieillissement en utilisant des actifs antioxydants de protection contre les rayonnements UV. Ces antioxydants vont neutraliser les radicaux libres générés par l'exposition solaire, le stress, le tabac, la pollution, l'alcool. Les plus utilisés en cosmétiques sont la vitamine C et E, les polyphénols, le resvératrol par exemple [15].

✓ Amélioration du système de la réparation du tissu par l'emploi d'un inhibiteur des métalloprotéines (MMPs) pour diminuer la dégradation de la matrice extracellulaire (EMC) et ainsi restreindre la formation de rides. A titre d'exemple, l'acide rétinoïque a été décrit comme favorisant la régénération de l'épiderme par l'hyperprolifération de kératinocytes dans l'application courte. D'autres molécules comme les alpha-hydroxyacides (AHA), en particulier l'acide glycolique a été utilisé, dans le commerce, pour accélérer l'élimination des couches de peau morte et faire apparaître la couche inférieure.

✓ Prolifération des kératinocytes et la desquamation stratum corneum [16].

✓ Diminution des taches brunes causées par l'hyperpigmentation sur la peau âgée en inhibant l'activité des mélanocytes épidermiques ou en bloquant l'une des étapes de la biosynthèse des mélanines.

1.2.2 Tyrosinase – La clé d’or pour le traitement d’hyperpigmentation de la peau

1.2.2.1 La pigmentation de la peau

La peau constitue un véritable organe comprenant plusieurs couches intégrées et chacune possède des propriétés spécifiques permettant à l'ensemble de réagir et de s'adapter aux conditions de son environnement. Les mélanocytes constituent la deuxième grande population cellulaire de l'épiderme, après les kératinocytes (80% des cellules épidermiques). Ils proviennent des crêtes neurales et ne colonisent que secondairement l'épiderme où, à terme, ils sont exclusivement situés dans la couche basale de l'épiderme. Leur fonction est la synthèse des mélanines : phéomélanines et eumélanines, dans des organites spécialisés, les mélanosomes qui sont ensuite transférés aux kératinocytes. Les mélanines ont à leur tour deux fonctions : **i)** elles donnent à la peau sa "couleur" (pigmentation constitutive), les phéomélanines étant des pigments jaune-rouge et les eumélanines, des pigments brun-noir; **ii)** les eumélanines ont un rôle photoprotecteur.

1.2.2.2 La synthèse des mélanines

La synthèse de toutes les mélanines (**Figure I.3**) commence par l'hydroxylation de la tyrosine en DOPA sous l'action d'une enzyme, la tyrosinase, puis l'oxydation de la DOPA en dopaquinone sous l'action de cette même enzyme. Ainsi, la DOPA réaction est une réaction histochimique spécifique des mélanocytes. La poursuite de la synthèse se fait vers la voie des phéomélanines et/ou la voie des eumélanines. La dopaquinone entre dans la voie des phéomélanines si elle rencontre une grande quantité de cystéine, sinon, elle s'oriente dans la voie des eumélanines où une enzyme de la même famille que la tyrosinase, la TRP2 (*tyrosine related protein 2*), intervient avant la TRP1 (une autre TRP découverte avant la TRP2).

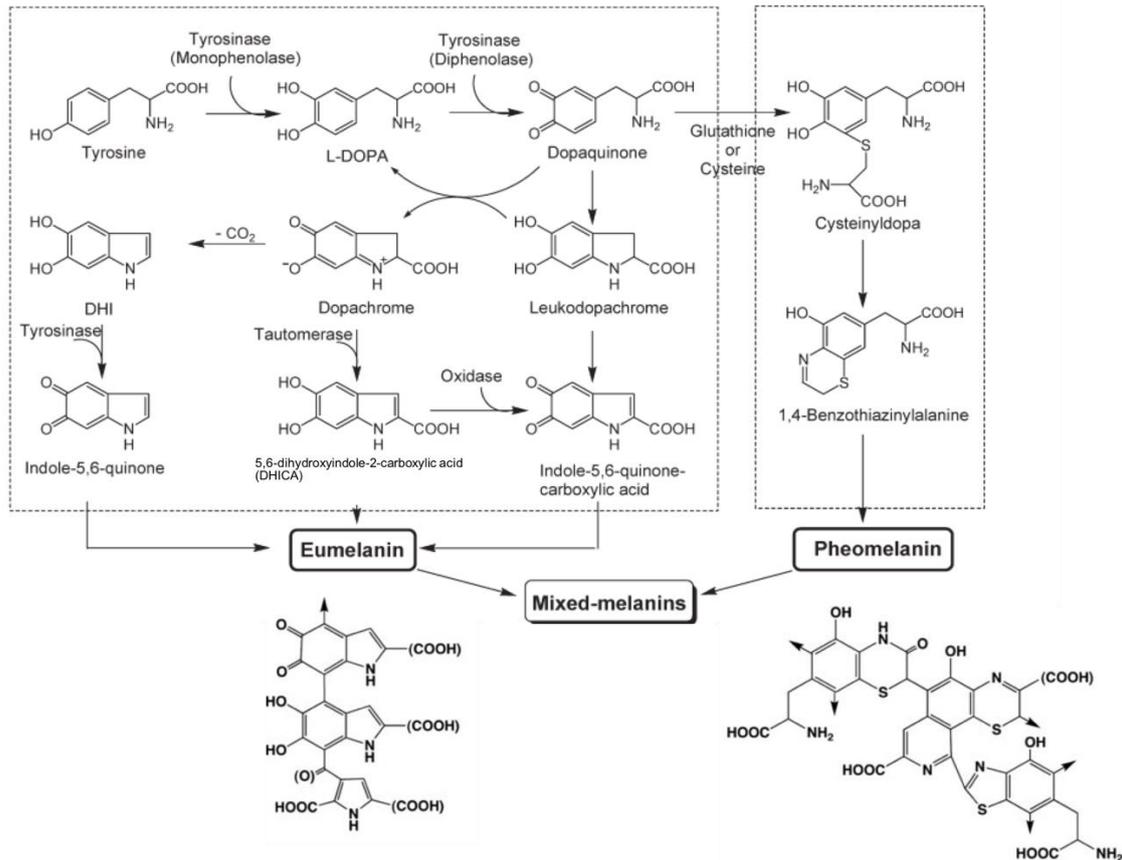


Figure I.3 : Voie de biosynthèse de mélanine [17]

La tyrosinase (**Figure I.3**) est l'enzyme qui régule les premières étapes de la synthèse de la phéomélanine et de l'eumélanine. Ces deux types diffèrent par leur formule chimique et leurs propriétés physico-chimiques. La tyrosinase (monophénol dihydroxyl phénylalanine : oxygen oxydo-reductase, EC 1.14.18.1) est l'enzyme essentielle intervenant dans cette suite de réactions. Elle catalyse notamment la réaction de transformation de la tyrosine en Dopa (dihydroxyphénylalanine) grâce à son activité hydroxylase et la réaction de transformation de la Dopa en dopaquinone grâce à son activité oxydase. Cette tyrosinase n'agit que lorsqu'elle est à l'état de maturation sous l'action de certains facteurs biologiques. Il est important de souligner que les tyrosinases qui appartiennent à la famille des *mono-phenol oxidase* ont un site actif comprenant deux cuivres (CuA et CuB) coordonnés à trois histidines. Dans le cadre de notre étude, l'enzyme tyrosinase de champignon (*Agaricus bisporus*) a été utilisé pour le test d'activité enzymatique in-tubo (**Figure I.4**). Contrairement à l'enzyme humaine constituée d'une glycoprotéine liée à la membrane, l'enzyme de champignon possède une structure tétramère avec deux sous-unités différentes (les masses moléculaires des sous-unités sont de 13.4kDa et de 43 kDa) [17].

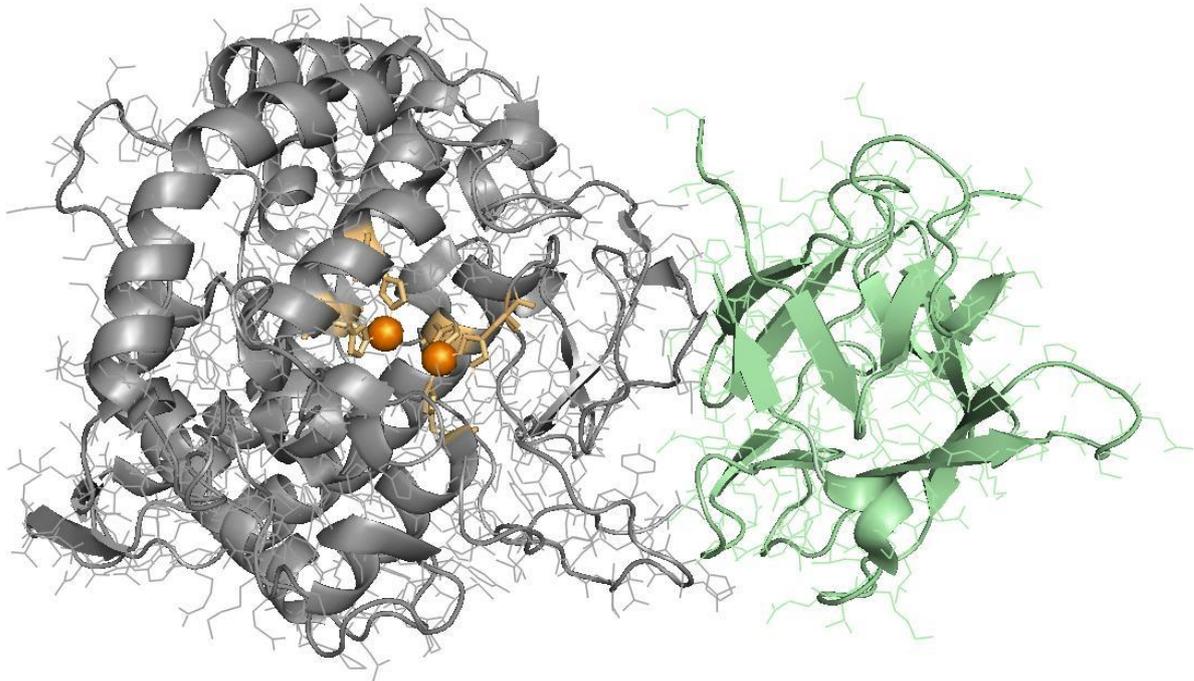


Figure I.4 : La structure de tyrosinase de champignon(PDB ID : 2Y9W) [18] . La partie grise est la sous-unité catalytique et la verte est la sous-unité non catalytique de « lectine-like ». La sphère orange et les liaisons oranges sont la chélation entre trois résidus d'histidine et chaque atome de cuivre, respectivement. La figure est obtenue du site <http://www.pymol.org/> par Aleksander Salwiński [19]

Les tyrosinases initient la synthèse de la mélanine en catalysant l'hydroxylation ortho d'un monophénol en *ortho*-quinone *via* un diphénol. L'étape clé de cette réaction d'oxydation est l'orientation du substrat de type phénol dans le site actif par rapport aux cuivres en présence. La différence dans l'activité catalytique de la tyrosinase par rapport aux autres enzymes du même groupe (catechol oxidase, octopus hemocyanin) est d'une part la présence d'un large espace libre situé au-dessus du site actif et d'autre part la flexibilité de la structure et en particulier d'un résidu His.

1.2.2.3 Inhibition de l'hyperpigmentation

A ce jour, afin de prévenir ou d'améliorer les troubles hyper-pigmentaires, des ingrédients sont développés en se basant sur des principes majeurs de l'inhibition ou du ralentissement de l'activité catalytique de tyrosinase dans les mélanocytes, des fonctionnements par rapport des kératinocytes ou sur le métabolisme au sein de l'épiderme :

✓ Les substances dépigmentantes peuvent agir directement sur la vitalité des mélanocytes épidermiques où se déroule la mélanogénèse et/ou interférer avec une des étapes de la biosynthèse de la mélanine. Il s'agit soit d'une inhibition d'une des enzymes (Tyrosinase, TRP1) impliquées dans la mélanogénèse, soit d'un intercalaire comme analogue structural d'un des composés chimiques de la chaîne de synthèse de la mélanine, chaîne qui peut alors être bloquée et ainsi assurer la dépigmentation. Par exemple, des composés possédant la structure de monophénol (l'acide kojique) ou de diphénol (la glabridine) sont fréquemment identifiés comme les inhibiteurs de tyrosinase en raison du fait qu'ils peuvent constituer des inhibitions compétitives avec des substrats naturels dans l'enzyme active. Dans la majeure partie des cas, des composés contenant la partie de résorcinol substituée en 2,4 sont décrits comme de puissant agent inhibiteur de tyrosinase.

✓ De plus, des composés diminuant les taux de protéine tyrosinase, comme l'accélération de la dégradation de la tyrosinase ou l'inhibition de la maturation de la tyrosinase [20], par exemple, l'acide linoléique et le magnolignan.

✓ D'autre part, les ingrédients ciblés sur les kératinocytes peuvent bloquer ou diminuer des cytokines inflammatoires induites par l'UVB, par exemple l'extrait de camomille. On observe par conséquent, l'inhibition de l'activation des mélanocytes, ce qui a, de ce fait, pour conséquence d'inhiber l'activité de la tyrosinase [20].

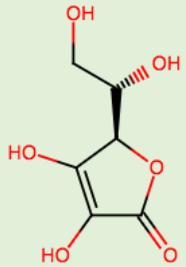
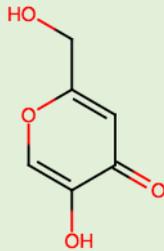
✓ D'ailleurs, les ingrédients ciblés sur l'épiderme tel que l'extrait de placenta, Adenosine monophosphate (AMP) peuvent guérir des troubles hyper-pigmentaires [17], [20] par stimulation de l'excrétion de mélanine de l'épiderme [20].

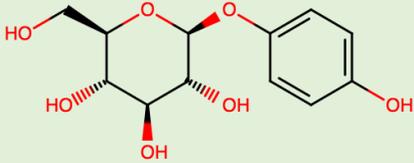
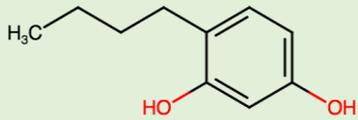
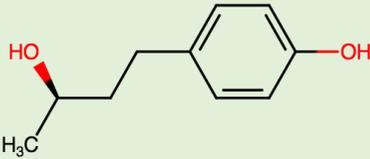
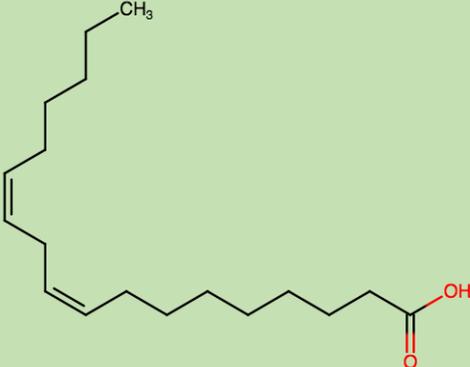
Les substances dépigmentantes connues sont notamment l'hydroquinone et ses dérivés en particulier ses éthers tels que le monométhyléther et le monoéthyléther d'hydroquinone. Ces composés peuvent cependant engendrer des effets indésirables comme l'apparition de rougeurs cutanées dans des situations particulières telles qu'une utilisation à des concentrations importantes, une peau sensible ou présentant un désordre dermatologique. Sont également connus l'acide ascorbique et ses dérivés, des extraits placentaires, l'acide kojique (qui complexe le cuivre présent dans le site actif de l'enzyme Tyrosinase) et qui peut s'avérer instable en solution, ce qui complique sa formulation ; l'acide férulique, l'arbutine, des dérivés de dihydroxybenzène (WO 00/47045), des dérivés du guaiacol (WO 00/47179), le 4-(2,3-dihydroxyphényl)-cyclohexanol (WO 00/56279), des dérivés du résorcinol (WO 00/56702), des amides phénoliques (WO 99/32077). Ces

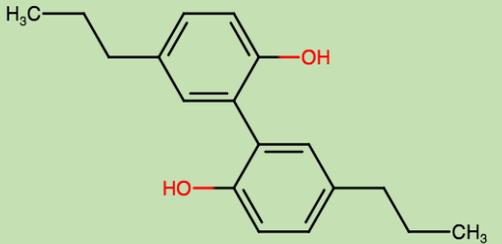
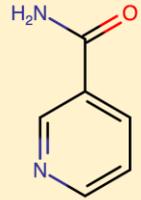
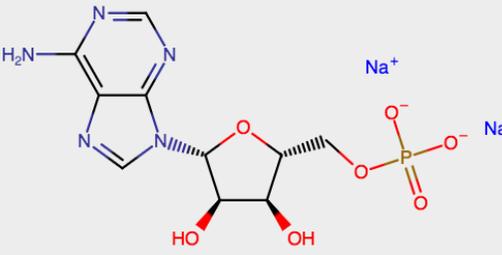
substances peuvent être instables, nécessiter une utilisation à des concentrations élevées, manquer de spécificité quant à leur mode d'action, ou présenter un pouvoir cytotoxique ou irritant.

Le **Tableau I.1** indique notamment des exemples de molécules inhibitrices utilisées dans le traitement de l'hyperpigmentation approuvé par le Ministère de la Santé, du Travail et des Affaires sociales (MHLW) du Japon.

Tableau I.1 : Liste d'exemples de composés utilisés pour traitement d'hyperpigmentation approuvé par le Ministère de la Santé, du Travail et des Affaires sociales (MHLW) du Japon

N°	Ciblé	Mécanisme	Composé	Structure chimique	Remarques	Ref
1	Inhibitions de l'activité de tyrosinase	Antioxydant	Acide ascorbique /dérivé		Implication des réactions d'oxydation dans la voie de synthèse de mélanine, comme la conversion de DOPA en dopaquinone, ou d'autres réactions non enzymatiques	[20]
2		Chélation avec l'atome de cuivre	Acide Kojique		Approuvé comme étant un ingrédient cosmétique sans danger	[21].
3			Acide éllagique		Présente dans plantes telles que les fraises et le thé vert	[22]

4			Arbutine		Présente dans les feuilles de l'airelle rouge. La concentration active n'est pas toxique aux mélanocytes.	[23]
5		Inhibition compétitive	Rucinol (4-n Butylresorcinol)		Obtenu à partir d'un criblage des dérivés synthétiques sur l'activité inhibitrice de tyrosinase.	[24]
6			Rhododendrol		Trouvé dans l'extrait de bouleau blanc et d'érable Nikko	[20]
7	Diminution du niveau de protéine tyrosinase	Accélération de la dégradation de Tyrosinase	Acide linoléique		Dérivé d'huiles botaniques hydrolysées	[25]

8		Inhibition de la maturation de Tyrosinase	Magnolignan (5,5'-Dipropylbiphenyl-2,2'-diol)		Un composé synthétique ayant la structure similaire magnolol and honokiol dans la plante <i>Magnolia obovata</i> .	[26]
9	Inhibition de la signalisation des kératinocytes - mélanocytes	Inhibition de l'inflammation UV	Extrait de camomille		Etant une antagoniste de la liaison du récepteur de l'endothéline (un type de cytokine inflammatoire), et bloquant la signalisation entre cellules kératinocytes et mélanocytes pour la synthèse de mélanine	[20]
10	Inhibition du transfert des mélanosomes	Inhibition de la dispersion de mélanine	Niacinamide		Dérivé de vitamine B3, trouvé dans un agent anti-inflammatoire dans le traitement de l'acné	[27]
11	Accélération du renouvellement épidermique	Desquamation de mélanine	Adénosine monophosphate disodique (AMP)		Augmentation de l'absorption de glucose intracellulaire pour la biosynthèse de l'adénosine triphosphate (ATP), de ce fait, accélère le renouvellement épidermique et empêchant l'accumulation de mélanine dans la peau.	[20]

1.2.3 L'élastine et le collagène : comment limiter une action trop importante des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire

1.2.3.1 L'élastine et l'élastase

L'élastine est une protéine centrale de fibre élastique qui est responsable de l'élasticité dans les tissus de vertébrés comme la peau, l'aorte, et les poumons. Dans la peau, l'élastine fait partie de 2 à 8 % de la matrice extracellulaire (ECM) [28]. Des études ont révélé que l'élastine est dégradée par des protéases comme les sérines protéases neutrophiles (NSP), la cathepsine G (CG), l'élastase leucocytaire humaine (HLE), des métalloprotéinases de la classe des collagénases (MMP-1 et MMP-13), des gélatinases (MMP-2 et MMP-9), des stromélysines (MMP-3), des matrilysines (MMP-7) et la métallo-élastase MMP-12 [29] .

Les élastases sont des enzymes appartenant à la classe des protéinases qui ont une capacité à hydrolyser l'élastine insoluble en fragments d'élastine soluble. Les élastases sont des protéases à sérine, des métalloprotéinases, thiol protéinases qui sont produites par des tissus et cellules différentes comme le pancréas, les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages, les monocytes, les fibroblastes [30]. Il a été démontré qu'il existe au moins deux types d'élastase dans la peau : l'élastase neutrophile (protéase de sérine) et l'élastase de fibroblaste dermique (métalloprotéinases) [31]. Dans le cadre de notre étude sur l'activité de l'élastase in-tubo, l'élastase du pancréas d'origine porcine (MW= 25.9 kDa) a été utilisée. L'élastase du pancréas d'origine porcine est une endopeptidase qui fonctionne en basant sur les structures dimensionnelles de l'enzyme au site active [32]. Il s'agit d'une protéase à sérine possédant un résidu sérine 195 dans le site active (**Figure I.5**) et deux autres résidus participants dans la catalyse qui sont, l'histidine 57 et l'aspartate 102.

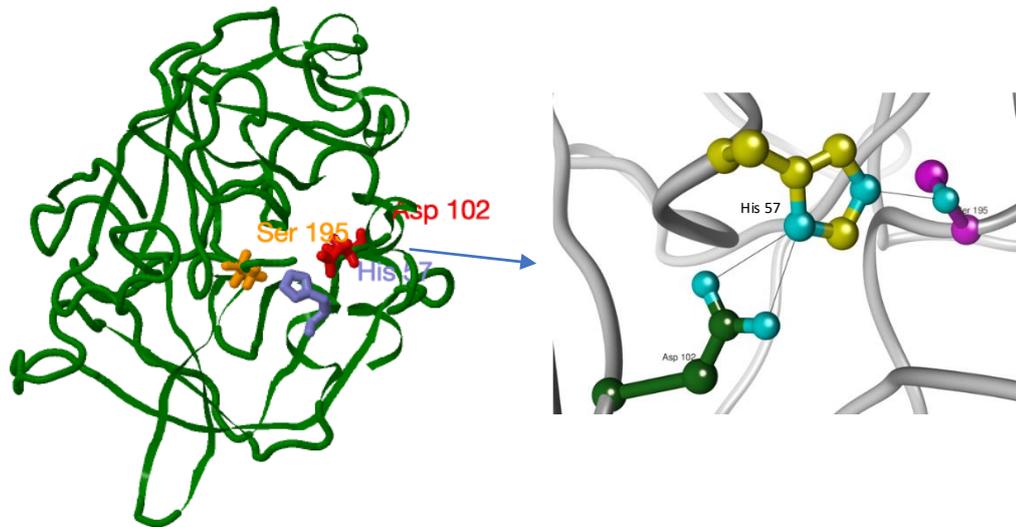


Figure 1.5 : La structure de l'élastase de pancréas porcine (PDB ID : 1GVK). La triade catalytique se forme par trois résidus Sérine 195, Histidine 57, Aspartate 102. La figure est extraite de la référence [33]

Dans l'étude de Imokawa et Ishida réalisée sur la peau des souris à différents âges, l'activité d'élastases a augmenté graduellement selon le vieillissement chronologique et l'intensité de répétition d'exposition aux l'UVB et UVA. La perte d'élasticité ainsi que la déformation du réseau des fibres élastiques a été montrée accompagnée d'une activation des élastases au sein des fibroblastes dermiques provoquant l'apparition de rides et l'affaissement dans la peau [34].

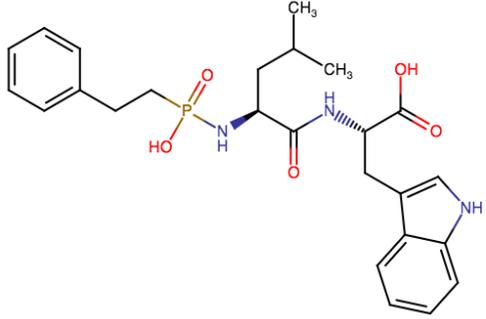
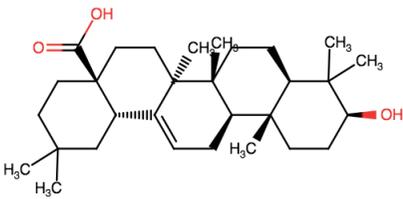
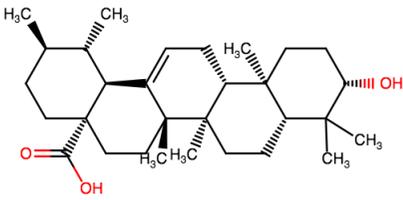
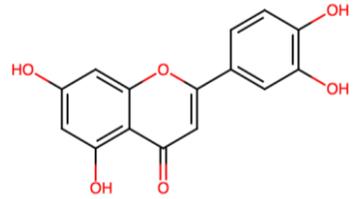
De par ses capacités à catalyser l'hydrolyse de l'élastine, une fibre élastique qui - avec le collagène - détermine les propriétés mécaniques du tissu conjonctif, l'utilisation ciblée d'inhibiteurs sur les élastases pour ralentir l'action de ces enzymes est proposée comme une stratégie pour « ralentir » le vieillissement. Une étude a récemment montré *in vitro et in vivo* que le composé *N*-phenethylphosphonyl-L-leucyl-L-tryptophane (NPLT) se comportait comme un inhibiteur spécifique d'élastases secrétés par les fibroblastes de la peau [34].

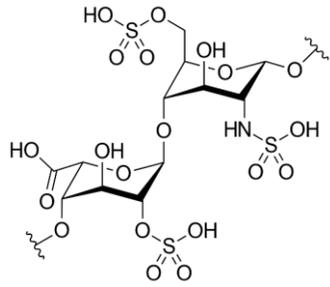
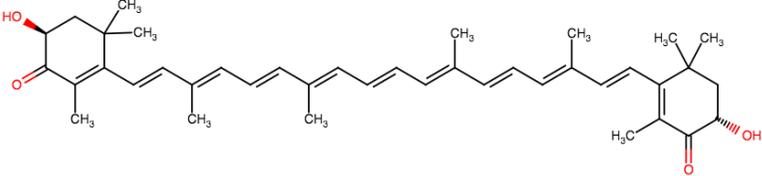
En outre, des inhibiteurs d'élastases, d'origine naturelle, trouvent leur source dans les composés phénoliques (flavonoïde), les tanins, les acides cinnamiques. Plusieurs molécules venant de ces familles moléculaires sont rapportées comme étant des inhibiteurs directs de l'élastase neutrophile humain (HNE), connue pour sa capacité à cliver plusieurs molécules de la matrice extracellulaire (colagène IV et élastine).

Par exemple, des composés comme la lutéoline de la famille des flavonoïdes contenant le groupe catéchol montre une activité antiélastase significative ($IC_{50} 1.974 \times 10^{-3} M$) déterminée par l'hydrolyse du N-t-BOC-L-alanin-p-nitrophenyl ester [35]:

D'autres structures de flavonoïde comme des chrysines, des glycosides et aglycones de quercétine, le gallate d'épigallocatechine (EGCG), l'ester d'épigallocatechine et d'acide gallique, le flavanol le plus abondant du thé peuvent également posséder un potentiel d'inhibition d'élastase. Les dérivés d'acide caféique et les esters triterpéniques d'*Oenothera biennis* montrent, quant à eux, une capacité inhibitrice remarquable pour l'élastase HNE [36]. Le **Tableau 1.2** ci-dessous présente certains exemples des inhibiteurs de l'élastase.

Tableau I.2 : Exemples des inhibiteurs de l'élastase

N°	Composé	Groupe	Structure	Origine	Ref
1	NPLT (N-phenethyl-phosphonyl-L-leucyl-L-tryptophane)	Peptide		Synthétique	[34]
2	Acide oléanolique	Triterpénoïde pentacyclique		<i>Olea europaea</i> (feuilles, fruit), <i>Rosa woodsii</i> (feuilles), <i>Prosopis Glandulosa</i>	[37]
3	Acide ursolique	Triterpénoïde pentacyclique		Le romarin, le thym, l'origan, la lavande	[37]
4	Lutéoline	Flavonoïdes		La feuille de <i>Reseda luteola</i>	[35]

5	Héparine	Carbohydrates sulfatés		La muqueuse intestinale d'origine porcine	[38]
6	Astaxanthine	Caroténoïdes		L'extrait des plantes océaniques rouges et saumon	[39]

Les carbohydrates sulfatés tels que le β -1,3-glucan sulfate ou héparine de par l'interaction électrostatique entre le groupe sulfate chargé négativement et le résidu arginine de l'enzyme HNE chargée positivement joue un rôle important dans les propriétés inhibitrices de ce composé [38]. Les protéines telles que la protéine PG50 (14.9 -11.6 kDa) isolée des graines de *Tamarindus indica* a également été déterminé comme un inhibiteur HNE [40].

1.2.3.2 Le collagène et la collagénase

Le collagène est un composant principal de la matrice extracellulaire (EMC). Il contribue jusqu'à 70-80% du poids sec de la peau [41], et est responsable de la résistance à la traction de la peau. Dans celle-ci, on trouve majoritairement du collagène de type I et type III. Ces différents types de collagènes sont régulés au sein de la matrice extracellulaire via une balance de synthèse – dégradation. Varani, J. et al reconnaît que la diminution des taux de collagènes, notamment le collagène I dans la peau exposée avec le soleil, entraîne l'augmentation des dégradations des collagènes alors que la production de collagène reste inchangeable [42]. En plus, dans une étude, l'expression de collagène VII constituant des fibrilles d'ancrage à la jonction dermoépidermique est diminuée dans les kératinocytes au niveau de la surface contactée avec UV, celle-ci induit les rides causées par la connexion affaiblie entre le derme et l'épiderme[43].

Les métalloprotéines matricielles (MMPs) sont des endopeptidases dépendantes du zinc, elles contiennent un site catalytique comprenant 3 résidus d'histidines avec un ion Zn^{2+} . Ces enzymes sont capables de dégrader les composants de EMC [44]. En effet, le phénomène de dégradation du collagène fait intervenir des métalloprotéases (MMPs) alors que l'étape de synthèse fait entrer en jeu des inhibiteurs tissulaires endogènes spécifiques de ces mêmes MMPs, les TIMPs [44] pour Tissue Inhibitors of MetalloProteinases. Ces inhibiteurs forment un complexe équimoléculaire avec les formes actives des MMPs. Dans ces complexes, le domaine d'amine-terminale » des TIMPs se lie au domaine catalytique des MMPs et, de ce fait, bloque l'accès à la poche contenant l'atome de zinc.

Dans la peau, les enzymes MMPs (MMP-1, MMP-8 et MMP-13), synthétisées au sein des cellules kératinocytes, fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, cellules finales, éosinophiles et neutrophiles[44], appartiennent au groupe des collagénases. Parmi ces collagénases, la MMP-1 joue le rôle le plus important dans le renouvellement, la cicatrisation et la reconstruction des tissus. Elle est capable de dégrader les collagènes fibrillaires alors que les autres MMPs ne peuvent dégrader des fragments de collagène déjà détérioré [45].

Aussi, dans le cadre de notre étude, nous utiliserons la collagénase issue de la bactérie *Clostridium histolyticum* (ChC ~115 kDa [46], **Figure I.6**) qui a la capacité de dégrader la matrice extracellulaire en détériorant le tropocollagène, l'unité fondamentale du collagène, dans les conditions physiologiques [47].

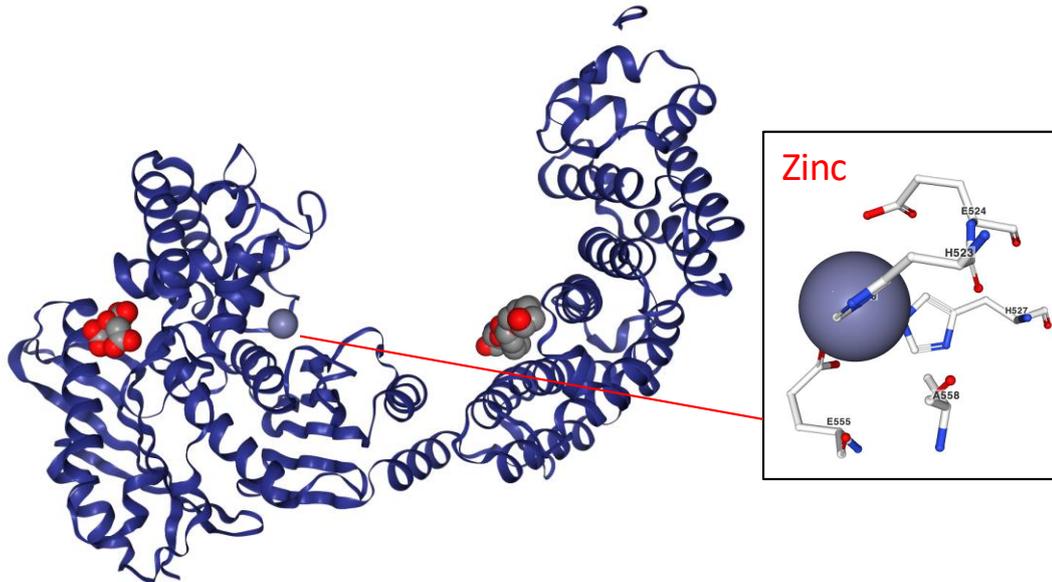


Figure 1.6 : La structure de collagénase de *Clostridium histolyticum* (PDB ID : 2Y50) [18] . Le site catalytique comprenant 3 résidus d’histidines avec un ion Zn^{2+} . La figure est extraite de site <http://www.rcsb.org/3d-view/2Y50/1>

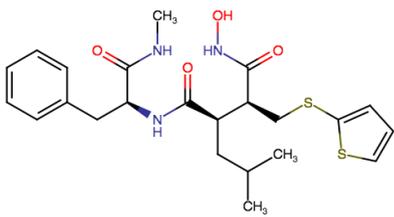
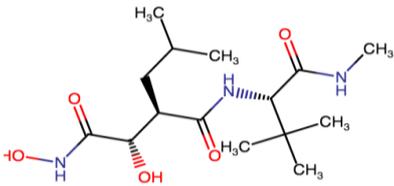
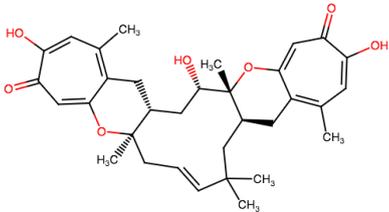
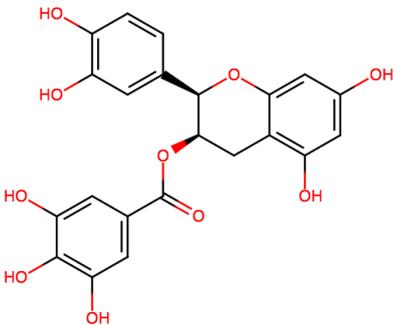
L’utilisation des inhibiteurs de collagénase est devenue une bonne stratégie pour atténuer l’expression de MMPs de type collagénase dans le tissu, et donc ralentir le vieillissement. L’inhibition peut avoir lieu en entrant en compétition avec le substrat des MMPs et se liant au site catalytique par chélation de l’atome de zinc Zn^{2+} , en dénaturant les enzymes collagénases ou en formant un complexe non actif [48].

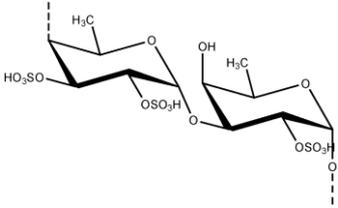
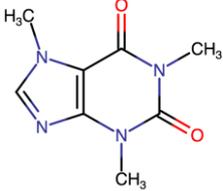
Suite à des travaux en modélisation moléculaire, des inhibiteurs présentant une structure pseudo-peptidique et mimant le site de clivage du substrat ont été synthétisés. La majorité des inhibiteurs étudiés *in vitro* et *in vivo* dans cette catégorie sont des dérivés hydroxamates. Les plus connues molécules sont le Batimastat[®] et le Marimastat[®] qui sont relativement non sélectives. Le Marimastat[®] possède une meilleure biodisponibilité orale et une faible inhibition de la MMP-3 (stromélysine-1) par rapport à Batimastat[®][49]. Un grand nombre de sulfamides dérivés d’acides aminés ou de leurs hydroxamates ont été élaborés en vue de disposer d’agents plus puissants et plus sélectifs [50].

Concernant des composés issus des sources naturelles, des extraits de thé vert, de thé blanc, de feuille de kaki, de *Sanguisorba officinalis* et des flavonoïdes relèvent des propriétés significatives de l’anti-collagénase de MMP-1 [48]. Par exemples, les dérivés de catéchine, pycnidione (un agent

dérivé de champignon) et des dérivés de futoenone (un néolignane isolé de *Magnolia sprengeri* et de *Piper wallichii*) sont des inhibiteurs de MMPs. Le mécanisme d'inhibition n'est pas encore totalement élucidé, mais l'hypothèse d'une chélation avec l'ion zinc (II) du site actif par un cycle hydroxyle et/ou carbonyle [50] est la plus probable. Le **Tableau I.3** suivant montre certains exemples des inhibiteurs de l'enzyme collagénase.

Tableau I.3 : Exemples des molécules inhibitrices de l'enzyme collagénase

N°	Composé	Structure	Origine	Mécanisme	Ref
1	Batimastat®		Pseudo-peptidique, dérivés hydroxamates, synthétisé	Inhibiteur de la MMP-1	[51]
2	Marimastat®				
3	Pycnidione		Un agent dérivé de champignon	Inhibiteurs de MMPs	[50]
4	(-) Epigallocatechine-3-gallate (EGCG)		Thé vert (<i>Camellia sinensis</i>)	Inhibition de la dégradation de collagène et induction de collagénase	[52]

5	Fucoïdan		Algues brunes (<i>Undaria pinnatifida</i>)	Inhibition de MMP-1 activé par UVB dans le fibroblast	[53]
6	Caféine		Café, thé	Inhibition de collagénase	[54]

1.2.4 Antioxydant sur l'anti-âge de la peau

1.2.4.1 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS comprennent notamment l'oxygène singulet (1O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et l'ozone (O_3). Selon les auteurs, ils incluent également le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$), également désignés espèces réactives de l'azote, et les radicaux peroxydes (RO^{\cdot} et ROO^{\cdot}).

Les sources exogènes des ROS sont majoritairement des pro-oxydants environnementaux tels que les pesticides, les métaux lourds, la fumée de cigarette, les polluants, les composés induits par la prise de certains médicaments, ou bien encore par le rayonnement électromagnétique (radiation ionisante, lumière ultraviolette).

Les espèces réactives oxygénées (ROS) endogènes sont notamment issues des réactions d'oxydoréductions enzymatiques le long de la chaîne de transfert des électrons au niveau des mitochondries. Ces Espèces Réactives Oxygénées participent à des réactions d'oxydation physiologiquement indispensables mais peuvent, dans certaines conditions, être également nuisibles car elles peuvent altérer les tissus et contribuer à leur sénescence [55]. On parle de stress oxydant **ou stress oxydatif** lorsque se produit un déséquilibre en faveur d'un excès de molécules pro-oxydantes avec des effets délétères sur l'organisme. La **Figure I.7** résume les sources endogènes de ROS présentées dans l'organisme.

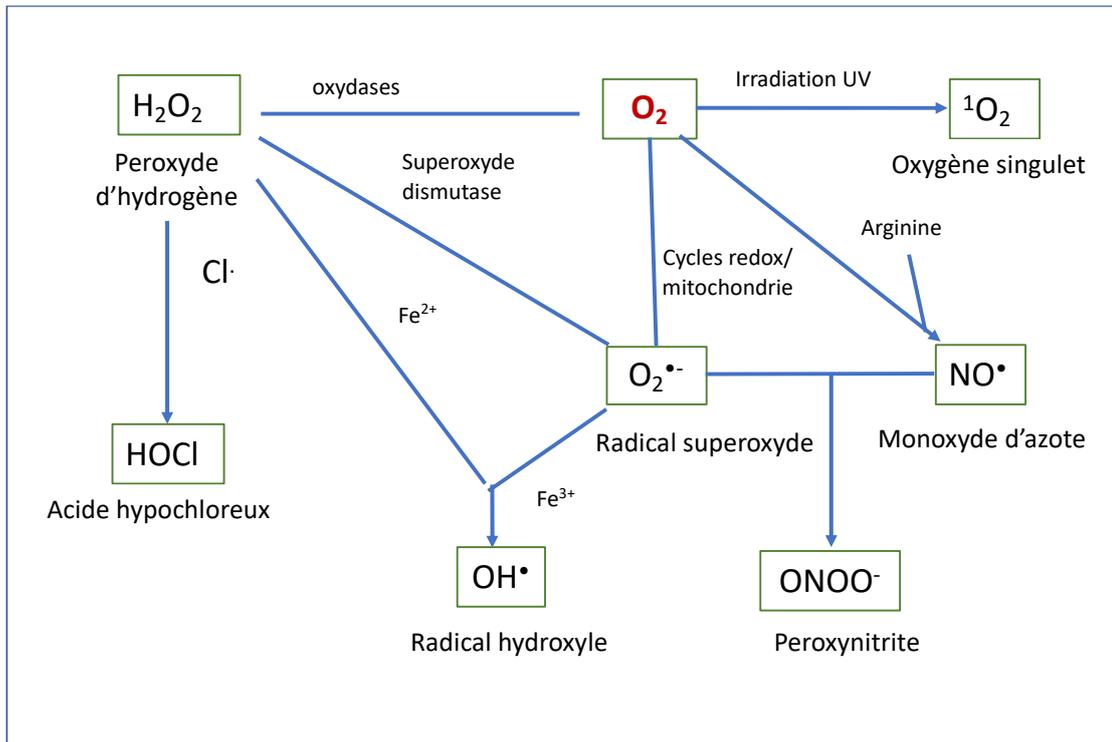
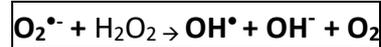


Figure I.7 : Les sources endogènes des ROS [56]

L'**oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)** est la forme « excitée » de l'oxygène moléculaire qui est très instable et extrêmement réactif, et a une durée de vie est très limitée ($\sim 0.1 \mu\text{s}$) et est capable d'oxyder (cycloaddition), sans catalyse, diverses molécules biologiquement importantes (acides aminés, bases nucléiques, cholestérol, acides gras) [57]. L'oxygène moléculaire singulet peut également conduire à la peroxydation de lipides insaturés. L'ensemble de ces processus va provoquer l'inactivation d'un grand nombre de constituants cellulaires importants, d'un point de vue structural mais aussi métabolique, ce qui entraîne la mort de la cellule.

Les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) sont formés par la capture d'un électron par la molécule d'oxygène au niveau des mitochondries des kératinocytes et fibroblastes. Ils ont une faible réactivité avec les composés biologiques et ne réagissent ni avec les acides nucléiques et leurs constituants, ni avec les protéines et leurs acides aminés, ni avec les lipides et leurs acides gras [58]. Cela se traduit en termes de cinétique par des constantes de vitesse k généralement inférieures à $10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Par contre, ils ont une demi-vie relativement longue (supérieure à quelques dizaines de secondes) ; ils peuvent donc diffuser vers leurs cibles [57]. Parmi celles-ci, peuvent être cités le cytochrome C, l'ascorbate (vitamine C) ou bien encore la superoxyde dimutase (SOD). Cette dernière, dont $\text{O}_2^{\bullet-}$ est le substrat, est capable de convertir ces radicaux anions superoxydes réactifs ($k = 2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$)

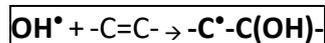
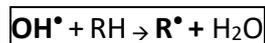
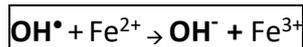
en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier peut alors à son tour, sous l'action de l'enzyme glutathion peroxydase en O₂ et H₂O ou bien encore acide hypochloreux (HOCl) par l'enzyme myéloperoxydase (MPO) lysosomiale [59]. La toxicité des radicaux superoxydes semble s'exercer plutôt d'une manière indirecte et ce en réagissant avec l'eau oxygénée pour donner naissance à des radicaux **OH•** selon la réaction de Haber Weiss catalysée par les ions Fe³⁺ tels que :



Le **peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)** est miscible à l'eau, pénètre facilement les membranes biologiques, et peut provoquer la dégradation des protéines, la libération de Fe³⁺, l'oxydation de l'ADN, de lipides, ou encore de thiols, mais également l'inactivation d'enzymes. Il devient notamment toxique en se décomposant en anions hydroxyles et en radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton en présence de sels métalliques (Fe²⁺).



Les radicaux hydroxyles OH• sont les espèces oxygénées les plus réactives du stress oxydant, en raison de leur extrême réactivité qui se traduit par des constantes de vitesse k, selon la nature du substrat, comprises entre 10⁸ et 10¹⁰ mol⁻¹.L.s⁻¹. Ils sont très réactifs sur bon nombre de cibles biologiques (ADN, protéines, lipides...). Ce sont des oxydants puissants qui réagissent selon trois modes d'action : **i)** en arrachant un électron, **ii)** en arrachant un atome d'hydrogène d'un substrat organique RH, **iii)** en s'additionnant sur les doubles liaisons.



Le radical hydroxyle peut également réagir avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique.

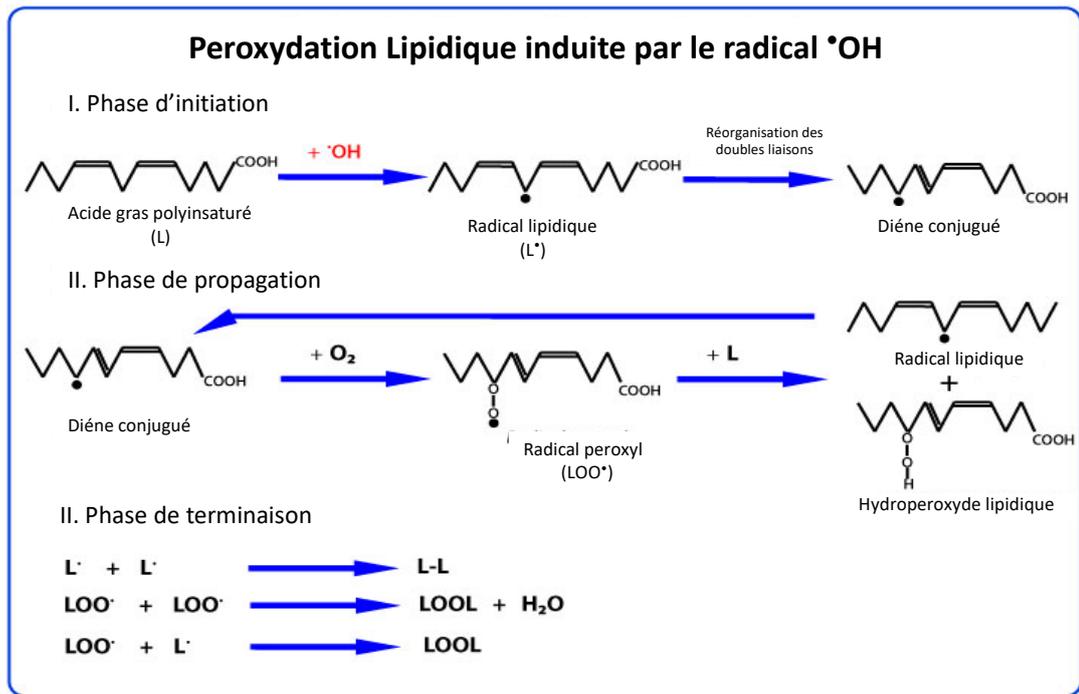


Figure 1.8 : Exemple de réaction de peroxydation induite par le radical hydroxyle [56]

De même, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. En outre, lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif.

1.2.4.2 Rôle et nature des antioxydants endogènes et exogènes

Sans l'intervention des antioxydants, la production de radicaux libres entraîne entre autres conséquences, le vieillissement des tissus et notamment la peau. Les antioxydants, inhibiteurs de l'oxydation, sont donc de précieux alliés pour aider la peau à lutter contre les radicaux libres produits en concentration élevée lors du stress oxydatif et contribuent à éliminer l'excédent de radicaux libres dans les cellules.

Face au stress oxydatif, la peau utilise les antioxydants endogènes naturellement présents dans ses cellules, soit apportés de l'extérieur comme la vitamine C, soit naturellement produits comme le glutathion dont le couple forme oxydée (GSSG) et forme réduite (GSH). Ces dernières constituent un couple d'oxydoréduction très important au niveau cellulaire dans les réactions de détoxication des métaux lourds tels que le mercure, le plomb et le cadmium ou bien encore des oxydants de type peroxydes en présence de l'enzyme sélénée glutathion peroxydase (GPx). D'après la littérature, les antioxydants peuvent être classifiés en deux catégories : enzymatique et non enzymatique.

i) Les antioxydants enzymatiques :

La glutathion peroxydase est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Elle assure notamment la transformation du peroxyde d'hydrogène en molécules d'eau et des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH selon les réactions présentées dans le **Tableau I.4**.

Ce système de défense basal peut cependant se révéler insuffisant en cas d'un stress soutenu, ou de longue durée. La cellule met alors en route un second système de protection en stimulant la production d'enzymes telles la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), qui catalysent la destruction ou la transformation chimique des radicaux libres ou des molécules pro-oxydantes. En plus, certaines d'autres enzymes jouent le rôle comme un antioxydant telles que la superoxyde dismutase qui peut éliminer des radicaux superoxyde ou la catalase qui peut diminuer la peroxyde hydrogène en eau et oxygène [57].

Tableau I.4: Exemples des piègeurs enzymatiques de radicaux libres. Tableau extrait et traduit de la référence[60]

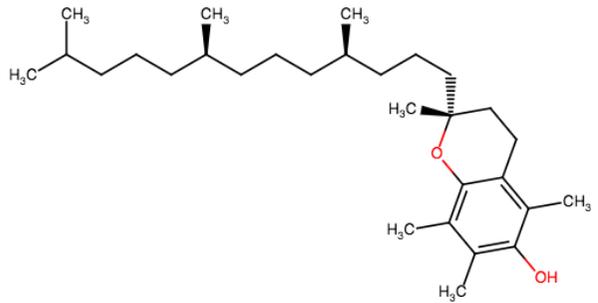
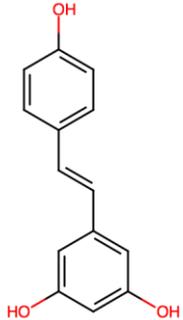
Nom de l'enzyme	Acronyme	Réaction catalytique
Superoxyde dismutase	SOD	$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$ $M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$
Catalase	CAT	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ $H_2O_2 + Fe(III)\text{-E} \rightarrow H_2O + O = Fe(IV)\text{-E}(.+)$ $H_2O_2 + O = Fe(IV)\text{-E}(.+) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-E} + O_2$
Glutathione peroxyde	GTPx	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$

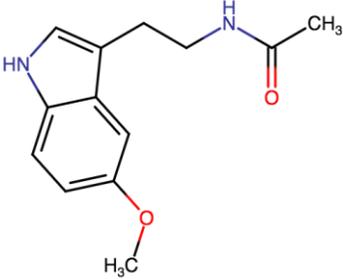
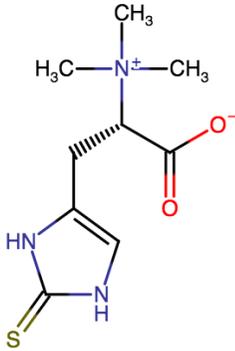
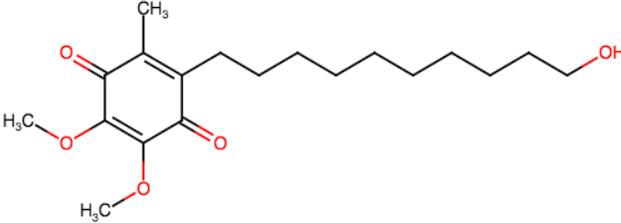
ii) Les antioxydants non enzymatiques

Les molécules antioxydantes non enzymatiques ont été trouvées dans beaucoup de plantes. Les composés antioxydants peuvent être divisés en composé hydrophile ou lipophile. Typiquement, les molécules possédant des structures avec les cycliques aromatiques sont capables de délocaliser l'électron non apparié de ce fait peuvent neutraliser des radicaux libres [61]. En effet, des antioxydants naturels connus appartiennent en majeure des cas des groupes de polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes, composés de classes thiols et stérols telles que dans le thé vert, ginsengs,

chardon mairie, ail, ginkgo...[62]. Le **Tableau I.5** présente certaines molécules antioxydantes connues dans les cosmétiques :

Tableau I.5 : Exemples des molécules antioxydantes dans la cosmétique

N°	Composé	Classification	Structure	Effet	Ref
1	Vitamine E	Vitamine		Réduction de la formation des cellules érythème et œdème	[63]
2	Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene)	Polyphénol de la famille de stilbène		Présent dans le vin rouge et plantes. Amélioration de la prolifération des cellules et l'activité de SOD et le glutathion peroxydase	[39]

3	Mélatonine (N-acetyl-5-methoxytryptamine)	Hormone		Antioxydant, réduction de l'érythème dans la peau humaine	[39]
4	L-ergothion-eine	Dérivé thiourée de l'histidine		Inhibition de la formation de peroxide de lipide et scavenging de radicaux libres présent dans les plantes et tissus des animaux	[64]
5	Idebenone	Analogique synthétique de coenzyme Q		Produit synthétique. Réduction des rides des femmes	[65], [66]

Prendre un exemple, la capacité potentielle d'antioxydant de la vitamine C, E a été prouvé par plusieurs études. Leur mécanisme est détaillé dans la **Figure I.9**.

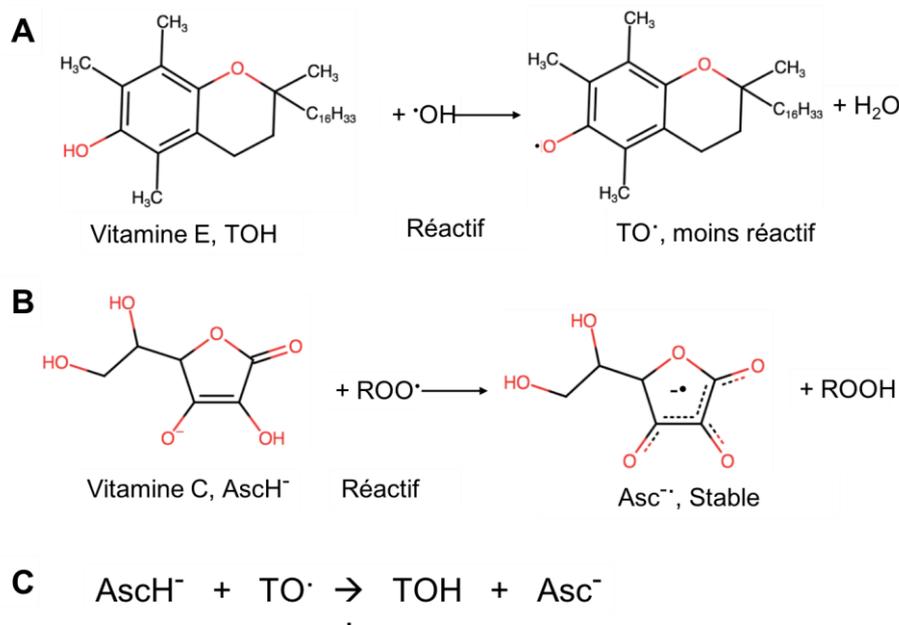


Figure I.9 : Réactions directes de **A.** vitamine E (TOH) avec $\cdot\text{OH}$. **B.** vitamine C (AscH[·]) avec ROO[·]. **C.** Régénération de vitamine E par vitamine C [61]

En particulier, la vitamine C peut régénérer les autres antioxydants par neutraliser les formes radicales de ces composés et également régénérer soi-même grâce à NADH ou NADPH-dépendantes réductases[67].

1.3 L'intérêt de la recherche des molécules bioactives d'origine naturelle pour l'application cosmétique

La nature depuis longtemps a joué un rôle indispensable pour soigner la vie humaine. L'utilisation de produits naturels a émergé depuis plus de 4000 ans, marquée par la découverte d'une tablette d'argile de Sumérien sur lequel sont consignés des traitements de plusieurs maladies par les plantes. Ensuite, l'utilisation des plantes médicinales a été largement développée notamment du temps de l'Égypte Antique. L'établissement du système médicinal traditionnel chinois, la médecine d'Ayurvedic **utilisée en Inde depuis plus de 5 000 ans** ou encore la médecine traditionnelle grecque, les avancées faites par les musulmans dans la recherche des phytothérapies

et des techniques d'extraction chimique [68] sont autant d'exemples de l'utilisation de produits d'origine naturelle pour une application médicale et cosmétique. Actuellement, le traitement traditionnel basé sur l'emploi de produits d'origine naturelle tient encore une place importante dans les pays en voie de développement avec 80% de la population qui sont adeptes de l'utilisation de tels produits.

Dans le domaine des cosmétiques, l'utilisation par exemple de crèmes, gels, lotions, baumes, soins capillaires et autres produits de maquillage contenant certains extraits ou actifs de plantes, des huiles essentielles constituent une préférence pour les consommateurs. En effet, les produits naturels demeurent incontestablement une source importante de composés actifs, soit parce que leurs constituants sont de précieux principes actifs, soit parce que les chimistes modifient la structure de certaines molécules d'intérêt obtenues dans l'extrait naturel afin de les rendre moins toxiques, plus efficaces, ou de leur conférer une meilleure biodisponibilité. L'activité de ces ingrédients repose sur l'action de molécules actives dans l'extrait ou peut-être sur l'action synergique de l'ensemble des molécules contenues dans l'extrait naturel. A l'addition d'usage des substances chimiques de synthèse, la biodiversité de la nature constitue une source des ingrédients potentiels pour la recherche de nouvelles molécules actives en cosmétique [69].

Il s'avère que les sources des produits d'origine naturelle utilisés dans la formulation de cosmétique sont très diverses : cela peut provenir des végétaux, animaux terrestres et marins voire des minéraux.

1.3.1 Le végétal comme source de principes actifs

En cosmétique, la recherche d'innovation et de nouveaux produits naturels est aujourd'hui privilégiée. Pour l'élaboration de nouveaux produits cosmétiques une question demeure primordiale, il s'agit de celle du « sourcing » qui s'entend aussi bien en termes d'approvisionnement en matière première d'origine végétale, qu'en termes de disponibilité d'ingrédients par l'optimisation et l'innovation des procédés d'extraction à partir de cette matière première. L'utilisation du végétal comme source de principes actifs pour les cosmétiques ouvre tout un travail sur la sélection variétale, sur l'optimisation des cultures, sur la concentration des actifs dans les plantes. Les matières premières d'origine végétale sont largement présentes dans les formules des cosmétiques. Elles constituent des ingrédients courants, tels que les huiles, beurres, graisses cires végétales, les alcools et acides gras, les gélifiants, les tensioactifs naturels.

Le beurre de cacao, par exemple, contient majoritairement l'acide oléique, l'acide stéarique, l'acide palmitique et environ trois quarts des matières grasses sont présentes sous forme de mono-insaturés qui sont utilisés pour soigner un coup de soleil et sont connus comme une source d'antioxydants. L'huile d'olive, quant à elle, contient une diversité des composés comme polyphénol, acides gras, antioxydants et anti-inflammatoires qui sont employés en traitement des dermatites, eczéma... Le ginseng contenant des ginsénosides possède un effet de blanchissement, d'adoucissant, de réduction de kératinisation, d'augmentation des circulations sanguines et de prolifération cellulaire [70]. Le thé (*Camellia sinensis*) est une plante très connue qui contient plus de 500 composés tels que des flavonoïdes, des acides aminés, des vitamines, de la caféine, des polysaccharides, notamment, la catéchine qui, dans le thé vert, agit comme antioxydant et anti-inflammatoire [70]. Des huiles végétales contenant une grande quantité des acides gras et triglycérides comme l'huile de ricin (*Ricinus communis*) qui contient l'acide ricinoléique ont la capacité de favoriser l'hydratation et l'adoucissant de la peau, et d'éviter la perte de l'eau trans-épidermique [70].

L'utilisation du végétal dans les cosmétiques nécessite une démarche écoresponsable globale qui implique une préservation et une gestion durable de la biodiversité. La priorité est donnée à l'utilisation de plantes cultivées et, s'il y a nécessité d'un prélèvement en milieu naturel, on applique des règles strictes pour garantir que les collectes ne mettent pas en danger la plante dans son environnement [71].

1.3.2 Les molécules actives issues des animaux

Comparativement aux végétaux, les produits issus des animaux sont moins exploités mais son potentiel dans la recherche récente des ingrédients cosmétique est inégalable. Par exemple, le mucus des escargots a montré sa bio-activité sur le traitement des lésions de la peau, la prolifération des fibroblastes, la capacité d'anti-vieillessement qui est due à ses activités antioxydantes [72] et antibactériennes naturelles [73].

Une autre espèce qui est connue pour sa contribution en cosmétique et en alimentation est l'apis. Le miel, outre la gelée royale, est le produit principal des abeilles obtenu à partir du nectar des fleurs. Le miel est riche en sucre (80%) avec la présence notamment de fructose, de glucose, de saccharose et de maltose [74]. De plus, le miel contient plusieurs peptides (défensin-1 et isoformes de la protéine de la gelée royale), des acides aminés (proline), une faible quantité de protéine (0.1-3%), des acides organiques (l'acide gluconique, l'acide citrique, l'acide ascorbique) et minéraux [74].

La recherche sur le miel a révélé son activité antioxydante, l'activité antimicrobienne, antiparasite, anti-inflammatoire. Dans le marché, le miel est commercialisé pour son activité de cicatrisation telle que Revamil® ou Surgihoney™ qui sont développés pour augmenter le pouvoir antimicrobien [75]. Par ailleurs, la propolis collectée par les abeilles est une résine végétale qui contient une majorité de polyphénols comme la quercétine, la formononétine (isoflavone O-méthylée, famille des flavonoïdes), l'acide coumarique [76]. La propolis est fabriqué par les abeilles à partir des diverses résines dont elles en enduisent l'intérieur des ruches pour garantir étanchéité, solidité et asepsie. La propolis est utilisée dans la médecine populaire pour traiter l'inflammation [77] et sa capacité en tant qu'antiviral, antibactérien[78], antioxydant favorisant la cicatrisation. La gelée royale, quant à elle, est riche en protéines, avec plus de 80% de glycoprotéines (major royal jelly proteins - MRJPs), et de lipides tel que l'acide gras trans-10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA)). Plusieurs études sont rapportées sur les propriétés antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoire de la gelée royale. Il a été également montré dans une étude, la capacité d'augmentation de la synthèse des collagènes ou de protection de la peau contre les UVB de la gelée royale et son composant principal 10-HDA [79]. Le composé 10-HAD synthétique (Hydroxydecine®), quant à lui, a été testé sur l'effet de restaurer la fonction de la peau et améliorer le xérosis sur la peau humaine [80].

Autre exemple, les protéines de lactosérum issues de lait contiennent une grande quantité d'acides aminés essentiels à la cicatrisation comme l'arginine, la glycine, des acides aminés à chaîne ramifiée, la leucine, l'isoleucine, la valine et la proline qui interviennent dans la production de collagène, une diminution de l'effet des espèces radicales oxygénées et le mécanisme de peroxydation [81].

1.3.3 La place des peptides dans les cosmétiques

Récemment, l'application des peptides dans les cosmétiques, et dans le cosméceutiques, contraction de (Cosme)tics et de Pharma(ceuticals) connaît un réel engouement depuis trois décades. L'utilisation des peptides naturels ou peptides biomimétiques (peptides synthétisés se basant sur des peptides naturels bioactifs) dans des produits cosmétiques a montré leur potentiel en termes d'efficacité, notamment dans le domaine de l'antivieillessement. Les cosméceutiques ciblent une allégation très précise comme les rides, les cernes colorés, les taches brunes, le contour des yeux, etc. Ils agissent au cœur des cellules afin de stimuler la production de collagène. Les cosméceutiques contiennent au moins 50 % de principes actifs ajoutés à la base du cosmétique traditionnel tels que des antioxydants, des produits botaniques naturels ou des peptides qui sont

capables de stimuler la croissance du collagène de la peau, ou des facteurs de croissance qui agissent comme des messagers chimiques entre les cellules de la peau et jouent un rôle dans la division cellulaire pour favoriser la formation de collagène et d'élastine.

Dans le cadre du cosmétique, les peptides sont divisés souvent selon leurs mécanismes d'action en peptide de signalisation, peptides transporteurs, peptide inhibant des neurotransmetteurs et peptide inhibant des enzymes [82] :

✓ **Les peptides de signalisation** sont capables d'ouvrir des canaux protéiques permettant la translocation de protéines synthétisées vers leur site d'action spécifique. Ces peptides sont caractérisés par sa structure de 3 domaines : un domaine N-terminal chargé positivement, un domaine central hydrophobe, et un domaine C-terminal polaire. Il est possible d'utiliser de tels peptides comme des facteurs de croissance pour activer la protéine kinase C, impliquée dans différentes fonctions physiologiques de la cellule (activation des plaquettes, modulation de l'activité des canaux ioniques, la sécrétion et la prolifération cellulaire) ou stimuler les fibroblastes dermiques [83].

✓ **Les peptides transporteurs** interviennent dans le transport et à la stabilisation des oligoéléments tels que le cuivre et le manganèse au sein des cellules. Le cuivre est un cofacteur essentiel pour la formation de collagène et élastine, et essentiel au bon fonctionnement catalytique des enzymes de la peau telle que la tyrosinase, la collagénase, l'enzyme lysyl oxydase, et les enzymes superoxydes dismutases. Ces peptides portent des éléments à la peau et permettent leur absorption par les cellules épithéliales [83], donc ils jouent un rôle important dans la cicatrisation.

✓ **Les peptides inhibant des neurotransmetteurs** peuvent augmenter le seuil de l'activité musculaire minimale et le mouvement nécessite ainsi plus de signal pour réaliser, réduisant le mouvement des muscles subconscients. Le mécanisme de la contraction musculaire est associé à la libération des vésicules contenant l'acétylcholine dans les jonctions neuromusculaires (NMJ) et l'interaction avec les complexes SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*). Ce processus est régulé par les protéines synaptobrevine et syntaxyne (SNAP-25) [82]–[84]. Ainsi, des peptides qui inhibent la contraction répétitive de muscles intrinsèques de l'expression du visage peuvent réduire des lignes hyperkinétiques sur le visage et de ce fait réduire les rides. Les peptides inhibant des neurotransmetteurs actuellement sont utilisées dans des

produits cosmétiques comme des mimétiques topiques des neurotoxines botuliques ("similaires au Botox").

✓ **Les peptides inhibant directement ou indirectement l'activité enzymatique** telle que la tyrosinase ou bien encore la réduction de la dégradation du collagène (MMP's) respectivement. Dans le cadre de la tyrosinase, les peptides contenant une arginine et/ou la phenylalanine combinée avec la valine, l'alanine et/ou la leucine [85] ont par exemple été montrés comme des potentiels inhibiteurs de cette enzyme. Afin d'illustrer cette information, l'heptapeptide (IQSPHFF) a présenté une activité inhibitrice de la tyrosinase de champignon avec un IC50 de 1.7 mM.

Dans le Tableau I.6, nous listons quelques exemples de peptides utilisés de nos jours en cosmétique.

Tableau I.6 : Exemples des peptides cosméceutiques

Classe	Fonction	Séquence	Mécanisme	Ref
Peptides de signalisation	Antivieillessement	Palm-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly	Stimulation de la prolifération des fibroblastes, réduction de l'expression de l'élastine et étant chimiotactique pour des fibroblastes.	[82]
	Agent de blanchiment	Arg-Asp-Gly-Gln-Ile-Leu-Ser-Thr-Trp-Tyr	Régulation de la différenciation des mélanocytes en diminuant l'activité de la tyrosinase et ralentissant les enzymes engagées dans la pigmentation.	[83]
	Réduction des rides	Lys-Thr-Thr-Lys-Ser	Stimulation de la retro-régulation de la synthèse de collagène et augmentation de production de EMCs comme collagène I, II et fibronectine.	[86]
Peptides transporteurs	Amélioration de l'apparence des ridules et augmentation de la densité et de l'épaisseur	glycyl-L-histidyl-Llysine (GHK-Cu)	Augmentation du niveau de MMP-2 dans la peau et aussi TIMP-1 et 2 d'où une stimulation de remodelage du collagène. Activation de la production des tissus connectifs.	[87]
Peptides inhibant des neurotransmetteurs	Similaire aux effets de la Waglerin-1	Tripeptide-3 (beta-Ala-Pro-Dab-NH benzyl-2-AcOH) commercialisé sous le nom de Syn [®] -Ake	Effet relaxant et diminution des rides.	[88]
	Similaire aux effets de botulinum toxine A	Acetyl-Glu-Glu-Met-Gln-Arg-ArgNH ₂	Inhibition de la formation de l'acétylcholine et atténuation de la contraction musculaire.	[89]

Peptides inhibant des enzymes	Agent de blanchiment	Peptides du riz noir hydrolysé	Inhibition de l'activité des MMP's et stimulation de la synthèse d'acide hyaluronique dans les kératinocytes.	[90]
		Peptides de son de riz hydrolysé	Inhibition de l'enzyme tyrosinase et la mélanogenèse sur cellules B16F10.	[91]
		Ile-Gln-Ser-Pro-His-Phe-Phe	Inhibition de tyrosinase de champignon en ce liant au site actif de l'enzyme proche des ions de cuivres catalytiques. Suivi de la formation des liaisons hydrogènes avec les cinq résidus d'histidine sur le site actif.	[92]

En tant que ressource naturelle riche en peptides bioactives, le venin apparaît comme un candidat potentiel dans la recherche de molécules actives pour des applications thérapeutiques et cosmétiques. Dans ce contexte, les venins d'animaux et celui du venin d'abeille ont été utilisés largement dans l'ethnomédecine et attirent considérablement l'attention des entreprises dans ce potentiel d'activité [93]. Dans ce contexte, nous présenterons dans la partie suivante un bref bilan sur les venins d'animaux en focalisant les compositions et les applications dans la cosmétique des venins des Hyménoptères.

2 Potentiel moléculaire des venins du monde animal

2.1 Qu'est-ce qu'un venin ?

Un venin est un terme indiquant toutes substances toxiques naturelles sécrétées par des animaux et destinées à se protéger ou à paralyser leurs proies. Suite à 300 millions d'années d'évolution pour aboutir à une composition optimale [94], le venin est un mélange complexe contenant généralement un grand nombre des molécules bioactives comme des phospholipases ayant pour objectif de détruire les phospholipides membranaires des cellules, les enzymes hyaluronidase dont le rôle est d'augmenter la perméabilité locale des tissus des proies et augmente aussi la puissance d'autres toxines, des protéases qui sont responsables de nécroses en détruisant les tissus, des peptides linéaires ou riches en cystéine qui constituent les toxines qui peuvent avoir différents impacts au niveau de l'organisme, neurologique, cardio-vasculaire, musculaire ou indifférencié et des petites molécules (telles que des bioamines de neurotransmetteurs, des phéromones [95]).

Les toxines, dont la masse moléculaire est généralement inférieure à 30 kDa, se fixent à un récepteur spécifique, le plus souvent membranaire, qui sera activé ou inhibé plus ou moins durablement pour induire les effets pharmacologiques spécifiques dans le système physiologique [96]. Les toxines de venin sont sous-classifiées selon leur activité : l'hémotoxine, la neurotoxine, la cardiotoxine et la cytotoxine. Les hémotoxines réagissent sur le système cardiovasculaire et sanguin, et sont capables de provoquer des perturbations de la coagulation du sang, et par conséquent, peuvent induire une hémorragie interne avec d'intenses douleurs. Les neurotoxines ciblent le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) situé sur la membrane postsynaptique des cellules musculaires ou nerveuses. Ces toxines bloquent de manière rapide et presque irréversible l'activité de ce récepteur et donc la transmission de l'influx nerveux. Ces neurotoxines entraînent alors une paralysie des muscles et une déficience respiratoire. Les cardiotoxines sur le système cardiovasculaire empêchant le cœur de battre [97].

La composition des venins animaux est spécifique à chaque espèce. Elle reflète en effet le comportement de capture des proies et leur variabilité peut être influencée par des facteurs tels que l'âge, le sexe, le régime alimentaire, les différentes périodes de reproduction, l'emplacement géographique par exemple.

Par exemple, les venins des cônes marins sont puissants, complexes et riches en peptides constitués de 12 à 30 acides aminés (les conopeptides). Chacun des venins contient plus de 100 à

200 peptides différents. Ces venins constituent ainsi une arme puissante pour compenser leur faible vitesse et faire face à une grande diversité de proies dont les cônes se nourrissent. Quant aux serpents, leur venin est composé en grande majorité par des peptides (8 à 70 acides aminés) et protéines (enzymes, toxines) qui peuvent représenter jusqu'à 90% de la masse sèche du venin. Les 10% restant, constitués d'hydrates de carbone (sucres), sels, lipides, acides aminés, petits peptides, amines biogènes (histamine, sérotonine, acétylcholine), nucléotides, nucléosides, ainsi que des composants inorganiques (calcium, zinc, aluminium..) joue un rôle dans la stabilité des dites protéines [95].

Les venins apparaissent comme une source de molécules bioactives qui peuvent être autant d'ingrédients potentiels dans la formulation de produits cosmétiques.

Quant au domaine cosmétique, des études ont d'ores et déjà montré que les venins possèdent des capacités d'antibiotiques ou se constituent d'inhibiteurs d'enzymes telles que la collagénase, l'élastase, la tyrosinase. Sans oublier la présence d'agents bloquants des canaux ioniques qui peuvent entraîner une diminution significative de la sensibilité de la peau, ou bien encore diminuer la perte d'eau trans-épidermique. Des produits cosmétiques anti-âge commercialisés sous le nom de Pranaléo® ou encore Syn®-Ake et Eyeseryl® affichent d'ores et déjà une liste d'ingrédients dans lesquels on trouve des molécules de synthèse actives issues à l'origine de venin de serpent vipère des temples (*Tropidolaemus wagleri*) tel que le dipeptide diaminobutyroylbenzylamidediacétate et l'acétyl tetrapeptide-5. Du fait de leur capacité à cibler un grand nombre de macromolécules telles que les enzymes, les peptides présentent une source moléculaire encore peu exploitée et ayant un potentiel certain en tant que futures molécules actives en cosmétique. Cet intérêt pour la recherche de peptides actifs issus de venin est guidé par le fait qu'il soit possible de concevoir un peptidomimétique ou une molécule qui s'apparentent et qui portent les fonctions chimiques essentielles du ou des peptides actifs. On parlera alors de peptidomimétique ou de pseudo-peptide. Pour ces produits, le peptide extrait du venin n'est plus alors une finalité mais bien un modèle de conception. Il est possible d'apporter alors des transformations permettant de jouer sur les propriétés physico-chimiques (lipophilie, hydrophilie, solubilité, biodégradabilité).

L'utilisation topique de substances dépigmentantes efficaces et inoffensives est particulièrement recherchée en cosmétique et en dermatologie. La recherche de nouveaux composés pour prévenir ou atténuer le vieillissement de la peau et également améliorer l'image de soi est une priorité des recherches actuelles dans les cosmétiques actifs. Un des nombreux

challenges est donc la conception, la fabrication ou l'isolement de nouvelles substances dépigmentantes non irritantes, non toxiques et/ou non allergisantes pour la peau aussi efficace que celles connues tout en étant stables dans une composition.

C'est dans ce contexte que nos travaux ont portés sur l'étude d'une source particulière de molécules potentiellement bioactives en l'occurrence le venin de frelons asiatiques ou frelon à pattes jaunes (*Vespa velutina nigrithorax*) de l'ordre Hyménoptère.

2.2 Ordre des Hyménoptères

2.2.1 La classification des insectes

La classe des insectes (Insecta) regroupe des animaux invertébrés constituant la plus grande diversité animale sur Terre ayant la biomasse jusqu'à 7,8 millions d'individus [98]. De nos jours, les insectes occupent environ 55% de la biodiversité des espèces et 85% de la biodiversité des animaux.

L'ordre des Hyménoptères est le troisième grand ordre du groupe des insectes sur Terre. Il contient plus de 150 000 espèces, comprenant entre autres les guêpes, les bourdons, les abeilles, les fourmis et les mouches [99], [100] pour 1 à 3 millions d'espèces estimées restant à décrire ou même à découvrir. Son nom vient des mots grecs anciens « humén » et « pteron », c'est-à-dire la membrane et l'aile, respectivement. Dans cet ordre, les insectes possèdent deux paires des ailes membraneuses sans écailles, celles antérieures étant plus larges que celles postérieures [101]. L'ordre Hyménoptère est divisé en deux groupes majeurs : les Symphytes et les Apocrites) (**Figure I.10**

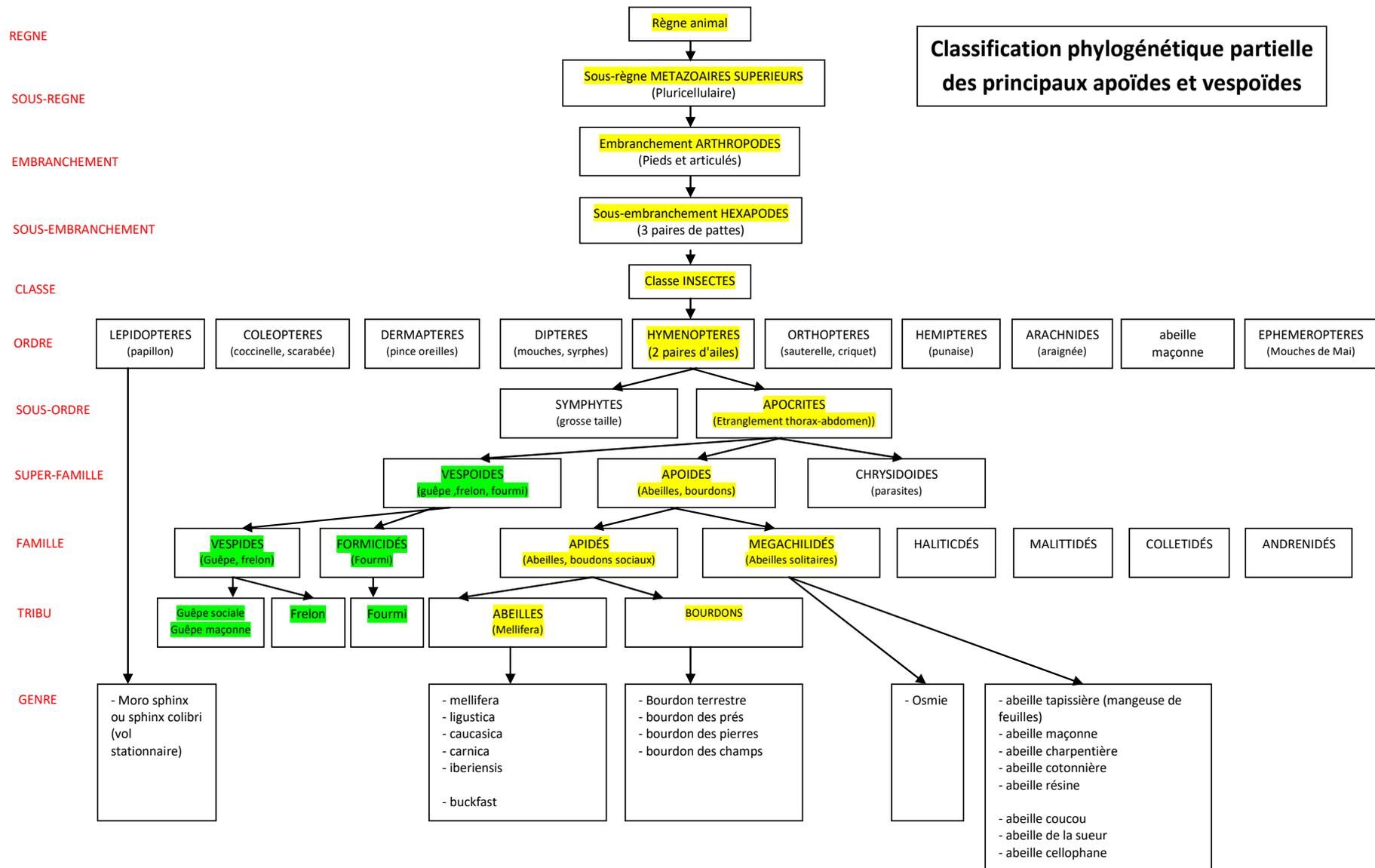


Figure I.10 : Classification des insectes (d'après André-Claude Deblock, 2019 [102])

Les Hyménoptères sont végétariens, prédateurs ou parasites. Certains hyménoptères forment des sociétés avec plusieurs types d'individus. Les Hyménoptères constituent l'un des 3 plus importants ordres d'insectes avec plus de 120 000 espèces décrites dans le monde. En France on compte environ 8 000 espèces d'hyménoptères. Les Apocrites sont divisés en deux groupes, les Ténébrants et les Aculéates [103], [104]. Les Ténébrants ou « porte-scie » sont presque tous parasites d'autres arthropodes, ou responsables de galles chez les végétaux. Les Aculéates, autrement appelés les « porte-aiguillons », regroupent les principaux insectes sociaux (à l'exception des termites) : abeilles et bourdons, guêpes et fourmis. Ils vivent en colonies dans des nids dans lesquelles chaque groupe, ou caste, a un rôle bien déterminé. Les Aculéates englobent les trois superfamilles suivantes : Apoidea, Vespoidea et Chrysoidea qui sont les plus étudiées [103]. Les vespoïdes (Vespoidea) sont donc une « superfamille » d'insectes, elle-même répartie en huit superfamilles dont les vespides (Vespidae) qui elle-même se décline en quatre sous-familles dont Vespinae dont font partis les frelons.

2.2.2 La composition des venins des Hyménoptères

Le venin des Hyménoptères est composé à 88% d'eau et un mélange complexe de molécules incluant des sucres (glucose, fructose), des phospholipides, des molécules volatiles [105], des molécules bioactives comme des amines biogéniques (sérotonine, histamine -responsable de la douleur immédiate et de la réaction inflammatoire locale après la piqûre, tyramine, dopamine, noradrénaline et adrénaline), des peptides tels que les kinines (peptides qui possèdent la propriété pharmacologique similaire à la bradykinine) provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire, la contraction des muscles lisses, une diminution de la pression artérielle [106] et la douleur ou bien l'apamine (peptide de 18 acides aminés) agissant sur le système nerveux central et périphérique, des protéines comme des protéases, des hyaluronidases qui facilitent l'accès des membranes aux autres constituants du venin et donc capable par conséquent de majorer l'effet des composants toxiques, des phosphatases, des nucléotidases et des phospholipase A et B qui provoquent la contraction des muscles lisses, abaissent la pression sanguine, détruisent les membranes cellulaires par hydrolyse des phospholipides, et des allergènes [107]. Les peptides de venin des Hyménoptères, dont la masse moléculaire est comprise entre 1 000 et 7 000 Da, contribuent jusqu'à 70% de masse lyophilisée du venin [108].

Les venins des Hyménoptères, par exemple des venins de l'abeille et des guêpes, peuvent conduire aux réactions allergiques telles qu'un choc anaphylactique (anaphylaxie).

D'après le **Tableau I.7**, la phospholipase A2 (12-5% du poids sec du venin) est la principale protéine allergène du venin d'abeille qui dénature les phospholipides membranaires. Les autres allergènes majeurs sont l'hyaluronidase (Api m2) et la phosphatase acide (Api m3) qui toutes deux présentent un caractère toxique et favorisent la diffusion du venin. La principale toxine rencontrée dans le venin de l'abeille est la mélitine (Api m4-peptide composé de 26 acides aminés), qui correspond à 50 % du poids sec du venin. Elle peut détruire les globules rouges par atteinte des phospholipides membranaires. Selon la dose et l'organe cible, elle provoque une constriction ou une dilatation des vaisseaux. En plus, elle accroît la perméabilité vasculaire locale et provoque la contraction des muscles lisses. Elle est également responsable de la douleur et est susceptible de libérer des facteurs chimiotactiques pour les éosinophiles et les neutrophiles.

Tableau I.7 : Propriétés pharmacologiques des constituants du venin d'abeille[109]

	Histamine	Mellitine	Apamine	MCD peptide	Hyaluronidase	Phospholipase A2
Poids sec (%)	0.1-1	50	2	2	1-3	12
Poids moléculaire (Da)	111	2840	2038	2593	>20 000	524
Douleur	++	++	?	?	-	?
Vasodilatation	++	++	+	+	+	+
Cytotoxicité	-	++	?	+	-	+
Neurotoxicité	-	+	++	+	-	-
Hémolyse directe	-	++	+	+	+	+
Effets sur muscles lisses	++	++	-	-	-	-
Hémolyse indirecte	-	-	-	-	-	++
Histamino libération	-	++	?	++	-	+
Inactivation thromboplasmine	-	+	?	?	-	++
Interruption transport d'électrons	-	+	?	?	-	++
Interruption phosphorylation oxydative	-	+	?	?	-	++
Effets de diffusion	-	-	-	-	++	-

Le venin des guêpes contient majoritairement les allergènes phospholipase A₁ (Ves v1), l'hyaluronidase (Ves v2), et des peptides tels que la bradykinine (vasodilatateur) et le neurotoxique

antigène 5 (**Error! Reference source not found.**). Généralement, les réactions provoquées par les venins des vespidés (guêpes, frelons) concernent la production des douleurs prolongées, l'œdème, des érythèmes locaux issus de l'augmentation de perméabilité des vaisseaux sanguins dans la peau. Si le venin est injecté par voie intraveineuse, il peut provoquer la réduction de la pression artérielle et libérer l'histamine endogène à partir de granulocytes ce qui favorise la vasodilatation des vaisseaux sanguins et leur perméabilité. En plus, il peut également libérer des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) à partir de cellules chromaffines des glandes surrénales et entraîne l'hémolyse (destruction des globules rouges) ou le phénomène d'attraction des macrophages et des leucocytes polynucléaires appelé chimiotactisme [110]. Parmi les peptides, on y trouve également les mastoparans qui sont des peptides à caractère amphipathique de dégranulation des mastocytes conduisant à la libération des granulations qui contiennent de l'histamine (tout comme le peptide MCD du venin d'abeille) et qui, au contact d'un antigène, entraîne une hypersensibilité immédiate et une inflammation. Ces mastoparans possèdent également des propriétés hémolytiques et antibactérienne [98].

Environ 50 -140 µg de venin sont délivrés dans une pique d'abeille alors que la guêpe, insecte capable de piquer à plusieurs reprises, en libère jusqu'à 3 µg par pique. Les compositions de venins sont différentes en fonction des développements des insectes et de la localisation de leur nid [104]. Chez une même espèce, on peut également concevoir que la qualité (constitution) du venin peut varier suivant la période de l'année. En été où les abeilles et les guêpes sont en pleine activité, le venin semble généralement plus actif.

Tableau I.8 : Principaux composés actifs identifiés dans le venin d'abeille et de guêpe[111]

Composé	Venin d'abeille	Venin de guêpe	Type et Masse (kDa)	% composé (poids sec)
Phospholipase A2	X	X	Enzyme (≈18kDa)	10-12
Phospholipase B	X	X	Enzyme (≈26kDa)	1
Hyaluronidase	X	X	Enzyme (≈54kDa)	1.5-2
Phosphatase	X	X	Enzyme (≈60kDa)	1
α-Glucosidase	X	X	Enzyme (≈170kDa)	0,6
Melittine	X		Peptide (≈2847Da)	40-50
Apamine	X		Peptide (≈2027Da)	2-3
Peptide MCD	X		Peptide (≈2593Da)	2-3
Mastoparans		X	Peptide (≈1422Da)	Non décrit
Kinines		X	Non décrit	Non décrit
Bradykinine		X	Peptide (≈1060Da)	Non décrit
Antigène 5 (ves v5)		X	Protein (≈23 kDa)	Non décrit

Quant aux venins de scorpions et d'araignées, ils sont principalement composés de protéines neurotoxiques présynaptiques qui ciblent le système nerveux périphérique, les muscles squelettiques et le myocarde. Bénéficiant d'une étroite spécificité, ces neurotoxines se fixent principalement sur les canaux ioniques membranaires sodium et potassium aboutissant à une forte dépolarisation membranaire, suivie dans un deuxième temps d'une perte de l'excitabilité.

2.3 Apport du venin en cosmétique

2.3.1 Le venin d'abeille en cosmétique

Actuellement, des produits cosmétiques se basant sur le venin d'abeille ont été présentés sur le marché. Outre son activité antioxydante potentielle [112], [113], une étude a montré que le venin d'abeille peut accélérer la cicatrisation par inhibition des cytokines induisant la diminution de largeur de la plaie et simultanément favorise l'augmentation de la prolifération épithéliale sur un modèle de plaie d'excision de souris [114]. De plus, il a été montré que le venin d'abeille permet de stimuler la migration des kératinocytes de l'épiderme humain (HEK) *in vitro* et de diminuer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et TNF- α) [115]. En outre, le venin d'abeille brut et sans phospholipase A2 peuvent conduire à l'inhibition de métalloprotéases matricielles MMP-1 et MMP-13 sur les kératinocytes humains (HaCat) et MMP-1, -2, -3 sur des fibroblastes dermiques humains (HDF) soumis à une exposition aux UVB [116]. Dans une revue récente, la gelée royale, le propolis ainsi que le venin de l'abeille *Apis mellifera* L. ont montré leur bioactivité anti-inflammatoire et sur la cicatrisation des plaies cutanées chez la de souris [81].

Le venin d'abeille contient également une variété de peptides antimicrobiens. Il peut ainsi posséder une activité significative inhibitrice sur des bactéries différentes comme *Staphylococcus aureus* méticilline résistant (MRSA) et ce à de faibles concentrations avec CMI = 0.085 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et CMI=0.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de venin brut sur la souche CCARM 3366 et CCARM 3708 [117]. Des études sur la capacité antibactérien de mélitine tout en garantissant une toxicité minimale *in vitro* et *in vivo*, notamment sur *Staphylococcus aureus* méticilline résistant (MRSA) a également été montré [118], [119]. Une autre étude met en avant la capacité réparatrice du venin d'abeille sur la peau de souris endommagée par *Propionibacterium acnes*, révélant ainsi son potentiel de venin d'abeille comme agent anti-acnés pouvant être employé dans les cosmétiques [120]. Le venin d'abeilles purifié présente quant à lui un effet sur le traitement de l'acné vulgaris, maladie inflammatoire chronique cutanée, à la fois *in vitro* et *in vivo* [121]

Au niveau de l'hyperpigmentation de la peau, des études préliminaires réalisées sur l'activité anti-mélanogénèse démontrent que le venin d'abeille a inhibé l'activité de tyrosinase de champignon et de cellule de mélanome de B16F10 et diminuer l'expression de l'enzyme mélanogénique dans les cellules de B16F10 stimulées par la mélanocortine ou α -Melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) utilisée pour son action mélanostimulante [122]. De plus, l'étude clinique effectuée sur des femmes âgées de 30 à 49 ans a montré l'effet antirides d'un sérum de venin d'abeille sur la peau en se basant sur la surface totale des rides, le nombre total de rides et la profondeur moyenne des rides [123].

2.3.2 Le venin de frelon en cosmétique

Dans une étude, l'extrait d'un venin du frelon oriental *Vespa orientalis* a été appliqué sur une plaie cutanée expérimentale sur le dos d'un rat. Les résultats histologiques montrent que le venin de frelon peut accélérer la cicatrisation, probablement lié à un effet collagénolytique dans le venin [124]. Une autre étude *in vitro* sur le mastoparane-B (un peptide isolé de venin de *Vespa basalis*) a révélé des propriétés antioxydantes potentielles à faibles concentrations (8 μ g/mL) dans le scavenging de l'oxyde nitrique et jusqu'à 15 000 U/g peptide et 12 000U/g peptide à 16 μ g/mL de l'activité antioxydante proche de celle des enzymes superoxydase dismutase et glutathion peroxydase [125].

2.3.3 Le venin d'autres animaux en cosmétique

Du fait de la diversité moléculaire des venins, celle-ci leur confère un intérêt tout particulier en tant que source de molécules bio-optimisées et bioactives dans le domaine cosmétique. Des laboratoires de cosmétique (Skineance, Armonia) ont valorisé le potentiel du venin de serpent. Ils sont partis de l'observation que les neurotoxines produites par la famille du cobra agissent sur la proie en bloquant les impulsions nerveuses sur les muscles, induisant une paralysie. Ainsi, le venin utilisé sous forme de crème sur la peau pourrait donner le même effet liftant que le Botox (une toxine botulique limite la contraction des muscles faciaux, utilisée en voie d'injection), ayant les effets plus longues et moins des effets secondaires [126]. Plus précisément, pour les crèmes et sérums anti-âge, il s'agit d'un tripeptide de synthèse, le Syn[®]Ake développé par Pentapharm mimant l'action du peptide waglerin-1 (peptide de 22 acides aminés, puissant bloqueur du muscle nAChR), présent dans le venin de la vipère du Temple (*Tropidolaemus wagleri*) et a pour effet de figer et d'inhiber les contractions musculaires responsables des rides d'expression et des effets de l'âge [127].

Le venin des cônes marins suscite également un intérêt grandissant pour l'industrie cosmétique. Le venin est très complexe et susceptible de contenir plusieurs centaines de molécules bio actives dont de nombreux petits peptides très structurés : les conopeptides. Environ 50 000 de conopeptides sont présents dans les venins des différents cônes. Récemment, la structure et le profil pharmacologique d'un nouveau μ -conopeptide (μ -CnIIIC) myorelaxant ont été étudiés [128] et a fait l'objet d'un dépôt de brevet (WO2013/156064A1). Cet actif procure un effet à la fois instantané et durable, car le peptide s'accumule et agit continuellement pour aider la peau à se réparer en permettant au nouveau collagène de croître et de mûrir, augmentant ainsi l'élasticité de la peau [129]. Ce peptide est actuellement commercialisé sous le nom XEP®-018/030 (WO2007/054785A1) par la société Activen SA basée à Lausanne.

En outre, les venins d'araignée constituent également une source de premier plan dans la recherche de nouveaux ingrédients du cosmétique. Une polyamine nommée Argiotoxine-636 (ArgTX-636) issues du venin d'araignée *Argiope lobata* est connue pour réguler la mélanogénèse de manière dose-dépendante, avec IC50 de 5.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lorsque la L-DOPA a été utilisée comme substrat et un contrôle positif, l'acide kojique montre un IC50 de 18.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Elle réduit également la production de mélanine dans les cellules de B16F10 [130].

De plus, un peptide synthétisé dénommé SensAmone P5 inspiré d'une protéine du venin d'anémone de mer a montré la capacité inhibitrice du récepteur TRPV1 qui est responsable d'hypersensibilité de la peau. Ce peptide est donc utilisé pour calmer la peau sensible et réduire l'irritation de la peau [131].

3 Le Frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) et son venin

3.1 Organisation sociale du frelon asiatique

Vespa velutina ou le frelon asiatique ou le frelon à pattes jaunes, est une espèce de l'ordre Hyménoptère, dans la famille de Vespidae, il fait partie de la sous-famille des Vespinae et du genre *Vespa*.

Cet insecte existe en nombreuses sous- espèces, l'espèce de *Vespa velutina nigrithorax* est reconnue comme une première espèce de Vespidae envahissante d'Asie en Europe par une introduction accidentelle via le transport maritime de province du Zhejiang ou du Jiangsu (Chine) en

2004 [132]. Cet insecte réside naturellement dans la région montagneuse du nord de l'Inde à la péninsule indochinoise, Taiwan et l'Indonésie. En France, depuis la première invasion dans le sud-ouest de la France (département du Lot-et-Garonne), il était présent en 2014 sur 67 départements couvrant environ une surface de 360 000 km² (**Figure I.11**). Le frelon asiatique est aujourd'hui présent au Portugal, en Italie, aux Pays-Bas, et même de l'autre côté de la manche, en Grande-Bretagne.

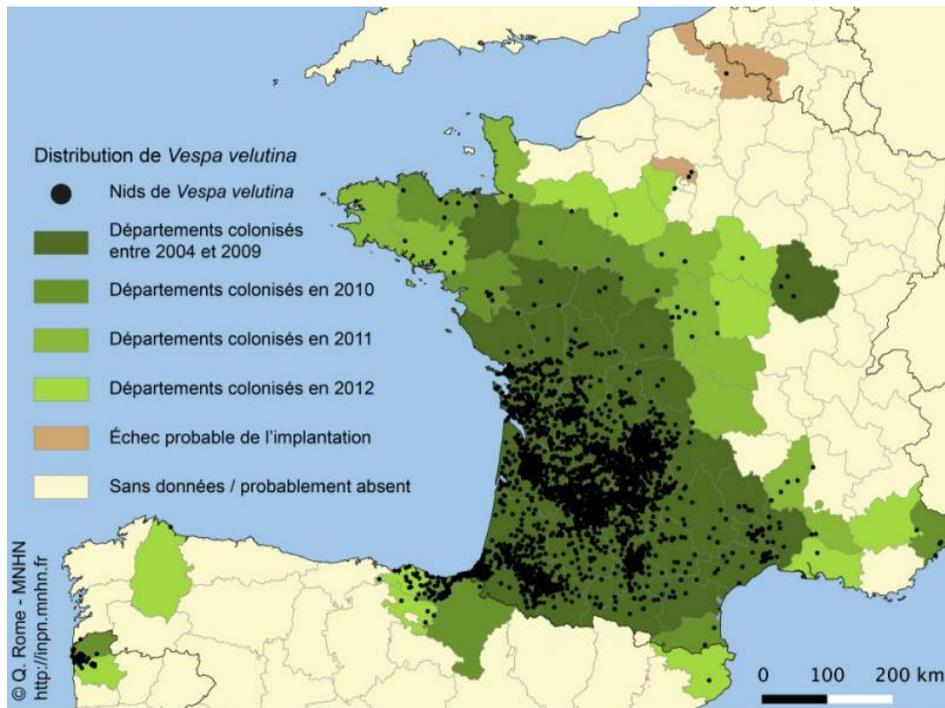


Figure I.11 : Distribution de *Vespa velutina* en France entre 2004 et 2012 (Données INPN 2013)

[133]

Le frelon asiatique se reconnaît par sa couleur sombre, un thorax velouté, brun noirâtre, des segments abdominaux bruns à fines rayures jaunes et des pattes brunes à la pointe jaune, la taille d'un frelon asiatique est estimée entre 17 et 32 mm.

Le frelon *Vespa velutina* construit un volumineux nid de papier mâché, composé de plusieurs galettes de cellules entourées d'une enveloppe faite de larges écailles de papier, striées de beige et de brun (**Figure I.12**). Le nid peut devenir ovalaire et atteindre jusqu'à 1 m de haut et 80 cm de diamètre quand il est fixé à plus de 15 m de haut dans un grand arbre [134].



Figure I.12 : Nid de frelon asiatique [135]

Le frelon asiatique vit principalement en milieu forestier mais il se trouve également en zone périurbaine à cause de l'extension de l'urbanisation aux dépens de la forêt.

Le frelon asiatique a un régime alimentaire très varié. Outre les abeilles, il s'attaque aux insectes de très nombreux ordres et notamment aux guêpes, mouches, papillons ou chenilles ainsi qu'aux araignées dont ils nourrissent leurs larves. La **Figure I.13** montre le cycle de la vie de la société de frelon asiatique. En automne d'octobre à novembre, les femelles reproductrices de la nouvelle génération (les gynes) quittent le nid avec des mâles pour s'accoupler. Elles sont les seules à hiverner tandis que les autres castes (les mâles, les dernières larves et les ouvrières) meurent. Au printemps de mars à juin, chaque reine fondatrice ébauche un nouveau nid, pond quelques œufs et s'occupe de ses premières larves qui deviendront dans 1 mois à 1.5 mois plus tard des ouvrières adultes. Ces dernières sont capables de construire le nid et d'entretenir la colonie. La reine passera ensuite le reste de sa vie à pondre les oeufs [136]. Avec l'apparition des ouvrières, l'activité de la colonie s'intensifie considérablement et la taille du nid augmente pour atteindre son maximum au début de l'automne [137]. A partir de septembre, le nombre de mâles et de gynes (futures reines capables de fonder une nouvelle colonie) s'accroît. Le nombre de mâle peut représenter jusqu'à trois fois le nombre de femelles [138], [139]. La vieille reine meurt peu de temps avant l'essaimage des sexués. Le reste de la colonie dépérit et meurt au cours de l'hiver.

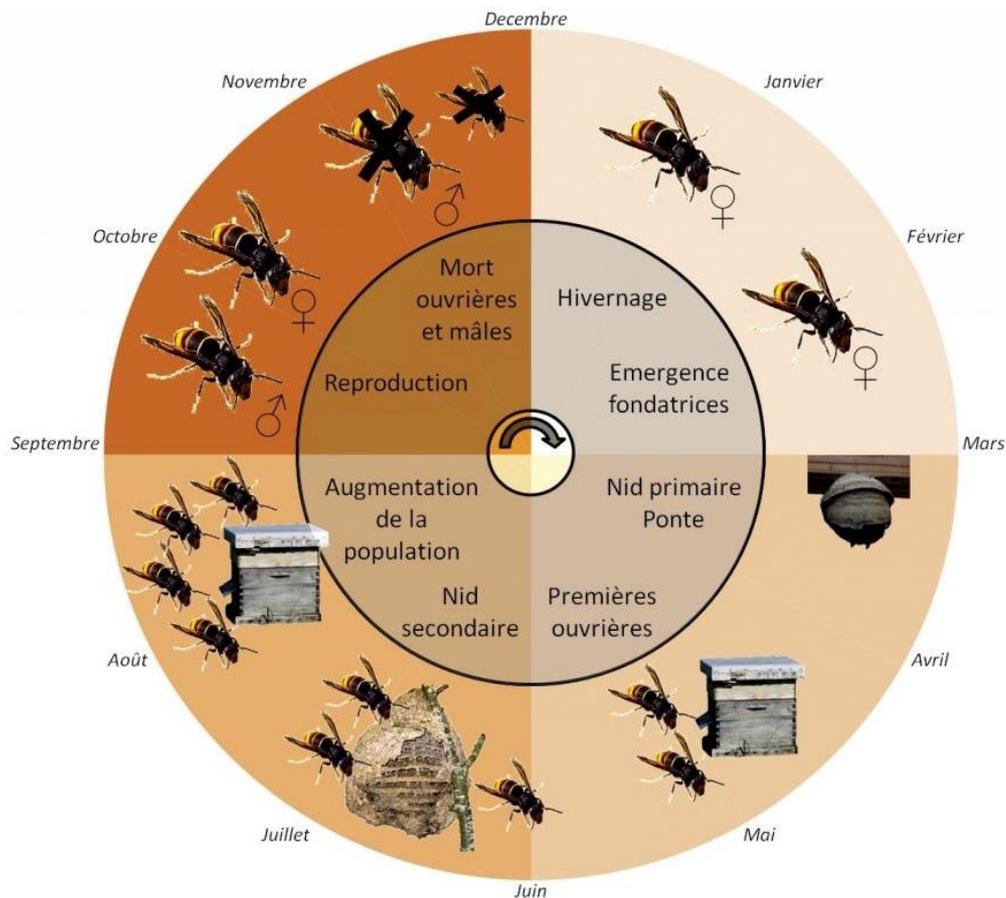


Figure I.13 : Cycle de la vie de frelon *Vespa velutina* (Source : INRA, K.Monceau et D.Thiéry)

La nourriture principale pour le frelon asiatique est constituée de carbohydrate et de protéines. La source de carbohydrate provient essentiellement du nectar de fleur, de sève d'arbre ou des fruits mûrissants. Les protéines, qui viennent de divers arthropodes et des insectes de la famille des apidés, représentent le tiers voire la moitié du régime des frelons [139]. Ainsi, la prédation par le frelon *Vespa velutina* envers les colonies d'abeilles domestiques débutent à la mi-juin, avec un maximum d'intensité tout l'été et se prolonge jusqu'à la fin novembre [140], [141]. Les abeilles domestiques *A.mellifera* volant devant leur ruche sont les proies principales du frelon *Vespa velutina* [141]. Par ce comportement, les frelons *V.velutina* posent un réel problème aux apiculteurs en Europe. Par exemple, en Dordogne, un rapport portant sur 1 979 ruches en 2009 et sur 1 991 ruches en 2010 a montré que 5% des ruches ont été détruites par *V. velutina* chaque année et 16 et 27% des ruches ont été impactées en 2009 et en 2010, respectivement. Aussi, l'invasion de *V.velutina* en Europe attire l'attention du gouvernement pour mettre rapidement en place des politiques européennes particulières pour limiter les invasions biologiques et ses conséquences graves [138].

3.2 La composition du venin de frelon asiatique

La recherche sur le venin du frelon asiatique *Vespa velutina nigrithorax* est encore rarement décrite à nos jours. Récemment, une étude réalisée sur la composition de venin de *Vespa velutina* par Zhirui Liu et *al* en 2014 a révélé des toxines classifiées en huit groupes : toxines du canal ionique, neurotoxines présynaptiques, métalloprotéase, sérine estérases, phospholipases, toxines altérant l'hémostase, toxines altérant le récepteur couplé à la protéine G et des toxines d'autres fonctions ont été identifiées [135] (**Tableau I.9**).

Tableau I.9: Familles de toxines détectées dans *Vespa velutina* [135]

Famille de toxine	Nom des toxines détectées dans <i>Vespa vélutina</i>
Toxines du canal ionique	Potassium channel, Calcium channel, Analgesic polypeptide
Neurotoxine présynaptique	Latrotoxin, Orientotoxin
Protéase	Metalloprotease, Serine protéase
Estérase à sérine	Acetylcholinesterase
Phospholipase	Phospholipase A2
Toxine affectant hemostase	Venom prothrombin activator Blarina toxin, Ryncolin-3/4, Thrombin-like enzyme Snaclec, Factor V activator, Lectoxin-Enh4 Fibrinogenase brevinase, Oscutarin-C Venom plasminogen activator, Veficolin Vascular endothelial growth factor toxin Coagulation factor
Toxine altérant le récepteur couplé à la protéine G	Conophysin-R
Autres composants du venin	Endopeptidase inhibitor, Plancitoxin, Gigantoxin-1 SE-cephalotoxin, U8-agatoxin-Ao1a Nematocyte expressed protein-6 Natterin-4

D'autres travaux, basés sur des informations de brin d'ARN du venin de *V. velutina nigrithorax*, ont montré la présence de l'apamine, la mélitine et des peptides de dégranulation des mastocytes dont les structures sont similaires à celles trouvées chez les abeilles *Apis mellifera* [142]–[144]. Ainsi, Chun Hsien Lin et *al* a identifié une séquence de la mastoparane Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-

Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂ à partir du clonage de cADN dans une sous-espèce *Vespa velutina flavitarsus* et a montré alors une activité antimicrobienne significative sur plusieurs bactéries gram positive telles que *Staphylococcus*, *Streptococcus alactolyticus*, *Staphylococcus xylosus* et gram négative comme *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio parahemolyticus*, *Citrobacter koseri* [145].

Une étude clinique sur 8 patients souffrant de réactions à des piqûres de *Vespa velutina* met en évidence la présence d'antigène 5 responsable de l'anaphylaxie sur l'homme [146]. Il a été également trouvé des phéromones telles que diméthylnonen-2-one ayant comme rôle potentiel d'alerter les frelons en cas de menace [147].

Conclusion

En résumé, ce travail de bibliographie nous permet de synthétiser des connaissances sur la dermacosmétique avec des cibles et des études expérimentales réalisées dans la recherche de nouveaux ingrédients cosmétiques pour améliorer l'image de soi. Par conséquent, nous avons choisi des cibles adaptées à notre échantillon et notre condition de laboratoire.

Dans deuxième temps, une partie de bibliographie sur la composition de venin et son application dans la cosmétique a été montrée. Cela nous permet d'obtenir une meilleure connaissance sur notre animal.

A l'issue de cette présentation bibliographique, nous exposerons notre stratégie de valorisation du venin de frelon asiatique dans la cosmétique. Les trois prochains chapitres vous présenteront notre stratégie ainsi que les résultats obtenus dans ce projet :

- ✓ Stratégie de valorisation de venin du frelon asiatique en cosmétique, matériel et méthodologie (**Chapitre II**).
- ✓ Résultat sur le criblage des activités biologiques du venin de frelon asiatique et identification de molécules actives (**Chapitre III**).
- ✓ Développement d'une approche multivariée dans le cadre de l'étude du « sourcing » des profils peptidiques du venin frelon asiatique. Mise en place d'une approche séquençage *de novo* pour l'identification des molécules discriminantes et leur activité biologique (**Chapitre IV**).

Références

- [1] "Human skin," *Wikipedia*. https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Human_skin&oldid=895073209 (accessed May 22, 2019).
- [2] G. J. Tortora and B. Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiology*, 14th ed. Wiley, 2013.
- [3] "La peau humaine normale," Jan. 28, 2011. <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article9> (accessed Oct. 28, 2019).
- [4] M. Cavinato, "Cosmetics and Cosmeceuticals," in *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2018.
- [5] O. DIOURI, "Les vergetures chez l'enfant : facteurs etiologiques et traitement," thesis, 2019.
- [6] N. A. Monteiro-Riviere and F. L. Filon, "Chapter 11 - Skin," in *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, B. Fadeel, A. Pietroiusti, and A. A. Shvedova, Eds. Boston: Academic Press, 2012, pp. 185–207.
- [7] P. Piccerelle, "Le vieillissement cutané : prévention et réparation." Accessed: Jun. 26, 2020. [Online]. Available: https://www.mediachimie.org/sites/default/files/beaute_p89.pdf.
- [8] T. Quan and G. J. Fisher, "Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging," *Gerontology*, vol. 61, no. 5, pp. 427–434, 2015, doi: 10.1159/000371708.
- [9] S. Zhang and E. Duan, "Fighting against Skin Aging," *Cell Transplant*, vol. 27, no. 5, pp. 729–738, May 2018, doi: 10.1177/0963689717725755.
- [10] O. Friedman, "Changes Associated with the Aging Face," *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, vol. 13, no. 3, pp. 371–380, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.fsc.2005.04.004.
- [11] B. L. Diffey, "What is light?," *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, vol. 18, no. 2, pp. 68–74, Apr. 2002, doi: 10.1034/j.1600-0781.2002.180203.x.
- [12] E. Makrantonaki and C. C. Zouboulis, "Molecular Mechanisms of Skin Aging," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1119, no. 1, pp. 40–50, 2007, doi: 10.1196/annals.1404.027.
- [13] P. Brenneisen *et al.*, "Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts," *Photochem. Photobiol.*, vol. 64, no. 5, pp. 877–885, Nov. 1996.
- [14] K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, "Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts," *FEBS Letters*, vol. 331, no. 3, pp. 304–306, 1993, doi: 10.1016/0014-5793(93)80357-Z.
- [15] I. Kusumawati and G. Indrayanto, "Chapter 15 - Natural Antioxidants in Cosmetics," in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 40, Atta-ur-Rahman, Ed. Elsevier, 2013, pp. 485–505.
- [16] S. Inoue, "Skin Aging," in *Cosmetic Science and Technology*, Elsevier, 2017, pp. 711–728.
- [17] Y.-J. Kim and H. Uyama, "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future," *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 15, pp. 1707–1723, Aug. 2005, doi: 10.1007/s00018-005-5054-y.
- [18] W. T. Ismaya *et al.*, "Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone," *Biochemistry*, vol. 50, no. 24, pp. 5477–5486, Jun. 2011, doi: 10.1021/bi200395t.
- [19] A. Salwiński, "Development of novel mass spectrometry-based approaches for searching for low-mass tyrosinase inhibitors in complex mixtures," Université d'Orléans, 2014.
- [20] H. Ando, "Chapter 44 - Melanogenesis," in *Cosmetic Science and Technology*, K. Sakamoto, R. Y. Lochhead, H. I. Maibach, and Y. Yamashita, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2017, pp. 729–736.
- [21] Y. Higa *et al.*, "Kojic acid -absence of tumor-initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin," *J Toxicol Sci*, vol. 32, no. 2, pp. 143–159, May 2007.
- [22] H. Shimogaki, Y. Tanaka, H. Tamai, and M. Masuda, "In vitro and in vivo evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition," *Int J Cosmet Sci*, vol. 22, no. 4, pp. 291–303, Aug. 2000, doi: 10.1046/j.1467-2494.2000.00023.x.
- [23] K. Maeda and M. Fukuda, "Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 276, no. 2, pp. 765–769, Feb. 1996.
- [24] D.-S. Kim *et al.*, "Inhibitory effects of 4-n-butylresorcinol on tyrosinase activity and melanin synthesis," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, no. 12, pp. 2216–2219, Dec. 2005.
- [25] H. Ando *et al.*, "Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of ubiquitin-proteasome function," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 15, pp. 15427–15433, Apr. 2004, doi: 10.1074/jbc.M313701200.

- [26] K. Nakamura, M. Yoshida, H. Uchiwa, Y. Kawa, and M. Mizoguchi, "Down-Regulation of Melanin Synthesis by a Biphenyl Derivative and Its Mechanism," *Pigment Cell Res*, vol. 16, no. 5, pp. 494–500, 2003, doi: 10.1034/j.1600-0749.2003.00084.x.
- [27] T. Hakozaki *et al.*, "The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer," *Br. J. Dermatol.*, vol. 147, no. 1, pp. 20–31, Jul. 2002.
- [28] A. Heinz, A. C. M. Huertas, C. U. Schröder, R. Pankau, A. Gosch, and C. E. H. Schmelzer, "Elastins from patients with Williams–Beuren syndrome and healthy individuals differ on the molecular level," *American Journal of Medical Genetics Part A*, vol. 170, no. 7, pp. 1832–1842, Jul. 2016, doi: 10.1002/ajmg.a.37638.
- [29] A. C. Mora Huertas, C. E. H. Schmelzer, W. Hoehenwarter, F. Heyroth, and A. Heinz, "Molecular-level insights into aging processes of skin elastin," *Biochimie*, vol. 128–129, pp. 163–173, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.biochi.2016.08.010.
- [30] R. P. Mecham, *Regulation of matrix Accumulation*. Elsevier, 1986.
- [31] N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, "The Role of Elastases Secreted by Fibroblasts in Wrinkle Formation: Implication Through Selective Inhibition of Elastase Activity," *Photochem. Photobiol.*, vol. 74, no. 2, pp. 283–290, 2001, doi: 10.1562/0031-8655(2001)0740283TROESB2.0.CO2.
- [32] D. M. Shotton, "Elastase," in *Methods in Enzymology*, vol. 19, Elsevier, 1970, pp. 113–140.
- [33] "Cours enzyme complexe substrat etat transition stereospecificite catalyse Enseignement recherche biochimie enzymologie bioinformatique Emmanuel Jaspard Universite Angers biochimej." <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/4EnzymologieLicence/1COURS1/111Cours.html> (accessed Dec. 15, 2019).
- [34] G. Imokawa and K. Ishida, "Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging I: Reduced Skin Elasticity, Highly Associated with Enhanced Dermal Elastase Activity, Triggers Wrinkling and Sagging," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 7753–7775, Apr. 2015, doi: 10.3390/ijms16047753.
- [35] O. Makarenko and A. Levitsky, "Biochemical Mechanisms of Therapeutic and Prophylactic Effects of Bioflavonoids," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 4, pp. 451–456, 2016, doi: 10.17265/2328-2150/2016.08.013.
- [36] B. Siedle, A. Hrenn, and I. Merfort, "Natural Compounds as Inhibitors of Human Neutrophil Elastase," *Planta Med*, vol. 53, no. 5, pp. 401–420, Oct. 2007, doi: 10.1055/s-2007-967183.
- [37] Q. L. Ying, A. R. Rinehart, S. R. Simon, and J. C. Cheronis, "Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes.," *Biochem J*, vol. 277, no. Pt 2, pp. 521–526, Jul. 1991.
- [38] J. L. Spencer, P. J. Stone, and M. A. Nugent, "New insights into the inhibition of human neutrophil elastase by heparin," *Biochemistry*, vol. 45, no. 30, pp. 9104–9120, Aug. 2006, doi: 10.1021/bi060338r.
- [39] P. Elsner, R. Sivamani, J. Jagdeo, and H. Maibach, *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*. CRC Press, 2015.
- [40] J. M. Fook, L. L. Macedo, G. E. Moura, F. M. Teixeira, A. S. Oliveira, and A. F. Queiroz, "A serine proteinase inhibitor isolated from Tamarindus indica seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase," *Life Sci*, vol. 76, pp. 2881–91., 2005.
- [41] C. K. Angerhofer, D. Maes, and P. U. Giacomoni, "Chapter 10 - The Use of Natural Compounds and Botanicals in the Development of Anti-Aging Skin Care Products," in *Skin Aging Handbook*, N. Dayan, Ed. Norwich, NY: William Andrew Publishing, 2009, pp. 205–263.
- [42] J. Varani *et al.*, "Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro," *Am. J. Pathol.*, vol. 158, no. 3, pp. 931–942, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64040-0.
- [43] J. L. Contet-Audonnet, C. Jeanmaire, and G. Pauly, "A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas," *Br. J. Dermatol.*, vol. 140, no. 6, pp. 1038–1047, Jun. 1999.
- [44] V.-M. Kähäri and U. Saarialho-Kere, "Matrix metalloproteinases in skin," *Experimental Dermatology*, vol. 6, no. 5, pp. 199–213, Oct. 1997, doi: 10.1111/j.1600-0625.1997.tb00164.x.
- [45] T. Krieg, R. Hein, A. Hatamochi, and M. Aumailley, "Molecular and clinical aspects of connective tissue," *Eur J Clin Invest*, vol. 18, no. 2, pp. 105–123, 1988, doi: 10.1111/j.1365-2362.1988.tb02400.x.
- [46] U. Eckhard, E. Schönauer, and H. Brandstetter, "Structural Basis for Activity Regulation and Substrate Preference of Clostridial Collagenases G, H, and T," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, May 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.448548.
- [47] Y.-J. Kim, H. Uyama, and S. Kobayashi, "Inhibition effects of (+)-catechin–aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 320, no. 1, pp. 256–261, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.163.
- [48] N. Azmi, P. Hashim, D. M. Hashim, N. Halimoon, and N. M. N. Majid, "Anti–elastase, anti–tyrosinase and matrix metalloproteinase–1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti–aging agent," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 4, pp. S348–S352, May 2014, doi: 10.12980/APJTB.4.2014C1166.
- [49] C. Chantrain and Y. A. DeClerck, "Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale," *Med Sci (Paris)*, vol. 18, no. 5, pp. 565–575, May 2002, doi: 10.1051/medsci/2002185565.

- [50] D. Leung, G. Abbenante, and D. P. Fairlie, "Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects," *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 3, pp. 305–341, Feb. 2000, doi: 10.1021/jm990412m.
- [51] R. Beckett, A. Davidson, A. Drummond, P. Huxley, and M. Whittaker, "Recent advances in matrix metalloproteinase inhibitor research," *Drug Discov. Today*, vol. 1, no. 1, pp. 16–26, Jan. 1996, doi: 10.1016/1359-6446(96)89115-X.
- [52] J.-Y. Bae *et al.*, "(–)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: Involvement of mitogen-activated protein kinase," *Food. Chem. Toxicol.*, vol. 46, no. 4, pp. 1298–1307, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.fct.2007.09.112.
- [53] H. J. Moon *et al.*, "Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human skin fibroblasts," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 31, no. 2, pp. 284–289, Feb. 2008, doi: 10.1248/bpb.31.284.
- [54] K. Eun Lee, S. Bharadwaj, U. Yadava, and S. Gu Kang, "Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using in silico and in vitro approach," *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 34, no. 1, pp. 927–936, Apr. 2019, doi: 10.1080/14756366.2019.1596904.
- [55] A. Sparavigna, "Chapter 2 - Aging and the Recovery of Skin Function and Appearance," in *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*, R. R. Watson, Ed. Academic Press, 2017, pp. 11–16.
- [56] M. Démarchez, "Le stress oxydant cutané," Jun. 16, 2012. <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article64> (accessed Oct. 28, 2019).
- [57] A. Kammeyer and R. M. Luiten, "Oxidation events and skin aging," *Ageing Res. Rev.*, vol. 21, pp. 16–29, May 2015, doi: 10.1016/j.arr.2015.01.001.
- [58] "Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? - L'Actualité Chimique." <https://www.lactualitechimique.org/Especies-reactives-de-l-oxygene-comment-l-oxygene-peut-il-devenir-toxique> (accessed Oct. 28, 2019).
- [59] L. K. Folkes, L. P. Candeias, and P. Wardman, "Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 323, no. 1, pp. 120–126, Oct. 1995, doi: 10.1006/abbi.1995.0017.
- [60] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci, "Oxidative Stress and Antioxidant Defense," *World Allergy Organ J*, vol. 5, no. 1, pp. 9–19, Jan. 2012, doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- [61] J.-M. Lü, P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen, "Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems," *J Cell Mol Med*, vol. 14, no. 4, pp. 840–860, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
- [62] S. B. Lotito and B. Frei, "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 41, no. 12, pp. 1727–1746, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033.
- [63] J. J. Thiele and S. Ekanayake-Mudiyanselage, "Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology," *Mol. Aspects Med.*, vol. 28, no. 5–6, pp. 646–667, Dec. 2007, doi: 10.1016/j.mam.2007.06.001.
- [64] K. K. Dong, N. Damaghi, J. Kibitel, M. T. Canning, K. A. Smiles, and D. B. Yarosh, "A comparison of the relative antioxidant potency of L-ergothioneine and idebenone," *J Cosmet Dermatol*, vol. 6, no. 3, pp. 183–188, Sep. 2007, doi: 10.1111/j.1473-2165.2007.00330.x.
- [65] D. H. McDaniel, B. A. Neudecker, J. C. DiNardo, J. A. Lewis, and H. I. Maibach, "Idebenone: a new antioxidant - Part I. Relative assessment of oxidative stress protection capacity compared to commonly known antioxidants," *J Cosmet Dermatol*, vol. 4, no. 1, pp. 10–17, Jan. 2005, doi: 10.1111/j.1473-2165.2005.00152.x.
- [66] D. H. McDaniel, B. A. Neudecker, J. C. DiNardo, J. A. Lewis, and H. I. Maibach, "Clinical efficacy assessment in photodamaged skin of 0.5% and 1.0% idebenone," *J Cosmet Dermatol*, vol. 4, no. 3, pp. 167–173, Sep. 2005, doi: 10.1111/j.1473-2165.2005.00305.x.
- [67] M. A. Hossain and K. Asada, "Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme," *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 24, pp. 12920–12926, Oct. 1985.
- [68] M. Farag, M. Salih Mohammed, I. Foud, W. Ahmed, and M. Mohamed, "The role of natural products in drug discovery and development," *World J. Pharm. Res.*, vol. 4, Feb. 2015.
- [69] H. Lehmann, "Le médicament à base de plantes en Europe: statut, enregistrement, contrôles," thesis, Université de Strasbourg, 2013.
- [70] T. Aburjai and F. Natsheh, *Plants Used in Cosmetics*, vol. 17. 2003.
- [71] A. Pichard, A. Harari, and J.-C. Bernier, "La chimie des plantes, avenir de la cosmétique | Mediachimie." Mediachimie, 2017, Accessed: Jan. 22, 2020. [Online]. Available: <http://www.mediachimie.org/ressource/la-chimie-des-plantes-avenir-de-la-cosm%C3%A9tique>.
- [72] A. Brieva *et al.*, "Molecular Basis for the Regenerative Properties of a Secretion of the Mollusk *Cryptomphalus aspersa*," *Skin Pharmacol Physiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 15–22, 2008, doi: 10.1159/000109084.

- [73] S. J. Pitt, M. A. Graham, C. G. Dedi, P. M. Taylor-Harris, and A. Gunn, "Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa*," *Br J Biomed Sci*, vol. 72, no. 4, pp. 174–181, Jan. 2015, doi: 10.1080/09674845.2015.11665749.
- [74] L. Cornara, M. Biagi, J. Xiao, and B. Burlando, "Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products," *Front Pharmacol*, vol. 8, p. 412, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00412.
- [75] N. Al-Waili, K. Salom, and A. A. Al-Ghamdi, "Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice," *ScientificWorldJournal*, vol. 11, pp. 766–787, Apr. 2011, doi: 10.1100/tsw.2011.78.
- [76] S. Dunaway, R. Odin, L. Zhou, L. Ji, Y. Zhang, and A. L. Kadekaro, "Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation," *Front Pharmacol*, vol. 9, p. 392, Apr. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00392.
- [77] G. A. Burdock, "Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 36, no. 4, pp. 347–363, Apr. 1998.
- [78] J. M. Sforcin, A. Fernandes, C. A. M. Lopes, V. Bankova, and S. R. C. Funari, "Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 73, no. 1, pp. 243–249, Nov. 2000, doi: 10.1016/S0378-8741(00)00320-2.
- [79] H. M. Park, E. Hwang, K. G. Lee, S.-M. Han, Y. Cho, and S. Y. Kim, "Royal jelly protects against ultraviolet B-induced photoaging in human skin fibroblasts via enhancing collagen production," *J Med Food*, vol. 14, no. 9, pp. 899–906, Sep. 2011, doi: 10.1089/jmf.2010.1363.
- [80] H. Duplan *et al.*, "Effects of Hydroxydecine[®] (10-hydroxy-2-decenoic acid) on skin barrier structure and function *in vitro* and clinical efficacy in the treatment of UV-induced xerosis," *Eur. J. Dermatol.*, vol. 21, no. 6, pp. 906–915, Jan. 2012, doi: 10.1684/ejd.2011.1531.
- [81] O. Garraud, W. N. Hozzein, and G. Badr, "Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches?," *BMC Immunology*, vol. 18, no. 1, p. 23, Jun. 2017, doi: 10.1186/s12865-017-0207-y.
- [82] M. P. Lupo and A. L. Cole, "Cosmeceutical peptides," *Dermatol Ther*, vol. 20, no. 5, pp. 343–349, Oct. 2007, doi: 10.1111/j.1529-8019.2007.00148.x.
- [83] T. N. Lima and C. A. Pedriali Moraes, "Bioactive Peptides: Applications and Relevance for Cosmeceuticals," *Cosmetics*, vol. 5, no. 1, p. 21, Mar. 2018, doi: 10.3390/cosmetics5010021.
- [84] V. V. Pai, P. Bhandari, and P. Shukla, "Topical peptides as cosmeceuticals," *Indian J Dermatol Venereol Leprol.*, vol. 83, no. 1, p. 9, Jan. 2017, doi: 10.4103/0378-6323.186500.
- [85] M. Schurink, W. J. H. van Berkel, H. J. Wichers, and C. G. Boeriu, "Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity," *Peptides*, vol. 28, no. 3, pp. 485–495, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.peptides.2006.11.023.
- [86] K. Katayama, J. Armendariz-Borunda, R. Raghov, A. H. Kang, and J. M. Seyer, "A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 14, pp. 9941–9944, May 1993.
- [87] A. Siméon, H. Emonard, W. Hornebeck, and F. X. Maquart, "The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures," *Life Sci.*, vol. 67, no. 18, pp. 2257–2265, Sep. 2000.
- [88] J. J. McArdle, T. L. Lentz, V. Witzemann, H. Schwarz, S. A. Weinstein, and J. J. Schmidt, "Waglerin-1 selectively blocks the epsilon form of the muscle nicotinic acetylcholine receptor," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 289, no. 1, pp. 543–550, Apr. 1999.
- [89] C. Blanes-Mira *et al.*, "A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity," *Int J Cosmet Sci*, vol. 24, no. 5, pp. 303–310, Oct. 2002, doi: 10.1046/j.1467-2494.2002.00153.x.
- [90] G. S. Sim *et al.*, "Black rice (*Oryza sativa* L. var. japonica) hydrolyzed peptides induce expression of hyaluronan synthase 2 gene in HaCaT keratinocytes," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 17, no. 2, pp. 271–279, Feb. 2007.
- [91] A. Ochiai, S. Tanaka, T. Tanaka, and M. Taniguchi, "Rice Bran Protein as a Potent Source of Antimelanogenic Peptides with Tyrosinase Inhibitory Activity," *J. Nat. Prod.*, vol. 79, no. 10, pp. 2545–2551, Oct. 2016, doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00449.
- [92] H. Nie *et al.*, "A Novel Heptapeptide with Tyrosinase Inhibitory Activity Identified from a Phage Display Library," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 181, no. 1, pp. 219–232, Jan. 2017, doi: 10.1007/s12010-016-2208-3.
- [93] N. A. Ratcliffe, C. B. Mello, E. S. Garcia, T. M. Butt, and P. Azambuja, "Insect natural products and processes: New treatments for human disease," *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 41, no. 10, pp. 747–769, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.ibmb.2011.05.007.
- [94] V. Oldrati *et al.*, "Peptidomic and transcriptomic profiling of four distinct spider venoms," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 3, p. e0172966, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0172966.
- [95] P. K. Goswami, M. Samant, and R. S. Srivastava, "Snake venom, anti-snake venom & potential of snake venom," vol. 6, no. 5, p. 5.
- [96] R. M. Kini, "Proline brackets and identification of potential functional sites in proteins: toxins to therapeutics," *Toxicon*, vol. 36, no. 11, pp. 1659–1670, Nov. 1998.
- [97] D. Jain and S. Kumar, "Snake Venom: A Potent Anticancer Agent," *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.*, vol. 13, no. 10, pp. 4855–4860, Oct. 2012, doi: 10.7314/APJCP.2012.13.10.4855.

- [98] D. Mans, S. Sairras, D. Ganga, and J. Kartopawiro, "Exploring the global animal biodiversity in the search for new drugs - insects," *J Transl Sci*, vol. 3, pp. 371–386, Dec. 2016, doi: 10.15761/JTS.1000164.
- [99] N. F. Johnson and D. J. Borror, *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects*. Thompson Brooks/Cole, 2005.
- [100] P. J. Gullan and P. S. Cranston, *The Insects: An Outline of Entomology*, 5 edition. Wiley-Blackwell, 2014.
- [101] V. H. Resh and R. T. Cardé, *Encyclopedia of Insects*. Elsevier, 2003.
- [102] "Classification des insectes | Au Bon Miel." <https://www.aubonmiel.com/classification-des-insectes/> (accessed Oct. 29, 2019).
- [103] T. Piek, *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Elsevier, 2013.
- [104] D. R. Hoffman, "Hymenoptera venom allergens," *Clinic Rev Allerg Immunol*, vol. 30, no. 2, pp. 109–128, Apr. 2006, doi: 10.1385/CRIAI:30:2:109.
- [105] R. Krell, *Value-added products from beekeeping*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996.
- [106] J. N. Sharma, "Basic and Clinical Aspects of Bradykinin Receptor Antagonists," in *Recent Developments in the Regulation of Kinins*, J. N. Sharma, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2014, pp. 1–14.
- [107] E. Spillner, S. Blank, and T. Jakob, "Hymenoptera Allergens: From Venom to 'Venome,'" *Front. Immunol.*, vol. 5, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00077.
- [108] M. S. Palma, "Chapter 58 - Hymenoptera Insect Peptides," in *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*, A. J. Kastin, Ed. Boston: Academic Press, 2013, pp. 416–422.
- [109] E. Habermann, "Bee and wasp venoms," *Science*, vol. 177, no. 4046, pp. 314–322, Jul. 1972, doi: 10.1126/science.177.4046.314.
- [110] T. Nakajima, "Pharmacological Biochemistry of Vespid Venoms," in *Venoms of the Hymenoptera*, Elsevier, 1986, pp. 309–327.
- [111] M. Moreno and E. Giralt, "Three Valuable Peptides from Bee and Wasp Venoms for Therapeutic and Biotechnological Use: Melittin, Apamin and Mastoparan," *Toxins*, vol. 7, no. 4, pp. 1126–1150, Apr. 2015, doi: 10.3390/toxins7041126.
- [112] F. Sobral *et al.*, "Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 94, no. Supplement C, pp. 172–177, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.fct.2016.06.008.
- [113] S. Somwongin, P. Chantawannakul, and W. Chaiyana, "Antioxidant activity and irritation property of venoms from Apis species," *Toxicon*, vol. 145, pp. 32–39, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.toxicon.2018.02.049.
- [114] S. Han, K. Lee, J. Yeo, W. Kim, and K. Park, "Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (*Apis mellifera*. L) venom," *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, vol. 64, no. 3, pp. e67–e72, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.bjps.2010.08.022.
- [115] S. M. Han, K. K. Park, Y. M. Nicholls, N. Macfarlane, and G. Duncan, "Effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom on keratinocyte migration in vitro," *Pharmacogn Mag*, vol. 9, no. 35, pp. 220–226, 2013, doi: 10.4103/0973-1296.113271.
- [116] H. Lee *et al.*, "Anti-wrinkle Effect of PLA2-free Bee Venom against UVB-irradiated Human Skin Cells," *J. Agric. Life Sci.*, vol. 49, pp. 125–135, Feb. 2015, doi: 10.14397/jals.2015.49.1.125.
- [117] S. M. Han *et al.*, "Antibacterial Activity and Antibiotic-Enhancing Effects of Honeybee Venom against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*," *Molecules*, vol. 21, no. 1, p. 79, Jan. 2016, doi: 10.3390/molecules21010079.
- [118] N. S Surendra, G. N Jayaram, and M. S Reddy, "Antimicrobial activity of crude venom extracts in honeybees (*Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*) tested against selected pathogens," *Afr. J. Microbiol. Res.*, vol. 5, no. 18, pp. 2765–2772, Sep. 2011, doi: 10.5897/AJMR11.593.
- [119] J. H. CHOI *et al.*, "Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Mol Med Rep*, vol. 12, no. 5, pp. 6483–6490, Nov. 2015, doi: 10.3892/mmr.2015.4275.
- [120] H.-J. An *et al.*, "Inhibitory effects of bee venom on *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory skin disease in an animal model," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 34, no. 5, pp. 1341–1348, Nov. 2014, doi: 10.3892/ijmm.2014.1933.
- [121] S. M. Han, K. G. Lee, and S. C. Pak, "Effects of cosmetics containing purified honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on *acne vulgaris*," *J Integr Med*, vol. 11, no. 5, pp. 320–326, Sep. 2013, doi: 10.3736/jintegrmed2013043.
- [122] S. Mi Han, J. Min Kim, and S. Cheon Pak, "Anti-melanogenic properties of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom in α -MSH-stimulated B16F1 cells," *Food Agric Immunol*, vol. 26, pp. 451–462, Jul. 2014, doi: 10.1080/09540105.2014.950202.
- [123] S. M. Han *et al.*, "The beneficial effects of honeybee-venom serum on facial wrinkles in humans," *Clin Interv Aging*, p. 1587, Oct. 2015, doi: 10.2147/CIA.S84940.
- [124] D. Dayan, L. Barr-Nea, M. Sandbank, I. Binderman, G. L. Mechanic, and J. S. Ishay, "Oriental hornet venom enhances wound healing and repair in rat skin, possibly through its collagenolytic activity," *Acta Trop.*, vol. 40, no. 2, pp. 147–153, Jun. 1983.

- [125] M. J. Yang, W.-Y. Lin, K.-H. Lu, and W.-C. Tu, "Evaluating antioxidative activities of amino acid substitutions on mastoparan-B," *Peptides*, vol. 32, no. 10, pp. 2037–2043, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.peptides.2011.08.026.
- [126] A. Stuckelberger, *Anti-ageing Medicine: Myths and Chances*. vdf Hochschulverlag AG, 2008.
- [127] A. N. Balaev, K. A. Okhmanovich, and V. N. Osipov, "A shortened, protecting group free, synthesis of the anti-wrinkle venom analogue Syn-Ake (R) exploiting an optimized Hofmann-type rearrangement," *Tetrahedron Letters*, vol. 55, pp. 5745–5747, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.tetlet.2014.08.117.
- [128] P. Favreau *et al.*, "A novel μ -conopeptide, CnIIIC, exerts potent and preferential inhibition of NaV1.2/1.4 channels and blocks neuronal nicotinic acetylcholine receptors," *Br J Pharmacol*, vol. 166, no. 5, pp. 1654–1668, 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01837.x.
- [129] M. W. Pennington, A. Czerwinski, and R. S. Norton, "Peptide therapeutics from venom: Current status and potential," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 26, no. 10, pp. 2738–2758, 01 2018, doi: 10.1016/j.bmc.2017.09.029.
- [130] M. Verdoni *et al.*, "ArgTX-636, a polyamine isolated from spider venom: A novel class of melanogenesis inhibitors," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 24, no. 22, pp. 5685–5692, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.bmc.2016.08.023.
- [131] F. Wandrey, D. Schmid, and F. Züllli, "Peptide Inspired by Sea Anemone Venom Comforts Sensitive Skin," *SOFW Journal*, vol. 144, pp. 20–23, 2018.
- [132] A. Rortais *et al.*, "A New Enemy of Honeybees in Europe: the Asian Hornet *Vespa velutina*," in *Atlas of Biodiversity Risk*, Pensoft Publishers, 2010.
- [133] Q. Rome, C. Sourdeau, F. Muller, and C. Villemant, "Le piégeage du frelon asiatique *Vespa velutina nigrithorax*. Intérêts et dangers," presented at the Journée Nationales GTV, 2013, p. 6.
- [134] C. Villemant, H. Jp, and S. Jc, "Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae)," *Bull. Soc. Entomol. Fr.*, no. 111 (4), pp. 447–450, 2006.
- [135] Z. Liu *et al.*, "Deciphering the venom transcriptome of killer-wasp *Vespa velutina*," *Sci Rep*, vol. 5, p. 9454, Apr. 2015, doi: 10.1038/srep09454.
- [136] "*Vespa velutina*," *Wikipédia*. May 10, 2019, Accessed: May 22, 2019. [Online]. Available: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Vespa_velutina&oldid=159164869.
- [137] "Frelon Asiatique » Biologie." <http://frelonasiatique.mnhn.fr/biologie>, <http://frelonasiatique.mnhn.fr/biologie/> (accessed May 19, 2019).
- [138] K. Monceau, O. Bonnard, and D. Thiéry, "*Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe," *J Pest Sci*, vol. 87, no. 1, pp. 1–16, Mar. 2014, doi: 10.1007/s10340-013-0537-3.
- [139] C. Villemant, F. Muller, S. Haubois, A. Perrard, and E. Darrouzet, "Bilan des travaux (MNHN et IRBI) sur l'invasion en France de *Vespa velutina*, le frelon asiatique prédateur d'abeilles," presented at the Journée Scientifique Apicole, 2011, pp. 3–12.
- [140] K. Monceau, N. Maher, O. Bonnard, and D. Thiéry, "Predation pressure dynamics study of the recently introduced honeybee killer *Vespa velutina*: learning from the enemy," *Apidologie*, vol. 44, no. 2, pp. 209–221, Mar. 2013, doi: 10.1007/s13592-012-0172-7.
- [141] K. Monceau *et al.*, "Native Prey and Invasive Predator Patterns of Foraging Activity: The Case of the Yellow-Legged Hornet Predation at European Honeybee Hives," *PLOS ONE*, vol. 8, no. 6, p. e66492, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066492.
- [142] W.-J. Shi, S.-F. Zhang, C.-X. Zhang, and J.-A. Cheng, "Cloning and comparative analysis of the venom prepromelittin genes from four wasp species," *Yi Chuan Xue Bao*, vol. 30, no. 6, pp. 555–559, Jun. 2003.
- [143] Z. Su-fang, S. H. I. Wan-jun, C. Jia-an, and Z. Chuan-xi, "Cloning and Comparison of the Genes Encoding Preproapamin from the Venom of 2 Honeybee and 4 Wasp Species," *Insect Sci*, vol. 10, no. 1, pp. 21–26, Mar. 2003, doi: 10.1111/j.1744-7917.2003.tb00360.x.
- [144] S.-F. Zhang, W.-J. Shi, J.-A. Cheng, and C.-X. Zhang, "Cloning and characterization analysis of the genes encoding precursor of mast cell degranulating peptide from 2 honeybee and 3 wasp species," *Yi Chuan Xue Bao*, vol. 30, no. 9, pp. 861–866, Sep. 2003.
- [145] C.-H. Lin, J. T. C. Tzen, C.-L. Shyu, M. J. Yang, and W.-C. Tu, "Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan," *Peptides*, vol. 32, no. 10, pp. 2027–2036, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.peptides.2011.08.015.
- [146] A. I. Tabar *et al.*, "*Vespa Velutina Nigrithorax*: a new causative agent for anaphylaxis," *Clin Transl Allergy*, vol. 5, no. Suppl 3, p. P43, Mar. 2015, doi: 10.1186/2045-7022-5-S3-P43.
- [147] Y. Cheng, P. Wen, S. Dong, K. Tan, and J. C. Nieh, "Poison and alarm: the Asian hornet *Vespa velutina* uses sting venom volatiles as an alarm pheromone," *J Exp Biol.*, vol. 220, no. 4, pp. 645–651, Feb. 2017, doi: 10.1242/jeb.148783.

**Chapitre II: Recherche des molécules
bioactives issues du venin frelon
asiatique : Stratégies et
méthodologies**

Table des matières

Chapitre II: Recherche des molécules bioactives issues du venin frelon asiatique : Stratégies et méthodologies	69
Table des matières	70
Introduction.....	71
1 Présentation schématique des deux stratégies développées dans le cadre de notre étude.....	72
2 La méthodologie d'échantillonnage et protocole	73
2.1 La collecte du venin brut: description des différentes méthodologies	73
2.2 Les Techniques de séparation et quantification des protéines de venin.....	77
2.2.1 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel SDS-PAGE	77
2.2.2 Détermination de quantité de protéine par la méthode de Bradford	78
2.2.3 Séparation de la fraction protéique et peptidique du venin brut	78
2.3 Protocole mis en place pour la collecte du venin de frelon asiatique à partir de frelons congelés	81
2.3.1 Méthode d'échantillonnage	81
2.3.2 Séparation des parties protéique et peptidique-petites molécules.....	84
3 Stratégie ciblant l'activité du venin brut ou fractionné.....	86
3.1 Criblage basé sur des allégations cosmétiques.....	86
3.2 Techniques de fractionnement du venin	87
3.2.1 La chromatographie sur couche mince (TLC)	87
3.2.2 La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	94
3.2.3 La Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	97
3.3 Apport de la spectrométrie de masse dans l'identification et caractérisation de venin	102
3.3.1 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry	102
3.3.2 L'ionisation par électrospray (ESI)	110
4 Stratégie ciblant l'étude de « sourcing » (discrimination des fractions peptidiques < 10 kDa), leurs interactions Ligand/enzymes et leurs identifications.....	117
4.1 Criblage de molécules dicriminantes : Procédure de processing des données et analyse statistique (PCA, PLS-DA)	118
4.2 Criblage d'interactions ligands/enzymes par spectrométrie de masse ESI-QTOF-HRMS	121
4.3 Stratégies de caractérisation des structures primaires des peptides par spectrométrie de masse	125
Conclusion	129
Référence	130

Introduction

Bien que les venins soient connus pour être une source riche en molécules bioactives comme les protéines, des peptides et de petites molécules, l'évaluation du potentiel thérapeutique ou cosmétique du venin de frelon asiatique reste peu étudié. C'est dans ce contexte que nous avons, dans ce projet de thèse, mis en place des stratégies et méthodologies permettant d'évaluer i) le potentiel cosmétique de cette nouvelle source (venin de frelon asiatique) pour de nouveaux ingrédients naturels en dermacosmétique ainsi que ii) de contribuer à une meilleure connaissance du patrimoine moléculaire (< 10 kDa) selon le « sourcing ».

Ainsi, nous avons choisi dans ce chapitre II de présenter sous forme « matériels et méthodes » une brève présentation des principes des techniques sélectionnées lors de nos deux stratégies et les protocoles appliqués. Ce chapitre sera donc organisé suivant trois sections présentant :

- i) La méthodologie d'échantillonnage du venin de frelon asiatique.
- ii) La stratégie ciblant l'activité du venin brut ou fractionné sur les cibles d'intérêts cosmétiques.
- iii) La stratégie ciblant l'étude de « sourcing » (discrimination des fractions peptidiques < 10 kDa), leurs interactions Ligand/enzymes et leurs identifications.

1 Présentation schématique des deux stratégies développées dans le cadre de notre étude

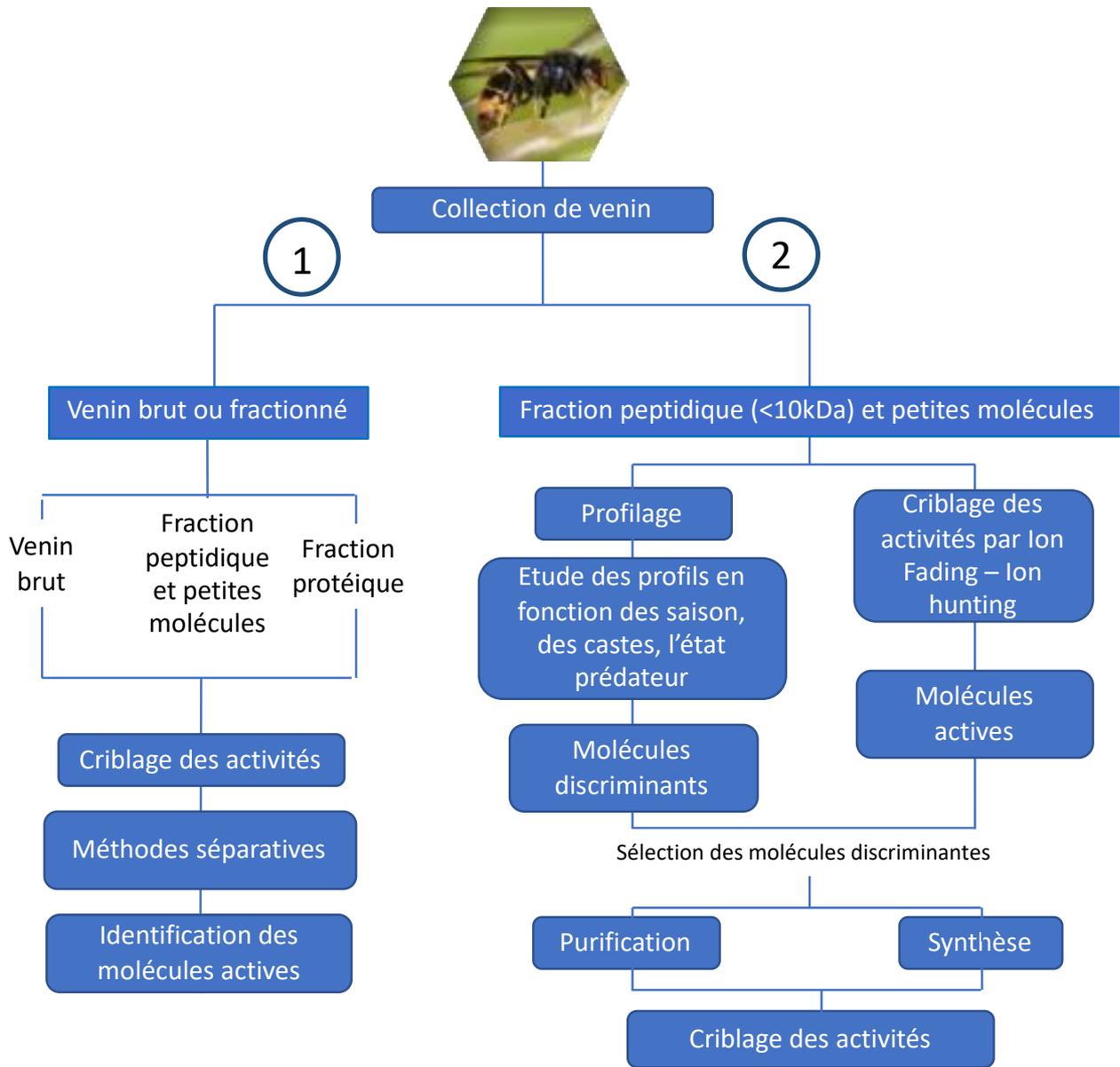


Figure II.1 : Présentation de deux stratégies (① et ②) sur la recherche de molécules actives issue du venin de frelon brut ou fractionné

➤ ① : Stratégie ciblant l'activité du venin brut ou fractionné

En premier lieu, cette stratégie a été mise en place pour explorer l'intérêt potentiel du venin brut ou de fractions grossières dans le domaine de la cosmétique. Les différents lots de venin brut ainsi que les fractions qui s'y réfèrent ont fait l'objet d'un criblage d'activité à la fois chimique et

biologique concernant certaines allégations telles que l'effet anti-tyrosinase, anti-élastase et anti-collagénase ou antioxydant. A l'issue d'une réponse positive (sur l'activité), une démarche analytique utilisant les techniques séparatives chromatographie en couche mince (TLC), chromatographie liquide haute performance (HPLC) et chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à une détection par UV-visible et/ou par spectrométrie de masse, devra permettre d'identifier les molécules responsables de cette activité. Cette stratégie a été appliquée dans le chapitre III.

- ② : Stratégie ciblant l'étude de « sourcing » (discrimination des fractions peptidiques < 10 kDa), leurs interactions Ligand/enzymes et leurs identifications.

Une seconde stratégie a été proposée faisant appel à la fois à des études analytiques et statistiques sur différents lots d'insectes en termes de castes et de période de collecte permettant de mettre en avant ou non la présence de molécules discriminantes. Suite à ces études, les molécules discriminantes pourront alors être isolées afin d'être identifiées et d'investiguer leur potentiel en tant que bioactifs dans le domaine des cosmétiques. Pour ce faire, une méthodologie de criblage des activités basée sur la capacité des molécules à interagir avec des enzymes d'intérêt cosmétique a été ici mise en place en spectrométrie de masse : il s'agit de la technique Ion Hunting et Ion Fading. Cette stratégie a été appliquée dans le chapitre IV.

*Avant de débuter nos études consacrées à la valorisation du venin de frelon asiatique (① et ②) dans le domaine cosmétique, il a été nécessaire de mettre en place une méthodologie d'échantillonnage du venin (qualitative et quantitative). Les résultats de cette étude seront présentés **dans ce chapitre**.*

2 La méthodologie d'échantillonnage et protocole

2.1 La collecte du venin brut: description des différentes méthodologies

La collecte de venin, en particulier des animaux dangereux ou petits, est une tâche difficile. Pour ce qui concerne les serpents, le venin s'obtient par pression manuelle ou massage de la glande à venin ou a provoqué une morsure à travers un film plastique apposé sur un récipient collecteur ou bien encore par stimulation électrique des glandes salivaires du serpent.

Pour la collecte du venin d'araignée, la stimulation peut être là encore utilisée sur des araignées anesthésiées pour provoquer des contractions et la libération de venin musculaires. Les gouttelettes

de venin ainsi collectées par des microcapillaires sont alors transférées dans des tubes pour le stockage au congélateur à -80°C. Pour ce qui est la collecte du venin auprès des Hyménoptères, celle-ci peut s'effectuer soit sur insectes vivants ou bien morts. Par exemple, le venin d'abeilles vivantes peut être collecté à l'aide d'un système collecteur composé d'une plaque de verre collectrice surmontée d'une série de fils métalliques qui conduisent l'électricité. Ce dispositif est placé horizontalement devant l'entrée d'une ruche. Cela provoque des piqûres réflexes des abeilles par électrostimulation et l'insecte vide son sac à venin en touchant les fils. Les phéromones d'attaque diffusées par les premiers individus alertent très vite la colonie qui réagit à son tour en attaquant le collecteur. Le venin des abeilles stimulées par l'appareil séchera assez rapidement et on obtiendra finalement une poudre blanchâtre fixée sur la vitre. Il ne faut surtout pas mettre le venin à l'exposition au soleil pour éviter d'altérer la substance. Aussi, il existe, pour collecter le venin à partir des insectes de l'ordre des Hyménoptères, plusieurs méthodes d'échantillonnage dont les principales sont décrites dans le **Tableau II.1** ci-dessous.

Dans le cadre de notre travail de thèse, les frelons ont été fournis par l'Institut de Recherche Biologique des Insectes (IRBI) de l'université de Tours. Notre protocole d'extraction de venin s'inspire des travaux de l'équipe de Dias et al., 2014, Peiren et al., 2005 et de Sookrung et al. 2014 [1]–[3]. Le dard est ainsi doucement tiré de l'extrémité de l'abdomen de l'animal à l'aide d'une pince. Le sac à venin (d'environ 1 mm de long, blanc et transparent) est recueilli et séparé du dard, puis lavé à l'eau pour éliminer les contaminants pouvant provenir des tissus environnants tels que le tractus intestinal. Chaque sac à venin est alors pressé contre la paroi du tube Eppendorf pour recueillir le venin qui s'écoule à l'intérieur du tube. 100 µL d'eau ultra-pure sont ensuite ajoutées afin d'homogénéiser le tout par vortex pendant 10 min, suivies d'une étape de centrifugation à 10 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est ensuite recueilli et filtré à l'aide d'une seringue filtrante 0.22 µm (Merck) et conservé à -20°C. Cette solution de venin est nommée Vv (*Venom Vespa velutina*) dans notre étude.

Tableau II.1 Méthodes de collecte de venin à partir des insectes de l'ordre des Hyménoptères

	Méthode	Avantages	Inconvénients	Exemples
Animaux vivants	Stimulation de la sécrétion du venin par stimulation électrique	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode non invasive • Molécules distinctes sécrétées pendant la stimulation • Venin pur • Collecte en plusieurs fois 	<ul style="list-style-type: none"> • Besoin d'équipements spécifiques (électrodes) • Mise en place de protections et moyens de sécurité pour les manipulateurs • Mise en place longue et complexe du protocole 	<i>A. mellifera</i> [4] <i>Vespa velutina</i> [5] <i>Vespa magnifica</i> [6]
	Stimulation mécanique (douce pression sur la tête de l'insecte ou piqure forcée sur un bloc d'agar).	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode non invasive • Venin pur • Venin obtenu est le plus proche possible de la réalité (absence de stress venant du protocole de collecte) [7] • Collecte en plusieurs fois 		<i>Melittobia digitata</i> [8] <i>Vespa tropica</i> [9] <i>Deltaconoideum Gmelin</i> [7]
Dissection des animaux	Extraction du sac à venin et récupération en solution organique tamponnée	<ul style="list-style-type: none"> • Procédure rapide et simple • Protocole ne nécessitant pas de système de protection particulier pour les manipulateurs • Récupération du venin dans sa totalité 	<ul style="list-style-type: none"> • Contamination possible venant des tissus alentours glande[10] • Nécessite de travailler sur des insectes morts (insectes sacrifiés) 	<i>Polybia paulista</i> [11] <i>Vespa velutina</i> [5] <i>Vespa orientalis</i> [12], [13] <i>Vespa affinis</i> [3]
	Récupération du venin par compression/perça ge du sac à venin	<ul style="list-style-type: none"> • Protocole ne nécessitant pas de système de protection particulier pour les manipulateurs • Récupération du venin dans sa totalité • Moins de contaminations par la membrane du sac à venin 		<ul style="list-style-type: none"> • Protocole délicat à mettre en œuvre • Perte d'une partie du venin qui peut rester dans le sac • Nécessite de travailler sur des insectes morts (insectes sacrifiés)

Afin de pouvoir conserver au mieux cette quantité de venin et en prenant en compte les avantages et inconvénients de différentes conditions de stockage (**Tableau II.2**), nous avons décidé **de lyophiliser tous les échantillons** d'étude et de **les maintenir à -20°C**. Cela nous permet de garantir au mieux l'intégrité du contenu moléculaire et de pouvoir étudier ces échantillons sur une période de temps étendu.

Tableau II.2 : Avantages et inconvénients des Conditions de conservation des échantillons contenant des protéines et peptides [16]

Conditions	Solution, 4°C	Solution (25-50% de glycérol à -20°C	Congelé à 20°C, -80°C, ou azote liquide	Lyophilisé à 4°C ou à -20°C
Temps maximal de stockage	1 jour –à 2 semaines	1 an	Quelques années	Quelques années
Cycle de l'utilisation	Plusieurs fois	Plusieurs fois	Une fois	Une fois
Ajout d'agent antibiotique	Oui	Non	Non	Non
Ajout d'inhibiteur de protéase	Oui	Non	Recommandé	Non
Avantages	<input type="checkbox"/> Pratique pour des analyses sur une courte période	<input type="checkbox"/> Étude possible sur longue période	<input type="checkbox"/> Manipulations simples et rapides <input type="checkbox"/> Idéal pour des études sur long terme	<input type="checkbox"/> Transport facilité des échantillons <input type="checkbox"/> Idéal pour des études sur long terme <input type="checkbox"/> Estimation du poids sec de l'échantillon
Inconvénients	<input type="checkbox"/> Instabilité <input type="checkbox"/> Influence potentielle des agents ajoutés sur l'activité recherchée	<input type="checkbox"/> Présence de glycérol dans l'échantillon (augmentation de la viscosité, impuretés)	<input type="checkbox"/> Utilisation unique de l'aliquote (cycle décongélation-congélation à proscrire)	<input type="checkbox"/> Procédure longue et complexe de remise en solution de l'échantillon

2.2 Les Techniques de séparation et quantification des protéines de venin

2.2.1 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel SDS-PAGE

Parmi les techniques de séparation de protéines, l'électrophorèse SDS-PAGE a été sélectionnée dans le cadre de cette thèse afin d'obtenir **une information qualitative**. En effet, l'électrophorèse SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) repose sur la séparation des protéines chargées en présence du sodium dodécyl-sulfate dans un champ électrique. Les protéines migrent à travers le gel d'acrylamide dont la taille des pores peut être ajustée. Avant d'être étudié par électrophorèse SDS-PAGE, l'échantillon doit faire l'objet d'un prétraitement dénaturant par l'action de deux réactifs : **i)** le 2-mercaptoéthanol qui dénature les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle ; **ii)** le SDS (sodium dodécyl sulfate) capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative ce qui va permettre leur migration à travers le gel de polyacrylamide vers l'anode. Tandis que la charge va permettre d'accélérer les protéines dans le champ électrique, la variation de la réticulation du gel de polyacrylamide permet de séparer par tamisage moléculaire les protéines et de ralentir cette migration. La vitesse de migration des protéines dans le gel est inversement proportionnelle à leurs masses [17].

Dans nos études, pour analyser le profil protéique des venins, les différents pourcentages de gel (10%-13%-15%) ont été utilisés. (le protocole de SDS-PAGE se trouve dans **l'annexe 1, tableau A.1**)

À la suite de la migration des protéines, la révélation des protéines au sein du gel SDS-PAGE est réalisée par coloration. Cette coloration permet la détection des protéines sous forme de taches (spots).

Deux types de colorants peuvent alors être utilisés : (i) les colorants non spécifiques, i.e n'ayant aucune affinité pour des fonctions particulières de la protéine. L'ensemble des protéines présentes sur le gel est détecté ; (ii) les colorants spécifiques à certaines modifications post traductionnelles des protéines comme la phosphorylation de sérine, thréonine ou tyrosine ou à des fonctionnalisations particulières. Parmi le panel de colorants disponibles, **le bleu de Coomassie** autorise de faibles seuils de détection, son homogénéité (linéarité) de coloration permet d'obtenir une information quantitative de l'ensemble des protéines visibles sur le gel **ce qui en fait ainsi un colorant de choix dans le cadre de notre projet de recherche**.

2.2.2 Détermination de quantité de protéine par la méthode de Bradford

Parallèlement, le taux de protéines présent dans notre venin de frelon a été mesuré par **l'approche usuelle de Bradford**. L'essai de Bradford est un test de dosage des protéines connu pour sa rapidité, simplicité, économie et sensibilité. Étant développé par M. Bradford en 1976 [18], la méthode de Bradford est le test colorimétrique privilégié pour quantifier la concentration totale en protéines. Basée sur la formation complexe, en milieu méthanolique acide, entre les résidus d'acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et aromatiques (tryptophane, phénylalanine) avec le colorant Coomassie® bleu brillant G-250, la méthode de Bradford est facile à mettre en œuvre, rapide, sensible (100 à 1 µg de protéines) et assez résistante à la plupart des interférents. Cette complexation provoque un transfert du pic d'adsorption du colorant qui passe du bleu $\lambda = 470$ nm au rouge $\lambda = 595$ nm. Il existe donc une corrélation entre la quantité de colorant formé dans une solution et la concentration en protéine. Une gamme étalon est réalisée à partir de concentrations connues de BSA (Bovine Serum Albumin). Cette gamme permet d'établir une courbe étalon de la concentration en fonction de l'absorbance mesurée. À noter que la γ -globuline peut également être utilisée comme étalon [19]. Le protocole de dosage que nous avons mis en place est résumé dans **l'annexe 1, tableau A.2**.

2.2.3 Séparation de la fraction protéique et peptidique du venin brut

Parmi les différentes approches (la précipitation et l'extraction sur support solide (SPE) :

- **Précipitation** : La précipitation des protéines, basée sur trois phénomènes (hydratation, charge électrostatique, conformation) est effective par l'utilisation de solvants organiques (méthanol, acétonitrile, acétone), ou de fortes concentrations en sel, ou l'ajout de base ou d'acides forts. Ces mises en solution modifient les structures tridimensionnelles des protéines et induisent le changement de leur solubilité.
- **SPE** : Il s'agit d'une méthode de préparation de l'échantillon dans laquelle des composés en solution ou en suspension sont séparés des autres éléments du mélange par leur distribution entre une phase stationnaire solide contenue dans une cartouche et une phase liquide en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

Nous avons sélectionné **la méthode d'ultrafiltration** afin d'effectuer la séparation des parties protéiques et peptidiques. L'objectif était de réaliser deux fractions grossières (protéiques et peptidiques) pouvant alors faire l'objet d'études spécifiques notamment en termes d'activité biologique. **L'ultrafiltration (UF)** rentre dans le domaine des techniques de filtration membranaire

basée sur l'application d'une différence de pression qui permet le transfert du solvant à travers une membrane dont la taille des pores (caractérisé par le MWCO : Molecular Weight Cut-Off) assure la rétention de solutés. Ces opérations, classées selon une taille des pores décroissante, sont : la microfiltration ($MWCO > 10^5$ Da), l'ultrafiltration ($10^5 < MWCO < 10^3$ Da), la nanofiltration ($10^2 < MWCO < 10^3$ et l'osmose inverse (MWCO égal à 10^2 Da). Alors, au fur et à mesure que le fluide passe à travers la membrane, les constituants qui sont retenus par la membrane seront concentrés dans le rétentat. Les molécules dont les tailles sont inférieures au diamètre des pores membranaires seront récupérés dans le perméat [20]. L'ultrafiltration va nous permettre également à la fois de concentrer des solutions de macromolécules et d'en éliminer la plupart des contaminants de petite masse moléculaire.

Le Tableau II.3 ci-dessous résume les principaux avantages et inconvénients de ces techniques de séparation [21], [22].

Tableau II.3 : Techniques de séparations des protéines et peptides

	Ultrafiltration	Précipitation	SPE
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pas de dénaturation des protéines et peptides. ✓ Séparation d'une grande proportion des petites molécules de protéines ✓ Pas de dilution de la solution ✓ Bonne reproductibilité 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Méthode simple et peu coûteuse ✓ Préservation de l'intégrité fonctionnelle des protéines dans le cas d'utilisation d'électrolytes ✓ Obtention des molécules polaires et non polaires 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Technique adaptée au prétraitement d'échantillons complexes ✓ Bonne reproductibilité ✓ L'éluat obtenu présente une haute pureté ✓ Système d'extraction permettant de réaliser facilement des extractions de composés très polaires ✓ Automatisation possible ✓ Bon rendement
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Les molécules hydrophobes peuvent être absorbées sur la membrane de filtration ✗ Réduction du flux du perméat par phénomène de colmatage ✗ Faible perméabilité des membranes et débit volumétrique réduit. ✗ Durée d'utilisation des membranes assez courte 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Dénaturation des protéines par les solvants organiques et acides forts ✗ Perte de certaines molécules potentiellement d'intérêt qui peuvent se lier avec les protéines précipitées. ✗ Précipitation non complète ✗ Mauvaise reproductibilité 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Sélectivité limitée ✗ Co-élution possible de l'analyte avec des interférents. ✗ Protéines restées sur la phase solide

Suite à une brève introduction des méthodologies de collecte de venin, nous présentons dans la partie ci-dessous le protocole de collecte du venin de frelon appliqué dans notre projet et les principaux résultats de caractérisation.

2.3 Protocole mis en place pour la collecte du venin de frelon asiatique à partir de frelons congelés

2.3.1 Méthode d'échantillonnage

Comme présentée dans la partie ci-dessus, il existe deux méthodes connues pour collecter le venin à partir des frelons congelés qui présentent chacune des avantages et des inconvénients : **la compression du sac** pour récupérer le venin ou **l'extraction du sac à venin entier**. L'objectif principal est de pouvoir récupérer le **volume maximal** de venin brut contenu dans le sac à venin **sans apporter de molécules contaminantes externes**. Aussi, afin de faire un choix objectif sur laquelle des deux techniques de collecte du venin utilisée pour l'ensemble de nos études, nous avons procédé à des analyses des venins prélevés dans chaque méthode par **chromatographie SDS-PAGE** afin de visualiser le panel moléculaire (**Figure II.2**).

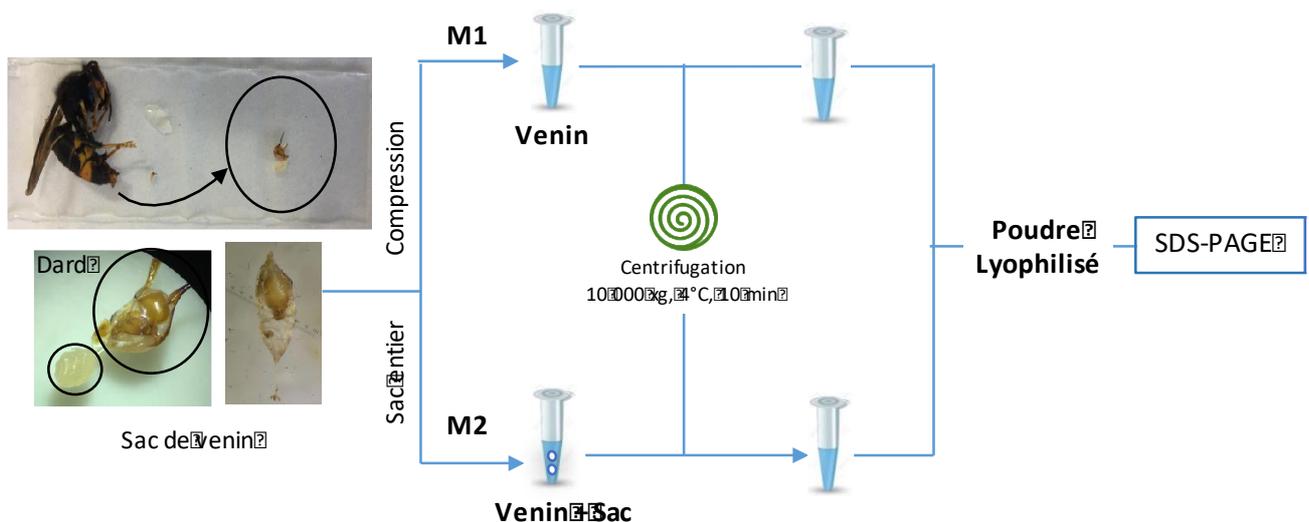


Figure II.2 : Protocole d'échantillonnage (M1 : par compression, M2 : Récupération du sac entier de venin) et analyse du venin par SDS-PAGE

Le protocole appliqué à la récupération du venin est basé sur les études faites par les équipes de Peiren et al. [2] et al. et Handral et Gawade [12].

L'appareil du venin a été enlevé doucement de l'abdomen animal par une pince à point effilé. Le sac à venin (environ 1mm de long, translucide) est séparé du dard. Il est ensuite rincé à l'eau ultra pure pour éliminer les contaminants externes venant notamment des conduits intestinaux. Dix sacs à venins sont ainsi prélevés. Après extraction, du venin de chacun des dix sacs selon chacune des

deux méthodes M1 ou M2, l'ensemble des dix venins est rassemblé dans un même lot ou « pool ». Le venin a été, au préalable, récupéré selon deux protocoles différents M1 ou M2:

- **Protocole M1** – Une compression, et ce pour dix sacs à venin, est effectuée à l'aide d'une pince contre la paroi interne d'un tube Eppendorf afin d'éjecter délicatement son contenu directement dans le tube. Le sac une fois vide est éliminé et 100 µL d'eau ultra pure est ajouté. L'échantillon est ensuite homogénéisé en passant le tube Eppendorf au vortex et centrifugé à 10 000g, à 4°C pendant 10 min. Le surnageant aqueux de venin brut est alors récupéré.
- **Protocole M2** – Les dix sacs à venin sont directement écrasés à l'aide d'une pince dans un tube Eppendorf contenant 100 µl d'eau ultra-pure. Le tout est alors passé au vortex pendant 2 minutes et le surnageant est alors récupéré après une centrifugation à 10 000g pendant 10 min à 4°C.

Les deux surnageants ainsi collectés issus des deux méthodes **M1** ou **M2** sont par la suite filtrés à 0.22 µm avant de subir une étape de lyophilisation permettant d'estimer le poids sec de venin ainsi obtenu. Les échantillons **M1** et **M2** ainsi lyophilisés sont ensuite conservés à -20°C.

La détermination de la concentration en protéines de l'échantillon de venin collecté par la méthode de collection choisie M1 (avant étape de lyophilisation) a été par la suite réalisée par le test de Bradford. **La concentration de protéines présentes dans le venin de *V. velutina* a été mesurée à 55.43 ± 4.68 mg/mL.** En comparaison avec le venin d'abeille, le venin de *V. velutina* contient une **quantité de protéine** proche de celle **des abeilles** ouvrières de **l'ordre de 71.26 mg/mL** [23]. Pour une concentration de protéine présente dans une solution de 10 mg/mL de venin brut, la teneur en protéine représente **26.75 % en masse du venin lyophilisé.**

Avant d'effectuer l'analyse par chromatographie SDS-PAGE, chaque venin lyophilisé est dissous dans l'eau ultra-pure afin d'obtenir une concentration identique en venin. Le protocole de l'électrophorèse sur le gel SDS-PAGE est réalisé selon celui présent dans la **section 2.2.1**. Le pourcentage du gel SDS-PAGE utilisé est 10% permettant de déterminer la présence de protéines de haute masse moléculaire (plus haute résolution dans la gamme de 20 à 180 kDa) ou 15 % pour les protéines de faible masse moléculaire (plus haute résolution dans la gamme de 10 à 40 kDa) (**Figure II.3**).

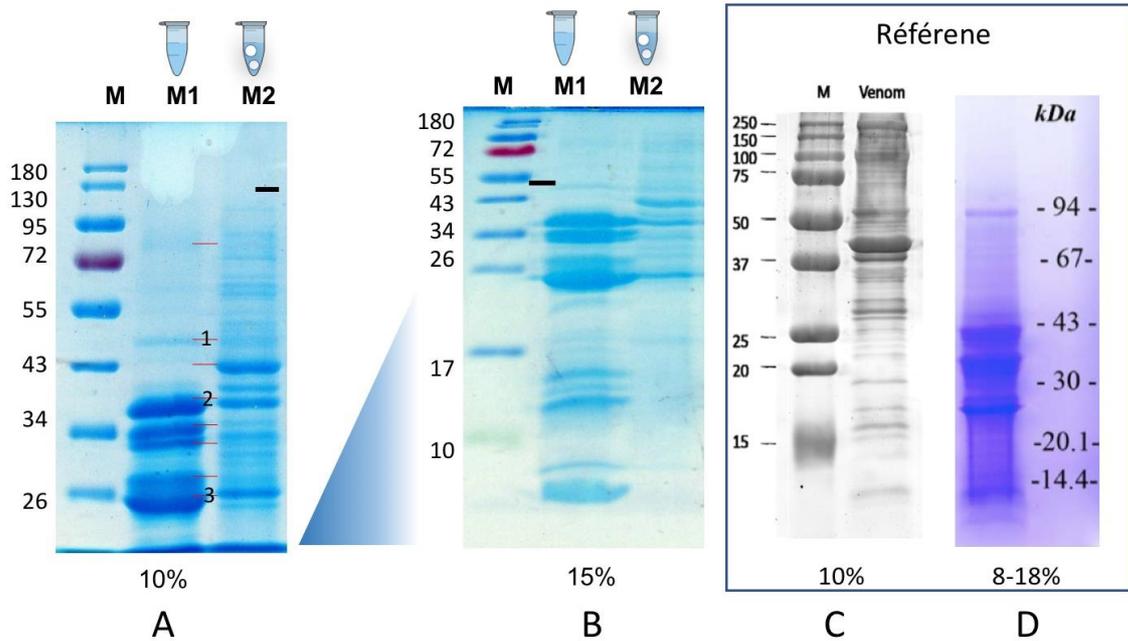


Figure II.3 : Profil de SDS-PAGE des venins de *V. velutina* extraits par les deux protocoles différents ($n=2$) **M1** ou **M2** sous la condition réductrice. **A** – profil expérimental de venin à 10 % de gel. **B** -profil de venin à 15% de gel. **C** -Profil de référence obtenu par le protocole **M2** du venin à 10 % de gel d'après Liu et al. [5] sous la condition réductrice. **D**. profil de référence de venin, obtenu par le protocole **M2**, à 8-18% de gel d'après Longé et al. [24], sous la condition non réductrice. **M** : marqueur étalon (Prestained Protein Ladder 06P-0111)

D'après de la **Figure II.3**, nous observons une différence significative en termes de contenu moléculaire et de quantité entre l'analyse des deux lots de venins **M1** et **M2** obtenus respectivement à partir des deux protocoles d'échantillonnage **M1** ou **M2**. En effet, nous retrouvons l'échantillon **M1** des molécules en quantité dont la masse se situe entre **26 kDa et 35 kDa** alors que l'échantillon **M2**, indique préférentiellement des molécules de masse moléculaire égale à **26 kDa, 35 kDa et 43 kDa** (illustrée par les trois tirets rouges). De plus, l'échantillon **M2** indique également une distribution de **moindre intensité**, sur les **hautes masses (43 kDa à 95 kDa)**, distribution absente sur l'échantillon **M1**. Inversement, le profil chromatographique de l'échantillon **M1** couvre une gamme de masse de **8 kDa à 26 kDa**, gamme de masse absente pour l'échantillon **M2**. En nous basant sur des travaux effectués par l'équipe Liu et al.[5], nous pouvons déterminer que la bande située à **13-15 kDa** correspond à la **phospholipase A2**, celle située à **22 kDa** correspond à l'**Antigen**

5 (bande 3), celle située à **36 kDa** correspond à la **Phospholipase A1 (bande 2)**, à **44 kDa**, nous trouvons l'**hyaluronidase**, et à **46 kDa** une **métalloprotéinase** (bande 1) [5].

En comparant les deux profils de nos deux échantillons M1 et M2 avec les deux profils de référence (**Figure II.3.C et D**) tirés des études menées par l'équipe de Zhirui Liu et al, Chine[5] et par l'équipe de Longé C et al, France [24], nous pouvons constater que nous retrouvons dans notre échantillon **M1 et M2** une distribution **similaire de molécules dans la gamme 20-46 kDa**. Nous trouvons également la présence de molécules similaires de **haute masse** entre le résultat du protocole M2 et les références. Il semblerait que ces molécules soient supposées **provenir essentiellement de protéines de la membrane du sac à venin**.

Compte tenu du fait que les molécules en commun semblent être en plus grande quantité au sein de l'échantillon M1 en comparaison avec l'échantillon M2 et présentant moins de bandes des protéines de haut de gamme qui sont considérées comme les contaminants, nous avons décidé de sélectionner le protocole M1. Ainsi pour la suite des études l'extraction du venin du sac sera réalisée par compression douce (protocole M1).

2.3.2 Séparation des parties protéique et peptidique-petites molécules

Au cours des trois années de thèse, un total de **679 frelons asiatiques**, toute caste confondue, originaire de la région d'Indre-et-Loire a été échantillonnée afin d'en prélever le venin brut.

Ce dernier a subi une étape de filtration afin de récupérer en finales **deux fractions**, une dont les molécules ont **une masse inférieure à 10 kDa** et **une seconde supérieure à 10 kDa**.

Cette étape de dessalage a été effectuée **par ultrafiltration**. L'ultrafiltration centrifuge est ici utilisée au sein de notre laboratoire sur des concentrateurs d'échantillons de type Vivaspin (VWR) possédant une membrane en polyéthersulfone placé dans un tube polycarbonate.

Ils sont conçus pour une **utilisation rapide, non dénaturante et à haut rendement** des échantillons biologiques. L'ensemble du processus est réalisé dans un seul tube avec un compartiment supérieur contenant l'échantillon et un compartiment inférieur séparés par cette membrane semi-perméable avec un cut-off en termes de masse moléculaire (MWCO : Molecular Weight Cut- Off) choisi par l'utilisateur. La centrifugation est appliquée pour forcer le solvant à travers la membrane, laissant une solution protéique plus concentrée dans la chambre supérieure.

Protocole : Afin de procéder à une ultrafiltration pour nos études, les filtres cut-off de 10 kDa CTA Vivaspin 2 mL (WVR) sont préalablement lavés avec 100 µL d'eau ultra-pure afin d'éliminer des contaminants venant des filtres. Le venin brut (Vv) est chargé au-dessus du filtre et est passé en centrifugation à 10000 g, à 4°C pendant 30 min. Ensuite, 600 µL d'eau ultra-pure sont ajoutés et une deuxième filtration est conduite. La solution au-dessous du filtre comprenant les molécules avec les masses inférieures à 10 kDa sera nommée par la suite Vv <10 kDa. Les composés restés sur la surface du filtre ont été récupérés avec deux volumes de 100 µL d'eau ultra-pure. Cette solution contenant les molécules de masse supérieure à 10 kDa sera nommée Vv > 10 kDa. Les différentes solutions ainsi obtenues après ces étapes par ultrafiltration sont ensuite lyophilisées. Les quantités de chacun des échantillons lyophilisés sont déterminées et ces derniers sont conservés à -20°C.

A partir de cet échantillonnage de venin de frelon asiatique, deux stratégies ont été proposées afin d'évaluer le potentiel de ce venin en vue d'une application dermacosmétique.

3 Stratégie ciblant l'activité du venin brut ou fractionné

La stratégie ainsi que les techniques mises en œuvre pour l'étude des différents échantillons de venin brut et constituées des fractions inférieures ou supérieures à 10 kDa sont illustrées dans la **Figure II.4** ci-dessous.

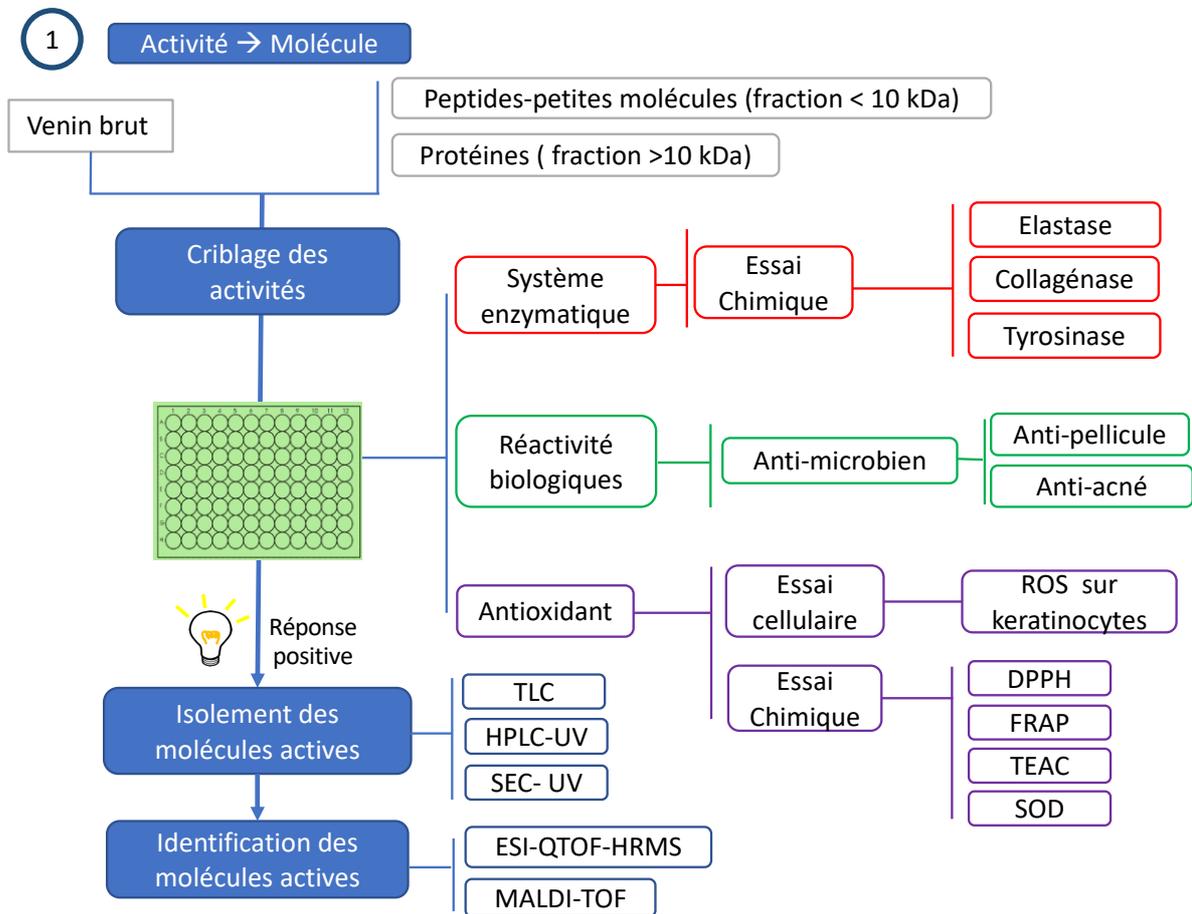


Figure II.4 : Illustration de la stratégie d'étude ① du venin brut et des fractions protéines ou peptides

3.1 Criblage basé sur des allégations cosmétiques

Dans le cadre de notre projet, un nombre de tests *in cellulo* ont été mis en place en collaboration avec le Centre Biophysique Moléculaire (CBM) CNRS Orléans afin d'étudier l'activité potentielle du venin brut et des fractions obtenues sur :

- Des allégations enzymatiques : la tyrosinase, l'élastase et la collagénase.
- L'activité antioxydante
- L'activité potentielle antimicrobienne (anti-acnés et antipellicules)

3.2 Techniques de fractionnement du venin

Dans le cadre de nos travaux, nous avons mis en place des méthodes de fractionnement du venin brut telles que la chromatographie sur couche mince (TLC), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Dans ce contexte, le principe de ces dernières, leur utilisation dans l'analyse de venin et les conditions opératoires mises en place dans cette thèse ont été présentés ci-dessous.

3.2.1 La chromatographie sur couche mince (TLC)

Dans le cadre de cette thèse, **la technique TLC a été utilisée en couplant avec le test DPPH** pour identifier de manière **ciblée la ou les molécules antioxydantes** présentes dans le venin brut.

La TLC est une technique chromatographique complémentaire de la chromatographie en phase liquide HPLC qui a été introduite pour le premier temps en 1938 par Izmailov et Schreiber. Dès ses débuts, la TLC a montré des avantages tels que la capacité de séparer simultanément plusieurs échantillons déposés sur la plaque et la détection directe de composés de différentes familles chimiques.

Le mélange à étudier, entraîné par une phase mobile ou éluant, migre par capillarité sur un support fixe solide constitué par exemple de grains de silice (10 à 12 μm de diamètre) constituant une phase stationnaire déposée en couche mince (100 à 200 μm d'épaisseur) sur une plaque d'aluminium ou de verre. La diminution de la granulométrie et l'amélioration de l'homogénéité du dépôt de la phase stationnaire sur la plaque support permettent d'augmenter la résolution des séparations (gain d'efficacité) et la sensibilité de la méthode.

Les différentes étapes pour la mise en œuvre d'une chromatographie en couche mince concernent la préparation de la cuve de migration, préparation de l'échantillon, conditionnement de la plaque, déroulement de l'élution et enfin utilisation d'une révélation appropriée. Nous présentons donc dans la section suivante le principe de cette technique.

3.2.1.1 Principe de TLC

La séquence de ces différentes étapes est résumée dans la **Figure II.5** ci-après.

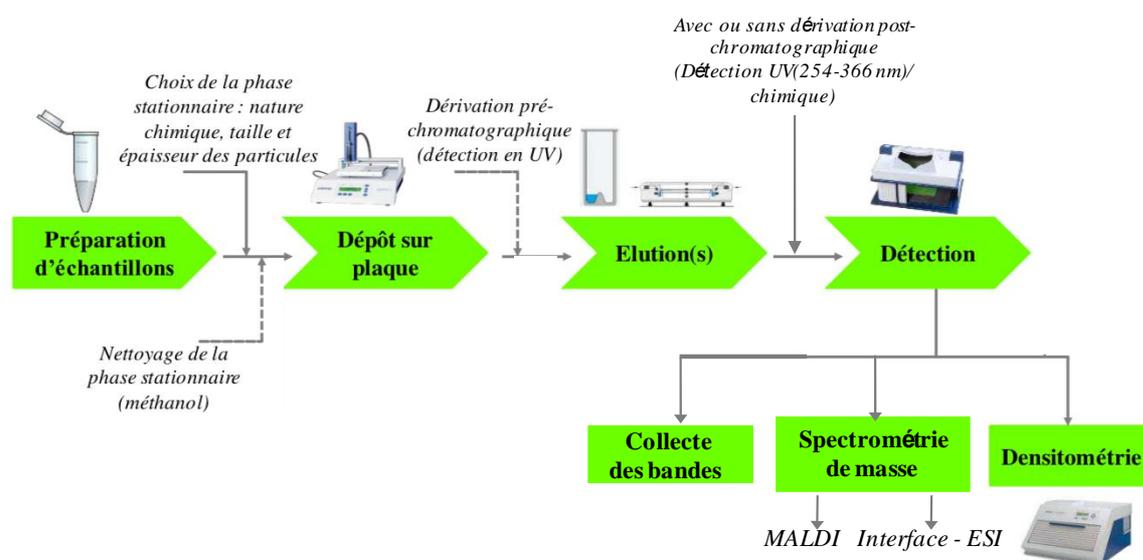


Figure II.5 : Description des différentes étapes constitutives d'une analyse par chromatographie sur couche mince (TLC) (Schéma inspiré de la référence [25])

i) Choix de la phase stationnaire

Les phases stationnaires appréciées et les plus couramment utilisées pour la chromatographie d'absorption en TLC sont le gel de silice (phase la plus utilisée en TLC), l'oxyde d'aluminium, kieselguhr ainsi que le silicate de magnésium. Les chromatographies de partage sont plus fréquemment employées avec des phases de types cellulosiques ou de polyamide (utilisées aussi pour l'échange d'ions) ou le C18 tandis que les phases de types gels (dextrans) sont particulièrement appréciées pour leur efficacité de séparation dans les chromatographies d'exclusions stériques.

Tableau II.4 : Type de phases stationnaires et de chromatographies associées les plus utilisées en TLC (figure extraite de la référence [25])

Type de phase	TLC (%d'utilisation)	Type de chromatographie
Gel de silice	73.3	Adsorption
Cellulose	5.2	Partage
Polyamide	1.8	Echange d'ions/partage/adsorption
Phases liées	5.5	Partage
Oxyde d'aluminium	2.6	Adsorption
Kieselguhr	0.3	Adsorption
Gels	0.4	Exclusion stérique

ii) Choix de la phase mobile

Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle. Chacun des constituants est plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire. Le choix de l'éluant est le point crucial pour réussir une bonne séparation en TLC. Il dépend de la polarité des constituants que l'on a à séparer.

iii) Mode de dépôts de l'échantillon

Le dépôt des échantillons peut être fait selon deux méthodes :

- **Dépôt par la capillarité** : qui peut être fait manuellement ou à l'aide d'un appareil en utilisant un capillaire à embout plan. Dans ce type de dépôt, le soluté est déposé sous forme d'une tache de 1-3 mm de diamètre avec un effet de diffusion des échantillons.
- **Dépôt par vaporisation** : ce dépôt est appliqué en ajoutant un courant d'azote qui permet de sécher rapidement le dépôt. L'échantillon est ici déposé sous forme d'une bande fine homogène avec une bonne reproductibilité.

iv) L'étape de migration

La migration est effectuée dans une chambre fermée dans laquelle l'atmosphère est saturée en vapeur d'éluant. Lorsque l'éluant atteint la hauteur souhaitée de la plaque, cette dernière est alors retirée. La position du front de l'éluant est alors marquée. On peut alors sécher la plaque pour éviter tout étalement des taches.

On détermine alors, pour chacun des constituants qui ont migré, un rapport frontal : $R_f = d/D$ (sans unité) où :

- **d** désigne la distance parcourue par la substance (en utilisant le haut de la tache)
- **D** désigne la distance parcourue par le front de l'éluant (à partir de la ligne des dépôts).

v) Dérivation

En final, le plus souvent, les produits que l'on a séparés sont incolores, on ne voit alors aucune tache sur la plaque : il faut utiliser une méthode de révélation. Il existe :

- La révélation avec une lampe UV, qui fait appel au sulfure de zinc qui, additionné à la silice, rend la plaque fluorescente lorsqu'on la place sous une lampe UV ou bien au fait que certaines plaques TLC contiennent un indicateur fluorescent (silicate de zinc activé au manganèse) permettant une résolution dans l'UV lointain (254nm).

- La révélation chimique qui consiste à pulvériser sur la plaque un réactif spécifique qui réagit avec les taches pour donner une tache colorée.

Par ailleurs, la détection par densitométrie permet de représenter le profil TLC sous forme d'un densitogramme par mesure d'absorbance ou de fluorescence des composés. Les densitomètres sont constitués de trois types de lampes (deutérium : 10-400 nm, tungstène : 400-800 nm, mercure : 400-600 nm) permettant de balayer une large gamme de longueurs d'onde et sont usuellement utilisés pour une analyse qualitative et quantitative [25].

vi) Détection et identification

L'attribution des taches lors de l'analyse en TLC d'un mélange inconnu est basée généralement sur la détermination du rapport frontal (R_f). Afin de confirmer l'identification des composés faite selon ce paramètre de mesure, la spectrométrie de masse apparaît comme un outil complémentaire de choix pour élucider leur structure. Développés depuis les années 1980, différents types de couplage sont possibles entre la chromatographie sur couche mince (TLC) et la spectrométrie de masse : **i)** le couplage TLC-MS via l'interface Camag[®], **ii)** le couplage direct TLC-MALDI-TOF-MS.

Ces dernières années, le potentiel de l'analyse directe de plaques de chromatographie sur couche mince (TLC) par MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry). L'ionisation de surface engagée dans le processus MALDI est bien adaptée au couplage avec la chromatographie planaire (TLC). En effet, on peut réaliser une analyse directe des spots adsorbés sur la plaque TLC et obtenir leurs spectres de masse correspondants, généralement pour une gamme de masse $m/z > 400$ (sans interférence matricielle).

L'avantage de l'utilisation du couplage TLC-MALDI-TOF-MS par rapport au couplage TLC-MS via l'interface CAMAG est le faible diamètre de l'impact laser (20 μm) permettant d'obtenir une résolution spatiale acceptable. Ainsi, même en cas de co-élution ou recouvrement de bande, les composés constitutifs de ces bandes peuvent être identifiés par leur masse respective.

3.2.1.2 Étude de séparation des peptides et acides aminés par Thin Layer Chromatography (TLC)

L'acide aminé est un acide carboxylique (R-COOH) qui a également un groupe fonctionnel d'amine. Il est connu de nos jours environ 500 acides aminés dans les organismes vivants qui peuvent être classés de nombreuses manières différentes, celle le plus souvent est par la position de groupe amine par rapport au groupe carboxylique, telle que : α -acide aminé, β -acide aminé, γ -acide

aminé, δ -acide aminé [26], [27]. Parmi eux, les α acides aminés dont structure générique est $H_2N-CHR-COOH$ avec R comme une chaîne latérale enchaînés par liaisons peptidiques (amide) sont des constituants principaux de quasi toutes les protéines et peptides dans les organismes vivants.

Les acides aminés, peptides, et protéines (ex : insuline, lysozyme) sont capables d'être analysés par chromatographie sur couche mince (TLC) en phase normale de gel de silice, cellulose ou phase inverse RP 18 [28], [29]. Les phases mobiles utilisées sont constituées couramment des alcools tels que le butanol, le méthanol ou l'acétonitrile associé à l'eau [28]. Les acides organiques tels que l'acide acétique, acide trifluoroacétique, l'acide formique sont également ajoutés comme un agent d'appariement d'ion. L'ammoniaque ou pyridine sont souvent utilisés pour réduire l'activité des groupements silanol dans les phases stationnaires de silice [28].

Afin de détecter les peptides et acides aminés, il existe plusieurs révélateurs (méthode de « Morin », réaction d'amidon d'iode et la ninhydrine). Dans le cadre de la « méthode de Morin » (3,5,7,2',4-pentahydroxyflavone), la détection des acides aminés et des peptides est obtenue par fluorescence. Concernant la réaction d'amidon d'iode, celle-ci permet une détection des peptides dans le visible sous forme des tâches bleues [30]. Outre ces approches de révélation, le réactif ninhydrine reste le plus couramment utilisé [30]. Ce dernier induisant une réaction chimique avec groupe amine ($-NH_2$). Cette réaction produit un chromophore de la ninhydrine nommé la pourpre de Ruhemann ($\lambda = 570$ nm ou $\lambda = 440$ nm pour les produits d'hydroproline et proline). Le mécanisme de cette réaction a été revu par Friedman en 2004 [31] et décrit ci-dessous :

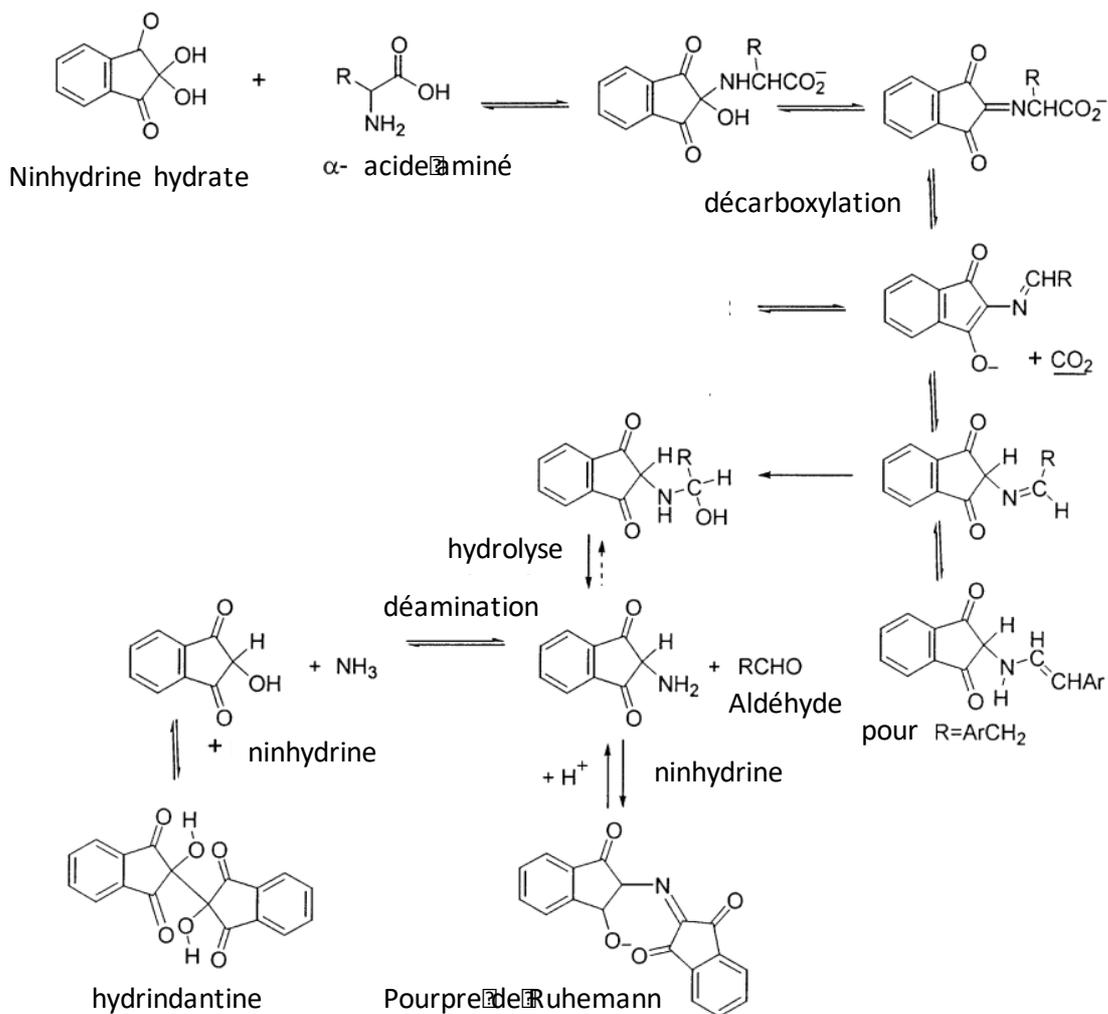


Figure II.6 : Mécanisme de la réaction de ninhydrine avec α -acide aminé[31]

Ainsi, suite à l'étape de migration, les plaques sont pulvérisées avec la **solution de ninhydrine et chauffées à 90-100°C pendant 5-10 min**. Cette étape permet de faciliter la déshydratation et la décarboxylation pendant la réaction[30]. Les acides aminés ou des peptides réagissant avec la ninhydrine donnent alors des taches violettes ou orange/jaunes qui peuvent être détectées à la lumière blanche.

Un résumé des conditions de séparation des peptides et acides aminés trouvés dans la littérature est présenté sous forme de **Tableau II.5** ci-après :

Tableau II.5 : Exemples des systèmes de migration de TLC dans l'étude des acides aminés et peptides

Plaque	Échantillon	Système de solvant	Révéléateur	Ref
Silica gel 60	L'hydrolysate de protéine insoluble du soja à froid traité par pepsine	BuOH : HOAc : H ₂ O (4/1/2)	Ninhydrine	[32]
	L'hydrolysate de caséine du lait de chèvre, traité par trypsine/chymotrypsine	CHCl ₃ : MeOH : NH ₃ 25% (2/2/1)	Ninhydrine 0.05% (w/v), chauffage à 95°C 15 min	[33]
	Peptides de l'hémolymphe de crabe marin <i>Dromia dehaani</i>	BuOH : HOAc : H ₂ O (5/1/4)	Ninhydrine, chauffage à 100°C	[34]
	Angiotensine	i)n- BuOH : HOAc : H ₂ O (4/1/1) ii) n- BuOH : pyridine : H ₂ O (30/20/6)	Ninhydrine	[35]
	Analogues de vasopressine	n-BuOH : HOAc : H ₂ O (4/1/1)	UV	[36]
	Peptides	CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O 17% NH ₃ (2/2/1)	Solution 0.05% (w/v) de 4 Cl-7 nitrobenzenofurazan dans EtOH	[36]
	Toxines des cyanobactériennes : microcystine LR et nodularine	1-PrOH : ethylacétate : H ₂ O (30/50/20), contenant acide acétique à 5% (concentration finale)	Solution de spray : 8 mL de l'acide sulfurique concentré + 500 µL de p-anisaldehyde à MeOH/HOAc(85 :10), chauffage à 105 °C	[37]
	Peptides de standard	H ₂ O : MeOH (1/9 ou 7/3) avec 25 mM/100 mM TFA	2% (w/v) solution de ninhydrine dans acetone/MeOH/acide acetique glacial (125/125/10)	[38]
	Digestion tryptique de b-caséine (Plaque de Protéochrome, Merck)	2-BuOH : pyridine : NH ₃ 25% : H ₂ O (39/34/10/26)	UV ou spray de Ninhydrine 0.5%	[39]

			pendant 20s et chauffage à 110°C	
RP-18	Digestion trypsique de 5 protéines: cytochrome c, myoglobine, b-caséine, lysozyme et sérum d'albumine bovine (BSA).	MeOH : H ₂ O (70/30) avec 0.1 M d'ammonium acétate	ESI-MS	[40]
	Peptides synthétisés de standard	MeOH : H ₂ O (1/1) avec 0-50 mM TFA	Ninhydrine	[28]
Cellulose	Peptides trypsiques du virus polyoma	<i>n</i> -BuOH: HOAc: H ₂ O: pyridine (150/30/120/20)	Ninhydrine	[36]
	Cystine peptides	BuOH : HOAc : H ₂ O (71/7/22)	Ninhydrine	[36]

Suite à notre recherche bibliographique nous avons décidé d'évaluer plusieurs natures de support et méthode de migration lors de l'analyse de nos échantillons de venin de frelon asiatique. Les conditions optimales ont été :

Protocole : Afin de procéder à la séparation des acides aminés et peptides du venin de frelon, nous avons sélectionné des plaques en **gel de silice F254**. Suite au dépôt de notre échantillon, la plaque a été migrée dans une cuve verticale avec une phase mobile **butanol : HOAC: H₂O (4 :1 :2)**. Après séchage, la révélation de la plaque a été réalisée avec **la ninhydrine 0.05%** pour une détection des spots dans la lumière blanche.

3.2.2 La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide de haute performance (HPLC) est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange se trouvant en phase homogène liquide. Son principe repose sur l'équilibre des concentrations des composés à séparer entre deux phases en contact : la phase stationnaire (colonne chromatographique) et la phase mobile. La séparation est basée sur la rétention différente des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps variables et liés à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, polarité, ...) et à leur affinité respective pour la phase stationnaire et pour la phase mobile. À leur arrivée en

bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

La technique HPLC est utilisée pour la séparation des constituants de mélanges complexes. Grâce au large choix de chimie de colonne et la possibilité de modification des phases mobiles pour optimiser la séparation, cette technique est considérée comme une approche universelle qui est capable de couvrir une large gamme de molécules de taille et propriétés différentes.

L'analyse HPLC se réalise à l'aide d'un système constitué de quatre modules principaux :

- ✓ Un système de pompage qui permet de prélever l'éluant, d'en réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble en mode isocratique ou en mode gradient d'éluant.
- ✓ Un système d'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique (vanne d'injection à boucle externe).
- ✓ Une colonne chromatographique qui assure la séparation chromatographique des solutés de l'échantillon injecté.
- ✓ Un détecteur qui assure la visualisation des solutés élués de la colonne chromatographique.

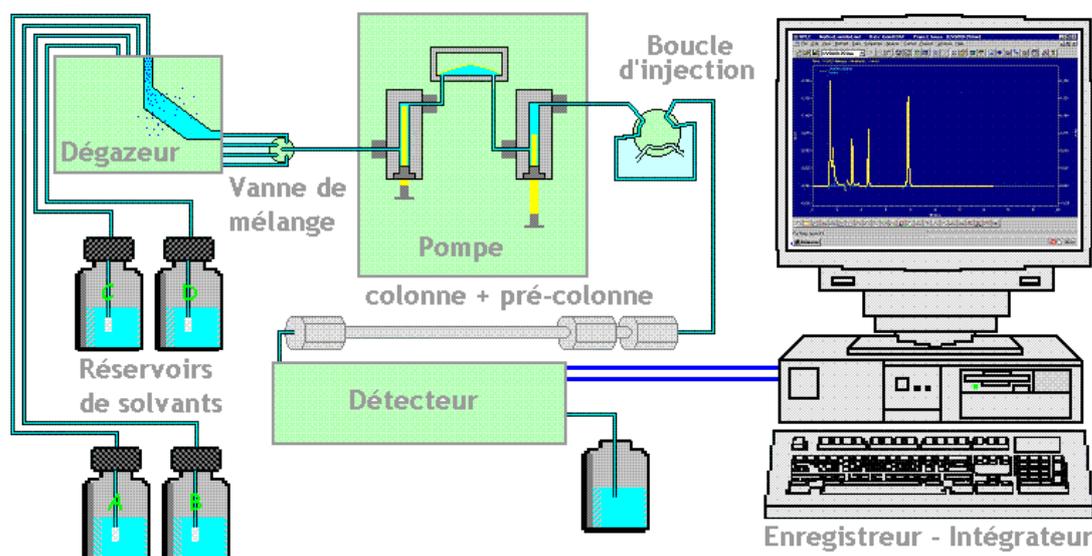


Figure II.7 : Schéma simplifié d'une chaîne Chromatographique HPLC [41].

La chromatographie liquide permet également d'apporter un fort potentiel de sélectivité à travers un large éventail de phases stationnaires permettant de mettre en œuvre différents types de mécanismes d'interactions tels que : l'échange d'ions (IEC), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) ou encore la chromatographie à

polarité de phases inversée (RP, *Reversed Phase*) qui est le mode chromatographique le plus employé dans l'analyse de solutés tels que les peptides par la technique HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Les phases stationnaires à polarité de phases inversée sont le plus souvent constituées de particules de silice greffées par des chaînes alkyles (C18, C8...) permettant l'utilisation de phases mobiles hydro organique particulièrement adaptées à l'ionisation des molécules peptidiques lors d'un couplage LC-ESI/MS. Tous les paramètres clés de la spectrométrie de masse, la résolution, la sensibilité, la précision en masse et la rapidité de balayage sont en constante évolution et amélioration. Ainsi, la technique ESI-MS est devenue un outil adapté à l'analyse de macromolécules dans des milieux complexes tels que le venin de frelons.

Ainsi, nombre de venins ont fait l'objet d'études effectuées par la technique chromatographie phase liquide HPLC couplée à la spectrométrie de masse, études dont certaines sont indiquées dans le Tableau II.6 ci-dessous.

Tableau II.6 : Exemples des séparations du venin par HPLC-UV-MS

Échantillon	Phase stationnaire	Phase mobile	Détecteur	Ref
Venin de <i>Dinoponera quadriceps</i> (fourmi)	C-18 (PepSwift) Colonne capillaire monolithique (100 µm diamètre interne x 25 cm)	A: 20mM ammonium formiate, pH 10 B: ACN 99%-20% de A: 80 min. 20%-1% de A: 10 min	Spectrométrie de masse (ESI-QTOF)	[42]
Venin de <i>Tityus obscurus</i> (scorpion)	C-18 (X-Bridge BEH 130) (100 mm x 2.1 mm; 3.5 µm), à 30°C	5%-95% de 0.1% TFA/ACN : 0 à 95 min	UV et spectrométrie de masse (IT-TOF)	[43]
Venin de <i>Bombyx batryticatus</i> (serpent)	ReproSil-Pur C18 AQ (3 µm, 100 Å)	A: 0.1% d'acide formique (AF)/H ₂ O B: 0.1% AF/80% ACN 5%-95% de B: 0-50 min	Spectrométrie de masse (FT-ICR)	[44]
Venin de <i>Lasiadora parahybana tarantula</i> (araignée)	C18 (Vydac) (2.1x150 mm, 5 µm, 300 Å)	A : ACN B : 1% AF/eau 0-100%de B: 90 min 100% de B : 10 min	Spectrométrie de masse (ESI-QTOF)	[45]

Dans le cadre de l'analyse des fractions peptidiques du venin de frelon, les conditions opératoires seront présentées dans le **chapitre III**.

3.2.3 La Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Outre cette technique séparative, l'approche de SEC a été appliquée pour fractionner les échantillons de venin brut de frelon afin d'obtenir différentes fractions riches en protéines, peptides voire en petites molécules (**chapitre III**). Ces fractions feront l'objet d'études d'activités biologique afin de déterminer la fraction potentiellement active vis-à-vis de l'allégation testée et ainsi pouvoir aller plus avant afin de déterminer la ou les molécules, présentes dans cette fraction, qui porte cette activité biologique. On distingue deux types de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) basée sur la séparation des constituants d'un mélange selon leur taille : la filtration sur gel qui emploie une phase mobile aqueuse ou la perméation de gel qui utilise une phase mobile organique. Lors d'une séparation par chromatographie d'exclusion stérique, la composition de la phase mobile reste constante et n'a aucun effet significatif sur la séparation [46].

La séparation chromatographique de biomolécules en solution en fonction de leur taille est nommée la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Contrairement à d'autres modes de chromatographie, elle se base sur l'absence de toute interaction entre l'analyte et la phase stationnaire de la colonne. Lors de l'utilisation de la chromatographie SEC, les molécules sont séparées de la plus grande à la plus petite en fonction de leur taille moléculaire en solution. Le principe de cette technique sera présenté ci-dessous.

3.2.3.1 Principe de SEC

i) Choix de phase stationnaire

Le type de résine utilisée et la longueur de la colonne jouent un rôle critique dans la résolution de protéines séparées par SEC. Le choix de la résine dépend de la masse moléculaire des protéines qui nécessitent une séparation et les conditions dans lesquelles la séparation sera effectuée.

Les colonnes SEC sont remplies d'une phase stationnaire pouvant être constituée de billes uniformes de diamètre compris entre 3 et 20 μm . Le remplissage est un matériau nanoporeux qui peut être organique (Gels hydratés (Type Séphadex™, Sépharose™), polymère réticulé (PS-DVB) ou minéral (verre ou silice poreux), avec une gamme de porosité variant de 0.4 nm à 400 nm. Cette échelle de porosité devrait permettre l'analyse de tout poids moléculaire compris entre $2 \cdot 10^2$ et 10^8

Da. La séparation est optimale lorsque la distribution en taille des pores coïncide avec celle des macromolécules à analyser.

Nous pouvons nommer comme exemple les colonnes Superdex™ fourni avec deux hauteurs de lit différentes, 150 et 300 mm, disponible avec trois milieux différents : Superdex™ Peptide (gamme de fractionnement : 100 à 7000), Superdex™ 75 (gamme de fractionnement : 3000 à 70 000) et Superdex™ 200 Increase (gamme de fractionnement : 10 000 à 600 000) permettant une plus grande flexibilité d'adaptation aux différents besoins analytiques (**Figure II.8**).

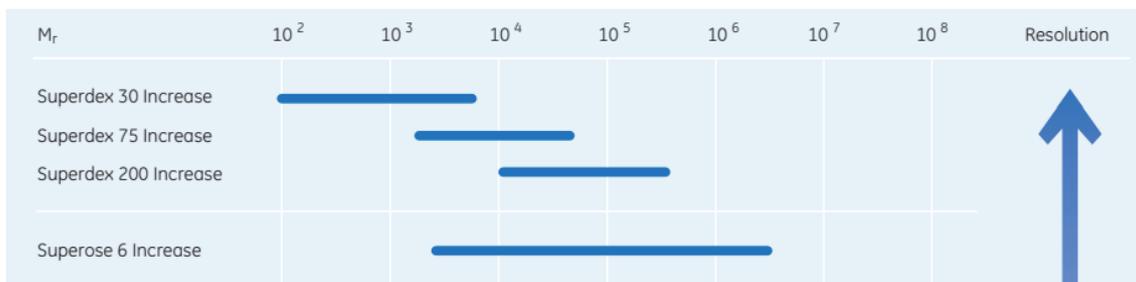


Figure II.8 : Exemple de gamme de perméation sélective (gamme de fractionnement) pour les trois colonnes commercialisées Superdex [46]

ii) Choix de phase mobile

Contrairement à la chromatographie de partage et la chromatographie d'adsorption, la sélection de la phase mobile en chromatographie d'exclusion sur gel quant à lui ne s'effectue pas en fonction de la polarité du solvant. En effet, la phase mobile doit :

- Surtout pouvoir dissoudre l'échantillon et être suffisamment semblable à la phase stationnaire pour la mouiller et d'éviter l'adsorption. Ainsi, les solvants aqueux ne devraient être utilisés qu'avec les phases stationnaires polymères aqueuses et aussi les solvants organiques ne sont utilisés qu'avec des phases stationnaires polymères organiques.
- Gonfler la phase stationnaire dans le cas de gel mou, car la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée.
- Dans le cas idéal, la phase mobile, le solvant piégé et le gel doivent interagir de manière identique avec les molécules du soluté afin que son déplacement dans les pores ne se fasse que par diffusion.
- Etre compatible avec l'appareillage et le détecteur potentiellement employé.

Les phases mobiles les plus couramment utilisées sont aqueuses comme les tampons, l'eau ou les solvants organiques telles que le tétrahydrofurane, le m-Crésol, le chloroforme, le toluène...

iii) Principe

D'après de la **Figure II.9**, en traversant la colonne, chaque molécule est éluée avec un volume d'élué V_e . Les macromolécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores de la phase stationnaire ne sont pas retenues dans le gel. Elles sortent de la colonne dans un premier temps et sont donc éluées dans le volume interstitiel ou d'exclusion totale V_i . Bien souvent, ce volume d'exclusion total V_i est déterminé en utilisant le bleu dextrans, polymère d'ose de masse molaire supérieure à $2 \cdot 10^6$ Da. Plus les molécules seront de taille moyenne ou petite, plus elles seront éluées tardivement, car incluses dans le gel (perméation sélective).

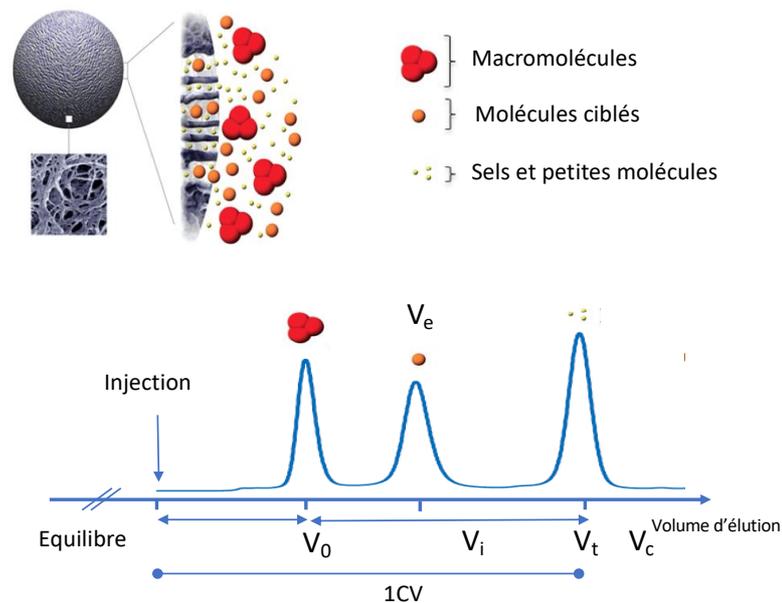


Figure II.9 : Principe de chromatographie d'exclusion stérique. CV : volume de colonne, V_c : volume total de la colonne de verre vide. V_t : Volume de perméation totale. V_0 : volume interstitiel ou d'exclusion totale. V_i : volume des pores. V_e : volume d'élué (ou de rétention). Schéma adapté à partir de la référence [46]

Les petites molécules sont éluées dans le volume de perméation totale V_t . Un domaine de perméation sélective V_i est alors défini comme étant la différence $V_t - V_0$. Ce domaine peut être plus ou moins étendu en jouant sur la longueur de la colonne

Nous avons :

$$V_e = D (\text{débit}) \cdot t (\text{temps})$$

et

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

On définit alors le coefficient de partage K_d qui représente la distribution d'un composé entre la phase mobile interne et externe par la relation :

$$K_d = \frac{(V_e - V_0)}{(V_c - V_g - V_0)}$$

avec

$$V_i = V_c - V_g - V_0$$

Où : V_g au volume de la phase stationnaire sèche

Différents systèmes de détection peuvent être mis en sortie de colonne chromatographique. Ceux-ci peuvent être classés en deux classes :

- ✓ Les détecteurs qui donnent des résultats proportionnels à la concentration de la molécule dans la solution parmi lesquels nous retrouvons le réfractomètre différentiel, le détecteur par spectrophotométrie d'absorption.
- ✓ Les détecteurs qui donnent des résultats proportionnels à la masse molaire moyenne en masse des molécules d'intérêts : viscosimètre, osmomètre continu, détecteurs à diffusion de la lumière (technique LALLS pour Low Angle Laser Light Scattering).

3.2.3.2 Application de la chromatographie d'exclusion stérique dans l'étude de venin

Pouvoir effectuer une cartographie massique, chromatographique ou électrophorétique d'un venin permet de fournir une empreinte unique caractéristique de ses différents constituants moléculaires. Plusieurs techniques permettent d'atteindre cet objectif dont la chromatographie d'exclusion stérique fait partie. Dans ce cadre d'études, des exemples d'approche de différents venins via cette technique chromatographique sont indiqués dans le **Tableau II.7** ci-après.

Tableau II.7 : Exemple d'étude de venin par chromatographie d'exclusion stérique

Type de venin	Colonne chromatographique utilisée	Phase stationnaire	Phase mobile	Réf
<i>Chironex fleckeri</i> (nématocystes)	HiLoad 16/60 superdex 200 prep grade	Dextrane et agarose	20 mM PO ₄ ³⁻ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	[47]
<i>Paraphysa scrofa</i> (araignée)	Superdex-30		100 mM acétate d'ammonium pH 6.0	[48]
<i>Cyanea nozakii</i> <i>Kishinouye</i> (méduse)	16/80 Superdex 75		20mM Tris-HCl, et 0.15M NaCl pH 7.8	[49]
<i>Naja mossambica</i> <i>mossambica</i> et <i>N.</i> <i>scutatus</i> (serpents)	Superdex G-75		0.1 M acétate d'ammonium, pH 5.0	[50]
<i>Oxyuranus</i> <i>microlepidotus</i> et <i>Oxyuranus scutellatus</i> (serpent)	Superdex 100 10/30		200 mM acétate d'ammonium	[51]
<i>Bothrops jararaca</i> (serpent)	Sephadex G-25 (101 cm × 1.2 cm, 120 mL).	Réticulation du dextrane avec l'épichlorhydrine	50 mM acétate d'ammonium, pH 4.0,	[52]
<i>Polybia paulista</i> (guêpe)	Sephacryl S100	Copolymère réticulé d'allyl dextrane et de N, N'-méthylène bisacrylamide	5 mM acétate d'ammonium, pH 6.8	[11]
<i>Polybia occidentalis</i> (guêpe)	Sephacryl S200 FF (1 cm × 40 cm)		50 mM acétate d'ammonium, pH 8.0	[53]

En se basant sur les études menées par chromatographie d'exclusion stérique et sur le dispositif mis à notre disposition, le protocole utilisé dans le cadre de notre étude de venin brut se décline :

Sur le système de chromatographie **ÄKTA pure** (GE healthcare life science) par la colonne de **Superdex™ increase 75 10/30 GL (10x300 mm)**. La phase mobile est constituée d'une solution **tampon d'acétate d'ammonium 0.1M, pH5** et le débit d'élution sont fixés à **0.8 mL/min**. La collection est effectuée par **un collecteur automatique F9-R (GE healthcare life science)**

3.3 Apport de la spectrométrie de masse dans l'identification et caractérisation de venin

À la fin des années 80, la découverte de techniques d'ionisations douces telle que l'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI) et l'électronébulisation (ESI) ont rapidement rendu possible l'analyse par spectrométrie de masse de petites et macromolécules intactes. D'une manière générale, de nombreuses avancées technologiques ont amélioré les trois éléments qui constituent le spectromètre de masse : la source d'ionisation où s'effectuent l'ionisation et la désorption des molécules, l'analyseur où les ions formés sont séparés en fonction de leurs rapports masse sur charges (m/z) et le détecteur permettant de convertir les ions en un signal électrique et ainsi de pouvoir générer le spectre de masse indiquant l'intensité de chacun des ions en fonction de leur rapport m/z .

Dans le cadre de nos travaux, notre venin de frelon asiatique ainsi que ces fractions (peptiques et protéiques) ont été analysés par différentes techniques de spectrométrie de masse allant de la basse résolution (MALDI-TOFMS) à la haute résolution (ESI-QTOF HRMS). Dans ce contexte, le principe de ces dernières et les conditions opératoires mises en place dans cette thèse ont été présentés ci-dessous.

3.3.1 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry

La technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) a été décrite par Franz Hillenkamp, Karas et Tanaka en 1985 [54].

La technique MALDI assure une vaporisation et une ionisation douce et non destructive, de molécules de petites et de grandes tailles. Cette technique d'ionisation est effectuée sous vide (10^{-7} mbar) par irradiation laser pulsée d'une longueur d'onde, en général, comprise entre 180 et 450 nm. Le principe de cette technique sera présenté ci-après.

3.3.1.1 Principe de l'ionisation MALDI

i) Choix de matrice

Lors d'une analyse MALDI, l'analyte est mélangé et co-cristallisé avec une matrice organique de faible poids moléculaire qui doit répondre à certains critères. Cette matrice est capable de:

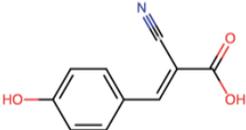
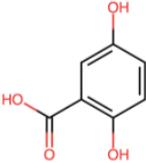
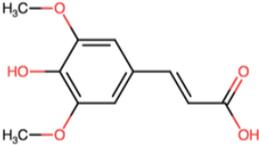
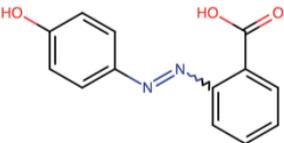
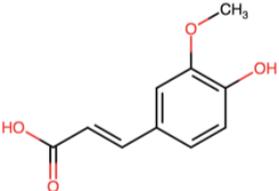
- ✓ Favoriser la séparation des molécules cibles les unes des autres en réduisant les forces intermoléculaires
- ✓ Posséder une solubilité identique aux molécules cibles
- ✓ Absorber à la même longueur d'onde du laser d'ionisation
- ✓ Former de liaisons hydrogènes intermoléculaires pour favoriser les transferts d'énergie au sein de l'échantillon
- ✓ Favoriser l'ionisation en induisant des transferts de protons de la matrice vers les molécules cibles et vice versa (dans le cas de l'ionisation négative)

La matrice doit être présente en large excès en comparaison de molécules cibles (ratio analytes/matrice = 1/1000). Suite à l'évaporation du solvant, un laser à impulsions va irradier le dépôt solide cristallisé avec les analytes. En raison du large excès de matrice, les photons du laser rencontreront statistiquement plus de molécules de matrice que de molécules d'intérêt. Cette matrice aura deux fonctions principales :

- ✓ Protéger les molécules cibles des photons de l'impact laser
- ✓ Aider à ioniser des molécules cibles

Afin d'analyser des molécules d'intérêts, différents types de matrices organiques ont été développés. Le **Tableau II.8** ci-dessous présente des exemples des matrices les plus couramment utilisées [25]:

Tableau II.8 : Exemples de matrices organiques utilisées pour les analyses MALDI avec les longueurs d'onde d'absorption, la masse moléculaire et les applications associées. Tableau extrait de la référence [25] :

Abrév.	Nom	Formules	Longueur d'onde d'absorption	Masse molaire	Application
CHCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique		337,355,266	189.17	Protéines, peptides, sucres, oligonucléotides
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque		337,355,266	154.12	Polymères, molécules organiques, sucres, peptides, protéines
SA	Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique		337,355,266	224.21	Peptides, protéines, dendrimères, glycoprotéines
HABA	Acide 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoïque		337,355	242.23	Peptides, protéines, glycoprotéines
FA	Acide 4-hydroxy, 3-méthoxy cinnamique		337	194.18	Peptides, protéines

Dans le cadre des études menées sur les échantillons de venin brut et des fractions peptidiques, la matrice présentant le meilleur résultat (rapport signal/bruit et homogénéité) a été **la matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)**.

ii) Principe

Le dépôt des échantillons sur une plaque cible MALDI peut être effectué selon trois procédés différents : Goutte séchée (« dried droplet »), Couche mince et Sandwich. La **Figure II.10** résume la méthodologie de chaque méthode.

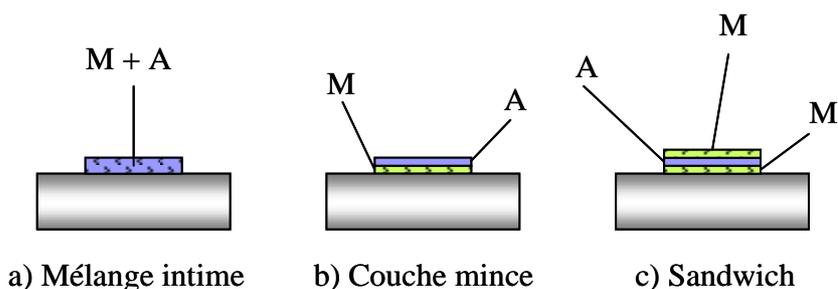


Figure II.10 : Représentation des différents types de dépôts usuels: (a) goutte séchée (b) en couche mince et (c) en sandwich

Une co-cristallisation de la matrice avec l'analyte est formée à la suite de l'étape d'évaporation du solvant. Suite à l'absorption de l'énergie par la matrice, un processus de désorption qui correspond à un changement de phase de la phase condensée vers la phase gazeuse se produit. Pendant cette désorption, une très faible partie de l'énergie désorbée par la matrice est transférée aux molécules cibles. Alors, une coéjection des ions pseudo moléculaires et d'ions fragments provenant pour ces derniers majoritairement de la matrice se produit. Les ions sont ainsi produits par des phénomènes de protonation $[M+H]^+$, déprotonation $[M-H]^-$ et de cationisation ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$)[25]. La **Figure II.11** illustre le procédé d'ionisation MALDI :

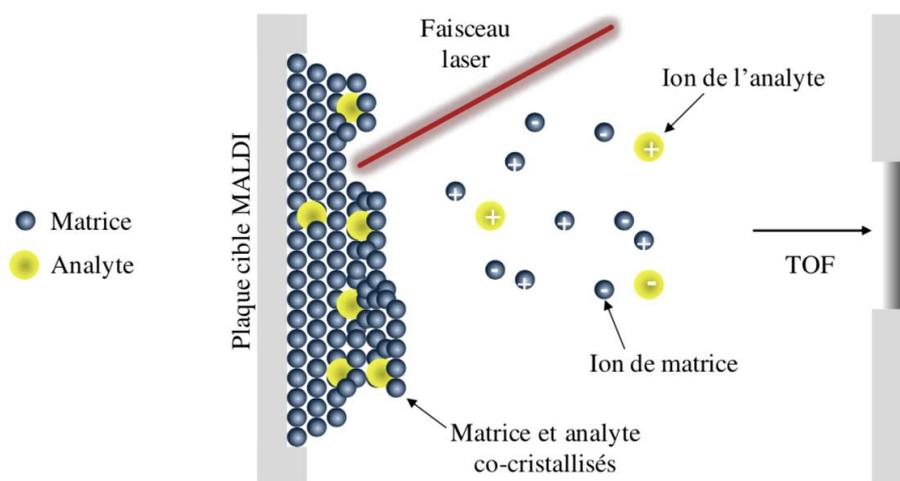


Figure II.11 : Schéma du procédé d'ionisation MALDI : l'énergie laser absorbée par la matrice provoque une désorption/ionisation des analytes. Image extraite de la référence [25]

La source MALDI est couplée à différents analyseurs tels que l'analyseur quadripolaire (Q), l'analyseur à temps de vol (TOF), les analyseurs à transformée de Fourier (FTICR, Orbitrap) et les pièges d'ions (IT).

Dans le cadre de nos travaux de thèse, la source MALDI a été couplée à un analyseur à temps de vol (TOF). Le principe de cet analyseur sera expliqué dans la section suivante.

3.3.1.2 L'analyseur à temps de vol (TOF)

En 1918, Dempster a décrit l'analyseur à temps de vol pour la première fois [55]. Les premiers spectromètres de masse à temps de vol ont été introduits dans les années 1950. L'apparition de la source de désorption/ionisation laser (LDI) puis celle de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) dans les années 1980 ont permis de mettre en évidence son véritable potentiel en tant qu'analyseur.

Les ions générés par la source MALDI sont accélérés et pénètrent dans un tube de vol, à travers une zone libre de champ électrique, maintenue à un vide poussé. Le temps de parcours d'un ion dans le tube de vol est proportionnel à la racine carré du ratio m/z . Les ions seront alors séparés en fonction de leur valeur m/z et donc de leur temps de parcours mis dans le temps de vol avant d'atteindre le détecteur. Les ions vont alors adopter des vitesses « de vol » différentes.

La détection des ions peut être effectuée selon deux modes : le mode linéaire et le mode réflecteur.

✓ **Mode linéaire** : les ions progressent à des vitesses différentes en fonction de leur masse le long d'un parcours linéaire jusqu'au détecteur. Cette configuration est adaptée à l'analyse des macromolécules (protéines) justifiée par son taux de transmission élevé. Néanmoins, la résolution est limitée notamment due à la dispersion initiale des ions (en termes de temps et d'espace) qui va ainsi influencer la distribution temporelle et spatiale et la distribution en énergie cinétique.

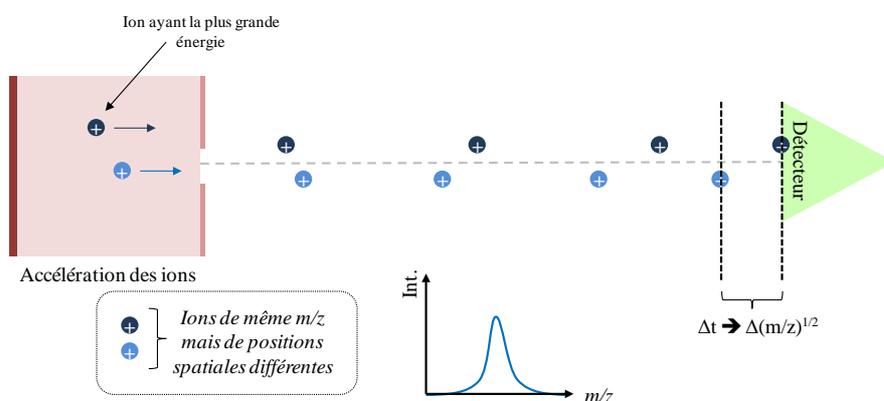


Figure II.12 : Principe de fonctionnement de l'analyseur TOF en mode linéaire. Image extraite de la référence [25]

✓ **Mode réflecteur**: les ions vont atteindre un réflecteur/miroir électrostatique situé à l'extrémité du tube de vol. Ce miroir crée un champ électrique opposé à la progression des ions. Les ions de même masse les plus rapides pénètrent plus profondément dans la zone de champ et donc seront « réfléchis » et réaccélérés plus tardivement par le réflecteur de manière à refocaliser les ions de même valeur m/z vers le détecteur. Ce phénomène permet de refocaliser les ions de même valeur m/z . Ainsi, la résolution de l'analyse augmente. Ce mode sera sélectionné préférentiellement pour l'analyse des petites molécules ($M < 1\text{kDa}$) afin d'avoir une bonne précision en termes de valeur m/z [25].

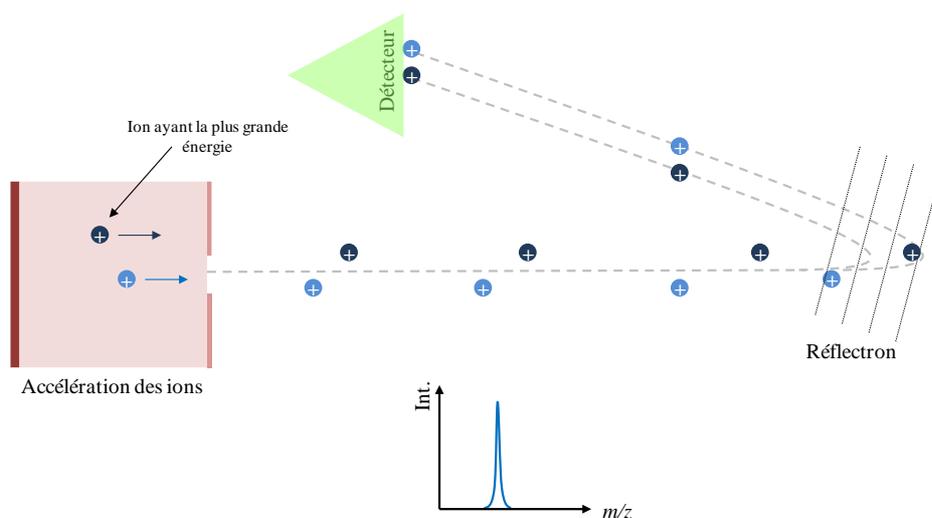


Figure II.13 : Principe de fonctionnement de l'analyseur TOF en mode réflecteur. Image extraite de la référence [25]

Les avantages de ce spectromètre de masse reposent d'une part sur son mode d'ionisation et d'autre part sur l'analyseur. En effet, il est possible d'ioniser des molécules de hautes masses moléculaires de même les ions générés sont principalement des ions monochargés qui permettent d'aboutir à un spectre de masse simple à analyser. De plus s'agissant d'une méthode d'ionisation douce : la fragmentation des ions moléculaires est faible. Nous pouvons également noter que la technique est tolérante vis-à-vis des sels, qui permettent même à favoriser le signal en fournissant des sodiums et des potassiums dans le cadre de la formation d'analytes cationisés. Cette technique est également à même d'étudier des échantillons de faible concentration de l'ordre de la picomole ou de la femtomole et cela sur une large gamme de masse, sachant que cette dernière est théoriquement illimitée.

La technique MALDI-TOF/MS est néanmoins soumise à certaines contraintes à savoir la formation d'adduits et d'ions de matrice limitant les analyses pour les faibles masses. De plus, les

analyses effectuées ne sont pas quantitatives, l'étude d'une solution deux fois plus concentrée ne conduisant pas à l'obtention d'un signal deux fois plus important. La dernière limitation étant liée à l'affinité protonique de nos analytes, selon ce paramètre il est plus ou moins facile de détecter une espèce, cela se traduisant par des suppressions de signal dans le cadre de mélange

Nous avons procédé à l'**optimisation** de notre protocole d'échantillonnage en nous focalisant sur l'**optimisation du choix de la matrice, du milieu de solvation et de la nature de l'échantillon**. Le **Tableau II.9** montre le protocole optimisé de MALDI-TOF utilisé pour analyser le venin de frelon asiatique dans le cadre de cette thèse.

Tableau II.9 : Protocole optimisé pour l'analyse du venin *V. velutina* par MALDI-TOF

Matériels	<ul style="list-style-type: none"> • Solution du venin <10kDa à 0.12-0.5 mg/mL dans l'eau ultra-pure • Matrice : solution saturée de α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) 5 mg/mL dans ACN/H₂O/TFA (50/50/0.1) • Plaque : d'acier poli type MTP 384 (Bruker®).
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> • Dépôt du venin sur la plaque en ratio 1μL : 2μL (analyte : matrice) en goutte séchée • Accumulation de spectre : 2000 shots • Mode d'ionisation positive, mode réflecteur (m/z 500-3500) • Mode automatique : « very low raster »

3.3.1.3 Évaluation du contenu moléculaire du venin brut Vv et des deux fractions inférieures et supérieures à 10 kDa par SDS-PAGE et MALDI-TOF-MS.

Afin de nous assurer que notre méthode d'ultrafiltration utilisant un Cut-off de 10 kDa nous donnait les résultats escomptés en termes d'échantillonnage, nous avons étudié à la fois le venin **brut Vv et les deux fractions inférieure et supérieure à 10 kDa** à la fois par **SDS-PAGE et spectrométrie MALDI-TOF-MS**.

Pour ce qui est de l'étude SDS-PAGE, un échantillon de venin brut (**Vv**) et des deux fractions (**Vv > 10 kDa et Vv < 10 kDa**), d'une concentration égale à 10 mg/mL, ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12%. En parallèle, ces mêmes fractions cette fois-ci rapportées à une concentration de 0.5 mg/mL ont été analysées par MALDI-TOF-MS après avoir été déposées sur la plaque MALDI selon le protocole optimisé mentionné ci-dessus. L'analyse par MALDI-TOF-MS des fractions Vv < 10 kDa et Vv > 10 kDa ont été réalisés en mode linéaire pour une gamme de masse située entre 5 et 20 kDa et entre 15 et 50 kDa et en mode réflecteur pour une gamme de masse comprise entre 600 et 3500

Da. Les résultats obtenus à la fois par chromatographie SDS-PAGE et MALDI-TOF-MS sont présentés sur la **Figure II.14** ci-dessous.

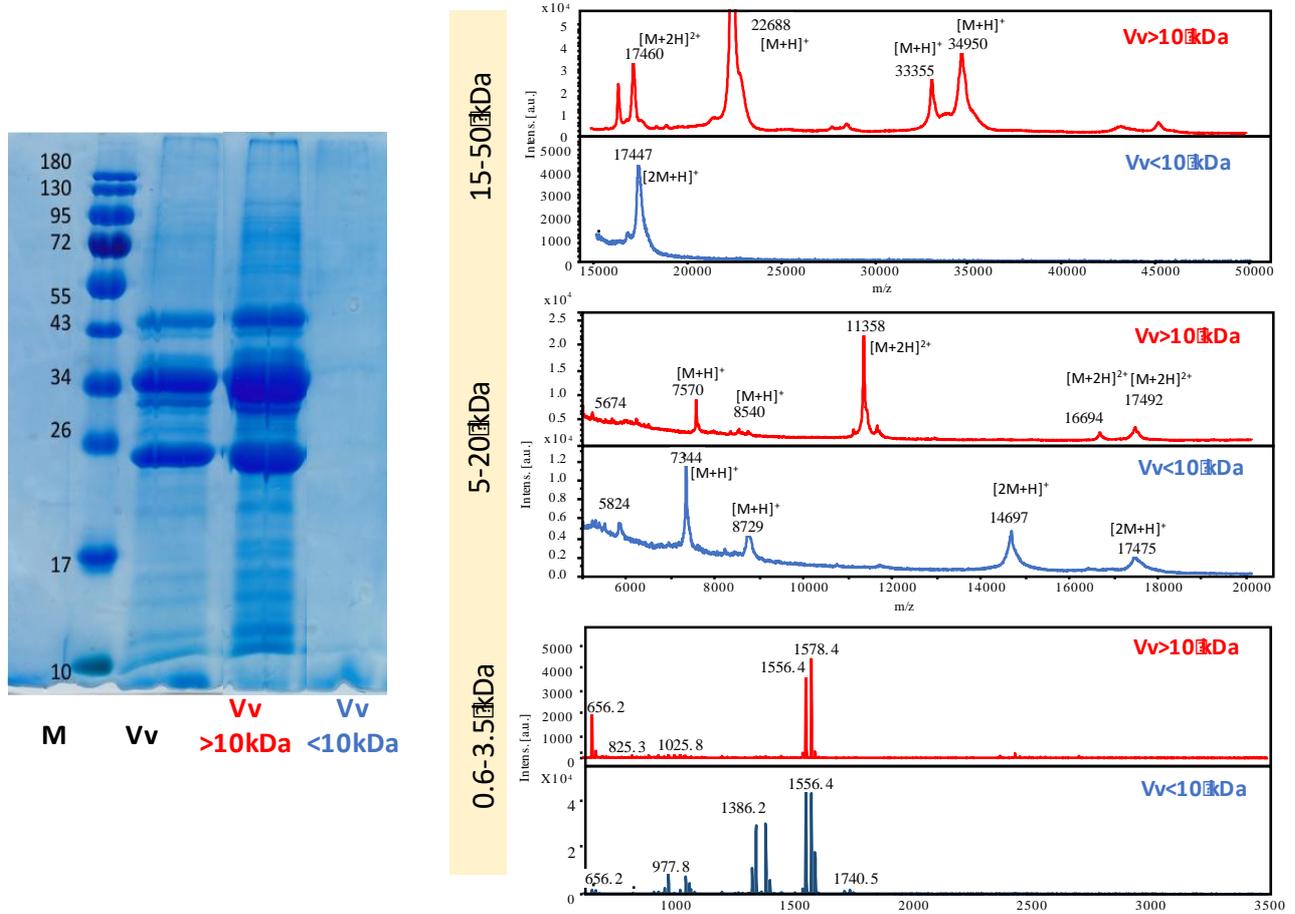


Figure II.14 : Résultats d'analyse du venin brut Vv et des deux fractions Vv < 10 kDa et Vv > 10 kDa par chromatographie SDS-PAGE et spectrométrie MALDI-TOF-MS . M : marqueur étalon (Prestained Protein Ladder 06P-0111)

D'après la **Figure II.14**, sur le gel de SDS-PAGE révélé au Bleu de Coomassie, la **fraction Vv >10 kDa** révèle un ensemble de **molécules similaires à celui trouvé dans le venin brut Vv**, contrairement à la fraction **Vv < 10 kDa** qui ne laisse **apparaître aucune bande**. Cela nous conforte comme quoi notre protocole nous donne les résultats escomptés compte tenu du cut-off utilisé. Il apparaît difficile ici de conclure quant à la présence d'une bande plus marquée à hauteur de 10 kDa pour la fraction Vv < 10 kDa.

Aussi, les analyses effectuées par MALDI-TOF-MS sur cette même fraction Vv < 10 kDa indique une masse maximale égale à 8729 Da. Nous remarquons néanmoins, dans la gamme de masse 5-20 kDa, deux ions à **m/z 14697** et **m/z 17475**. Si l'on se réfère au gel SDS-PAGE concernant cette

fraction Vv < 10 kDa, aucune bande n'est significativement visible dans la zone de masse supérieure de 10 kDa. De plus, l'intensité de ces ions est plus faible par rapport à celle des deux ions ***m/z* 7344 et *m/z* 8729**. Ces deux constats nous permettent de porter une hypothèse selon laquelle **les ions *m/z* 14697 et *m/z* 17475** correspondent aux **ions dimères (2M+H)⁺ des ions *m/z* 7344 et *m/z* 8729** à une précision en masse non optimale près. De plus, cette fraction Vv < 10 kDa révèle la présence de molécule dont la masse s'échelonne entre **656 à 1740 Da** qui peuvent correspondre à la **présence de peptides**. Aussi, l'analyse par MALDI-TOF-MS nous permet également de confirmer comme quoi **l'utilisation de l'ultrafiltration dans nos conditions est efficace**. En ce qui concerne les études faites sur la fraction Vv > 10 kDa, on peut distinguer notamment trois ions à ***m/z* 22688, 33355 et 34950** qui peuvent être reliés aux trois **bandes visibles sur l'analyse SDS-PAGE** de cette même fraction. Il est à noter que l'expérience SDS-PAGE a été réalisée en présence de 1,4 dithiothréitol (DTT) qui tout comme le SDS rompt également toutes les interactions non covalentes avec d'autres protéines et provoque surtout une réduction des ponts disulfures permettant de dissocier les complexes protéiques. Cela nous permet de formuler l'hypothèse comme quoi ces trois bandes correspondent à **trois protéines monomériques** de masse moléculaire **22688, 33355 et 34950 Da**.

Cette observation est confortée avec une quantification de protéine présente dans chaque fraction par un test de Bradford [18]. En effet, la fraction Vv < 10 kDa indique une concentration en protéines (**0,11 ± 0.04 mg/mL**) bien **plus faible** que la fraction Vv > 10 kDa pour laquelle la concentration en protéines est égale à **5.81±0.08 mg/mL**.

Afin d'accéder à une identification précise de la majorité des molécules présentes à la fois dans le venin brut et dans les deux fractions Vv < 10 kDa et Vv > 10 kDa, nous avons mis en place une méthode d'analyse faisant appel à un couplage chromatographie en phase liquide (HPLC) avec un spectromètre de masse haute résolution ESI QTOF-HRMS dont le principe sera détaillé ci-après.

3.3.2 L'ionisation par électrospray (ESI)

3.3.2.1 Source par ionisation électrospray

La source d'ionisation par électronébulisation ou électrospray (ESI) est proposée en 1984 par Masamichi Yamashita et John Fenn [56]. De nos jours, l'ESI est une des sources d'ionisation les plus utilisées en couplage avec la chromatographie en phase liquide pour l'analyse des molécules polaires à moyennement polaires.

Il s'agit d'une technique d'ionisation à pression atmosphérique qui permet de former des ions en phase gazeuse par des mécanismes de désolvatation peu énergétique n'induisant quasiment pas de fragmentation.

La formation des ions se fait sur trois différentes étapes [25]:

- ✓ La formation des gouttelettes chargées à l'extrémité d'un capillaire (formation du spray)
- ✓ Evaporation du solvant et explosions coulombiennes (limite de Rayleigh)
- ✓ Obtention d'ions désolvatés en phase gazeuse.

La formation des gouttelettes chargées à l'extrémité d'un capillaire métallisé se fait sous l'influence d'un champ électrique provoquant une différence de potentiel de 1 à 5 kV, appliqué entre le capillaire et le cône d'échantillonnage (**Figure II.15**). Se forme alors un cône à l'extrémité du capillaire appelé « cône de Taylor ». Des gouttelettes multichargées négativement ou positivement (la charge sera en fonction de la polarité du champ électrique appliqué) sont alors produites. Les gouttelettes se déplacent ensuite sous l'influence du champ électrique intense, mais également sous l'influence d'un gradient de pression créée entre la source et l'entrée du spectromètre de masse. Au cours de ce parcours, les gouttelettes chargées issues du cône de Taylor, au sein de la chambre d'ionisation thermostatée, entrent en collision avec le gaz résiduel (N_2) et subissent une diminution progressive de leur diamètre. De ce fait, les charges se concentrent dans la goutte dont le rayon diminue. Par conséquent, les forces de répulsion coulombiennes augmentent jusqu'à devenir supérieures aux forces de tension de surface. On atteint alors la limite de Rayleigh. Ce phénomène induit une succession d'explosions coulombiennes donnant naissance à des microgouttelettes, voire des nanogouttelettes permettant ainsi la désorption de molécules mono ou multichargées.

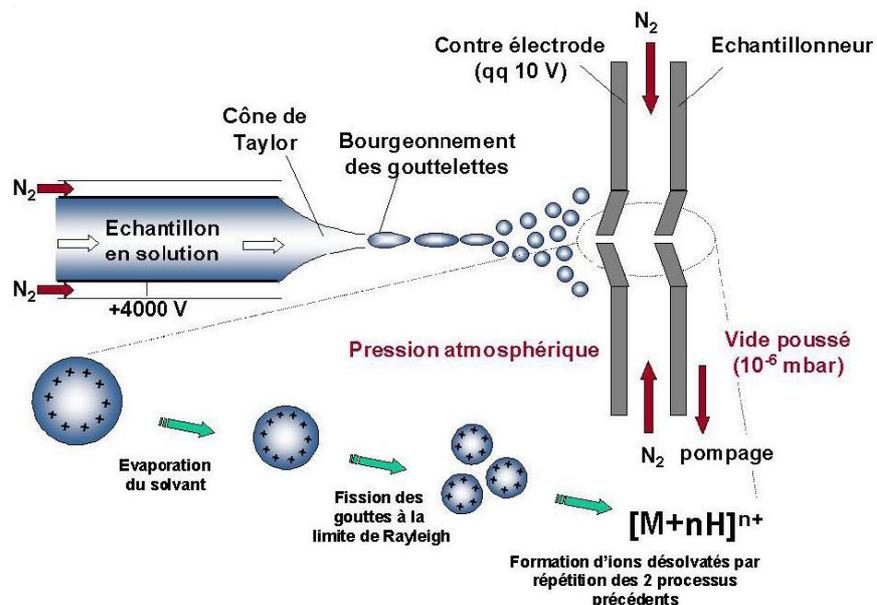


Figure II.15 : Représentation schématique d’une source électronébulisation ou électrospray [57].

Le phénomène de production d’ions désolvatés en phase gazeuse (**Figure II.16**) fait intervenir trois modèles : le modèle de la charge résiduelle (« charged residual model », CRM) de Dole (1968) d’une part qui expliquerait le processus de désorption/ionisation des macromolécules, le modèle de l’évaporation ionique (« ion evaporation model », IEM) d’Iribarne et Thomson (1976) d’autre part qui s’appliquerait plutôt aux molécules de petite taille et le modèle de Fenn (1988) qui est un compromis tenant compte des modèles précédents.

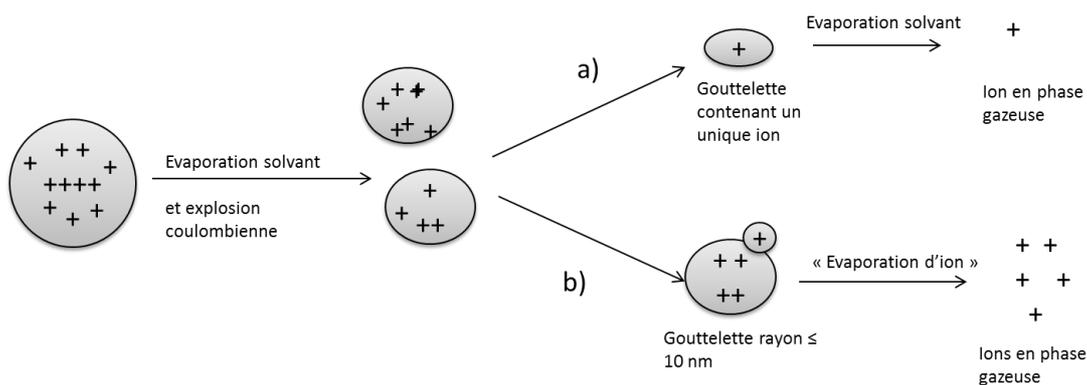


Figure II.16 : Représentation schématique de l’émission des ions [M+nH]ⁿ⁺ en phase gazeuse en ESI d’après (a) Le modèle de Dole et (b) Le modèle d’Iribarne et Thomson [58].

Cette technique d'ionisation ESI à pression atmosphérique présente de nombreux avantages et désavantages, à savoir :

Tableau II.10 : Avantages et désavantages de la technique ESI

Avantages	Désavantages
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bonne adaptation à un couplage avec une chromatographie liquide ✓ Technique très sensible ✓ Permettre l'utilisation de faibles énergies d'ionisation ✓ Permettre l'étude d'interactions non covalentes ✓ Permettre l'observation de molécules intactes ✓ Détection des ions multichargés d'analytes de haute masse > 40 kDa 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Suppressions de signal induit par la présence de sels ✗ La réponse et/ou la quantification de l'analyte peuvent être affectées par la présence d'autres espèces

Ce mode d'ionisation à pression atmosphérique offre de nombreux couplages avec divers analyseurs tels que ceux décrit dans le **Tableau II.11**.

Tableau II.11 : Tableau comparatif des performances de différents analyseurs[59]

Analyseur	Limite en rapport m/z	Résolution (FWHM)
Quadripôle	4000	3000
Piège à ion (2D/3D)	6000	5000
Temps de vol	Illimitée	5000-20 000
Orbitrap	4000	30 000 – 100 000
Résonance cyclotronique	8000	50 000- 10 000 000

D'une manière générale, ils peuvent être définis par ces différents paramètres :

- ✓ **La gamme de rapport m/z** qui correspond aux limites minimales et maximales de m/z au-delà desquelles l'analyseur ne pourra plus mesurer de signal.
- ✓ **Limite de détection** qui correspond à la quantité d'échantillon nécessaire pour détecter un signal significatif dans le spectre de masse (valeur de signal/bruit (S/N) supérieur à 3).

- ✓ **La sensibilité** qui est la réponse du signal pour une quantité donnée d'un composé normalisée sur la quantité de composé produisant cette réponse [60].
- ✓ **La vitesse de balayage** qui est le temps que va mettre l'analyseur à établir un spectre pour une gamme de m/z donnée.
- ✓ **La résolution** qui représente la capacité de l'analyseur à distinguer entre deux composés de m/z voisins, et qui est donnée par $R = m/\delta m$. Une mesure de la résolution pour un ion isolé consiste à prendre sa largeur à x % de son maximum, le plus souvent à mi-hauteur.
- ✓ **La précision** sur la mesure de m/z qui représente la faculté de mesurer une masse la plus proche possible de la masse théorique de la molécule analysée. Cette précision s'exprime le plus souvent en « partie par million » (ppm) [61].

Dans le cadre de nos travaux de thèse, le spectromètre de masse **maXis UHR (Ultra-high resolution)-QTOF (Bruker, Allemagne)**, combiné à une source **electrospray (ESI)**, a été sélectionné afin d'offrir la résolution et l'exactitude en masse nécessaire à une **caractérisation** de molécules inconnues.

Le principe de cet analyseur sera présenté ci-dessous.

3.3.2.2 Le spectromètre de masse maXis UHR-QTOF (Bruker, Germany)

La **Figure II.17** montre le schéma du spectromètre de masse maXis UHR-QTOF (Bruker, Germany) utilisé dans le cadre de cette thèse.

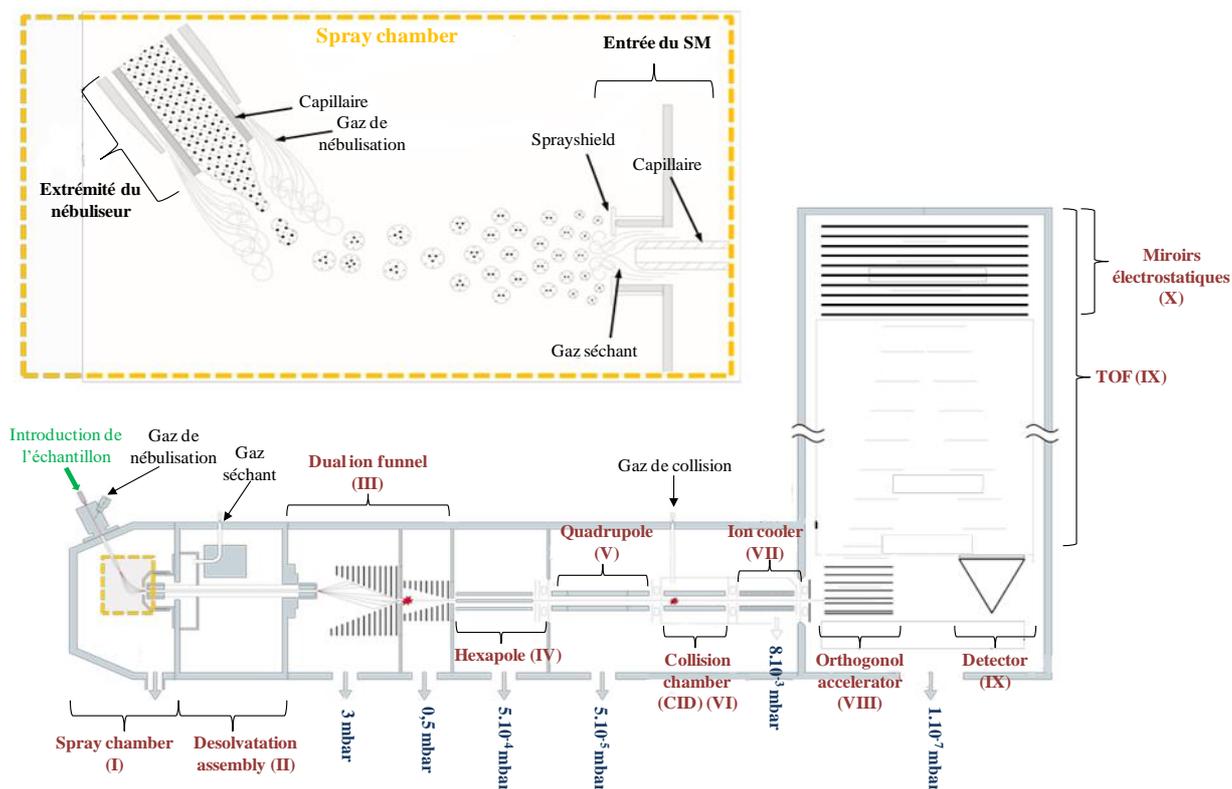


Figure II.17 : Schéma du spectromètre de masse Maxis UHR-QTOF utilisé dans le cadre de nos études [25]

Les différents principaux modules constitutifs (indiqués de **I** à **IX**) du spectromètre de masse utilisé ont été précédemment décrit par notre équipe (thèse du Dr Ferey J. [25]) et sont détaillés ci-dessous :

Après la **chambre de spray (I)**, les ions faiblement solvatés arrivent dans une zone de transfert à travers un capillaire en silice jouant le rôle d'interface entre la zone à pression atmosphérique et la zone suivante de pression plus réduite (**II**). A la fin du capillaire, se positionnent différents skimmers placés à différents potentiels pour créer une différence de potentielle croissante. Une différence de potentiel de dizaine de volts est installée entre la sortie du capillaire et le premier skimmer afin d'achever la désolvatation des ions. Cette légère différence de potentiel augmente la vitesse des ions solvatés permettant ainsi de générer des collisions propices à la désolvatation (**III**). L'ensemble des ions refocalisé par ces skimmers entre ensuite dans l'**hexapôle (IV)**, permettant la transmission des ions sous un gradient de vide.

Les ions entrent ensuite dans le **quadripôle (V)** composé de quatre électrodes parallèles. Ces électrodes sont connectées à une combinaison d'une tension continue (U) de valeur opposée pour

chacune des paires d'électrodes et d'une tension alternative (V) produisant un potentiel $\pm \Phi_0$. En fonction des valeurs de U et de V , le quadripôle peut transmettre l'intégralité des ions en mode « full scan » ou peut filtrer les ions désirés du fait de l'obtention de trajectoires stables (ions désirés) ou instables (ions filtrés). La combinaison de ces deux tensions permet de déterminer les valeurs de m/z (ou la gamme) d'ions d'intérêt.

Ensuite, les ions sont transférés dans un autre quadripôle appelé chambre de **fragmentation CID (VI)** permettant de faire passer les ions en mode « full scan » ou de les fragmenter (mode MS^2). Les ions sont ensuite transférés dans le compartiment nommé « **ion cooler** » (**VII**) qui ralentit les ions avant de les injecter dans un accélérateur orthogonal à l'entrée du temps de vol (**TOF, IX**). Une différence de potentiel est appliquée à la sortie de « l'ion cooler » pour accélérer et injecter les ions dans le temps de vol. Les ions seront séparés en fonction du temps nécessaire pour arriver le **détecteur (IX)**, à travers une zone libre de champ, maintenue à un vide poussé.

Les conditions d'analyses par ESI QTOF (MS ou MS/MS) ont été adaptées à chaque stratégies de criblage (① et ②). Ces derniers seront alors présentés respectivement dans les chapitres résultats (III et IV).

4 Stratégie ciblant l'étude de « sourcing » (discrimination des fractions peptidiques < 10 kDa), leurs interactions Ligand/enzymes et leurs identifications.

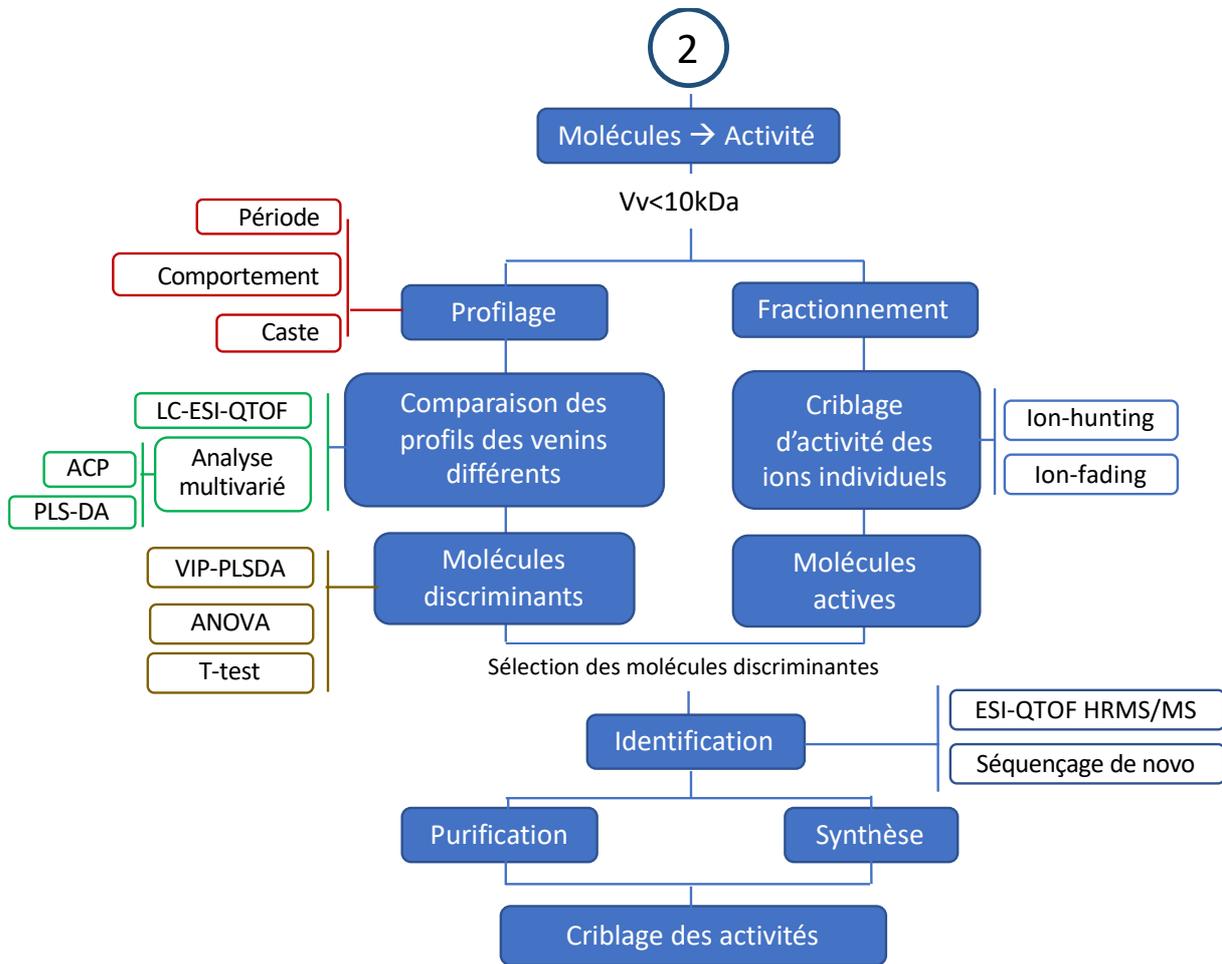


Figure II.18 : Schéma de stratégie ② dirigée vers la détermination de l'activité de molécules discriminantes

Contrairement à la stratégie ① développée précédemment dans la **section 3, chapitre II** et qui avait pour objectif d'identifier la ou les molécules responsables d'une activité, la stratégie ② porte sur la mise en place d'approches analytiques permettant :

- ✓ D'étudier **l'impact du sourcing** sur les profils peptidiques de venin et de dégager un « pool » de molécules discriminantes. Pour ce faire, une étude statistique (PLS-DA, ANOVA, t-test) a alors été engagée. Le principe ainsi que l'apport de cette dernière sera décrit dans la partie ci-dessous (4.1).

- ✓ Parallèlement, une approche de fractionnement par HPLC-UV a été effectuée afin de simplifier le contenu moléculaire de la fraction peptidique ≤ 10 kDa. Une potentielle interaction de

type Ligand/enzyme (de ces peptides isolés) a été par la suite évaluée sur ces sous-fractions par une approche « ion fading » et « ion hunting ».

Ces informations pourront ainsi être convoluées avec celles obtenues lors de l'approche de « sourcing » et émettre une sélection de molécules discriminantes avec un potentiel actif pour la dermacosmétique. Les molécules discriminantes et actives obtenues à partir de deux études précédentes seront alors soumises à l'approche de **séquençage *de novo*** pour caractériser les peptides d'intérêts. Le principe ainsi que l'apport de cette approche de criblage et d'identification seront décrits dans les parties (4.2, 4.3) respectivement.

4.1 Criblage de molécules dicriminantes : Procédure de processing des données et analyse statistique (PCA, PLS-DA)

Les données brutes obtenues à partir des analyses LC-MS de la fraction peptidique du venin de frelon sont rassemblées dans une matrice de données exploitables en statistiques. Plusieurs logiciels disponibles à la fois en accès libre ou sous licence permettent de réaliser divers traitements statistiques de ces données : le logiciel XCMS qui effectue d'abord un filtrage des données pour éliminer le bruit de fond, puis une détection des pics par déconvolution suivie d'un alignement des pics détectés en prenant en compte pour chacune des analyses LC-MS à la fois le temps de rétention de chacun des pics chromatographiques et les rapports m/z des ions correspondants [62], le programme Mzmine permet de détecter les pics et d'aligner les chromatogrammes [63], le logiciel MetaboScape (Bruker Daltonik) permettant l'annotation des composés inconnus et l'identification des métabolites connus grâce à l'utilisation d'informations précises et à haute résolution (précision en masse, distribution isotopique, fragmentation MS/MS). Dans le cadre de nos études, la plateforme gratuite sur l'environnement de Galaxy via le site de workflow4metabolomic.com établi sur le package de XCMS a été utilisée pour exploiter les matrices de données établies à partir des analyses LC-MS, selon les différentes étapes résumées dans la **Figure II.19**.

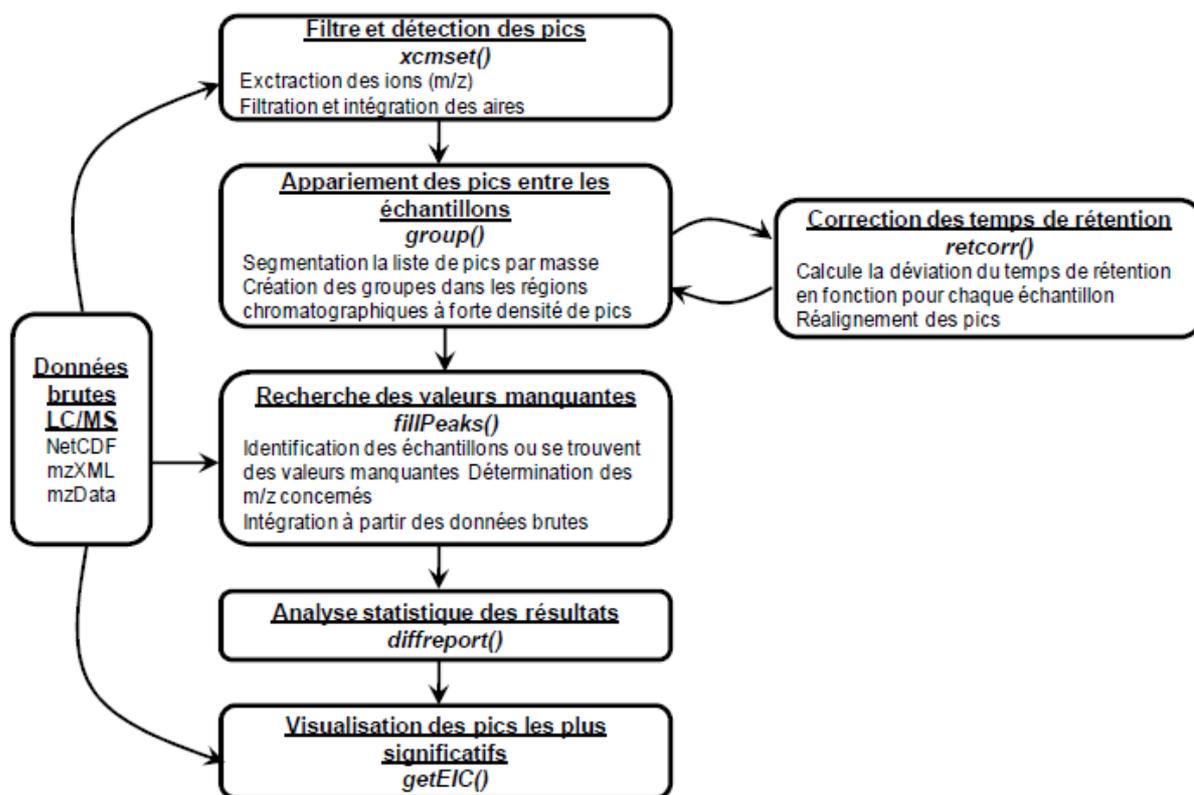


Figure II.19 : Résumé des différentes étapes d'itération XCMS (d'après Smith et al. [62])

En final, une matrice est éditée dans laquelle, les colonnes correspondent à un ion caractérisé par un rapport masse sur charge m/z et un temps de rétention RT, et les lignes, reflètent l'intensité d'aire de pic chromatographique, et ce pour chaque analyse.

Le nombre de données obtenues à partir de l'analyse en MS est très grand. De plus, l'intravariation présente au sein des échantillons biologiques n'est pas négligeable, l'utilisation d'un grand nombre d'échantillons est donc conseillée afin d'atteindre une confiance suffisante pour investiguer la variation biologique. Dans ce contexte, le recours aux statistiques multidimensionnelles permettra d'organiser et de visualiser les données d'analyses. Les données sont ainsi projetées sur un espace de dimensions réduites qui permet alors une visualisation aisée de ces dites données. Il existe diverses méthodes d'analyses statistiques dont la normalisation, les analyses statistiques descriptives ou explicatives [64].

Parmi celles-ci, trois d'entre elles ont été employées dans notre étude :

✓ **Analyses univariées** : Ce modèle statistique compare les ions de manière indépendante. Cette méthode statistique inclut la comparaison d'une variable entre plusieurs échantillons. Ces tests statistiques fonctionnent tous sur le même principe qui consiste à énoncer une hypothèse

nulle (noté H_0) et une hypothèse alternative (H_1), définir deux risques d'erreurs liés au choix de H_1 (noté α) et de H_0 (noté β), calculer une valeur notée p et prendre une décision à partir de la p -value. La p -value associée exprime la probabilité pour obtenir par hasard le résultat observé si le facteur n'a pas d'effet (ou si les deux échantillons sont issus de la même population). Le calcul de la valeur p (p -value) peut ainsi permettre par exemple de déterminer la discrimination significative d'union avec un facteur de variation (p -value < 0.05) : c'est le cas pour **les tests « t-test » de Student ou ANOVA pour « ANalysis Of Variance »**.

✓ **Analyses multivariées descriptives** : telle que l'analyse en composantes principales (**PCA**), qui ne nécessitent pas d'information « a priori » sur la nature des échantillons. L'PCA est une analyse factorielle, en ce sens qu'elle produit des facteurs (ou axes principaux) qui sont des *combinaisons linéaires* des *variables* initiales, hiérarchisées et indépendantes les unes des autres. L'PCA résulte une représentation graphique de données (nuage de point) par rapport à ces facteurs ou composantes principaux sous forme d'axes. Ces axes ou composantes principales résument au mieux l'ensemble des variables initiales. Les objectifs de la statistique descriptive (ou exploratoire) sont les suivants : i) résumer, synthétiser l'information contenue dans la série statistique, mettre en évidence ses propriétés ; ii) suggérer des hypothèses relatives à la population dont est issu l'échantillon.

✓ **Analyses multivariées explicatives** : parmi lesquelles trouve-t-on la régression « classique », dite des moindres carrés (ou « OLS » (Ordinary Least Squares)), ainsi que la régression PLS (Partial Least Square ou Projection to Latent Structure) et l'analyse discriminante PLS (**PLS-DA pour Partial Least Square Discriminant Analysis**). Ces analyses multivariées explicatives visent à expliquer une ou plusieurs réponses à partir d'un jeu de données analytiques. L'objectif de la PLS-DA par exemple est de construire un modèle qui permet de maximiser la séparation entre les classes auxquelles appartiennent les échantillons. Par conséquent, ce modèle permet d'identifier les métabolites dont l'intensité est caractéristique d'un état biologique donné. Ces métabolites contribuent à la formation des différents groupes formés par les échantillons. Ce modèle construit à partir d'un jeu de données initiales peut également être utilisé pour expliquer un nouveau jeu de données qui est capable de prédire la classe d'appartenance des individus du nouveau jeu de données [65].

Dans ce contexte, les données obtenues sur notre effet « sourcing » peuvent être, **dans un premier temps**, analysées à l'aide de l'analyse multivariée descriptive **PCA** pour visualiser la répartition spontanée des échantillons dans un espace à deux dimensions. **Dans un second temps**, des analyses statistiques supervisées **PLS-DA** peuvent être appliquées au jeu de données afin d'affiner les résultats et de déterminer quelles **variables contribuent à la discrimination** entre les groupes pour chaque facteur (période de collecte, comportement et castes).

4.2 Criblage d'interactions ligands/enzymes par spectrométrie de masse ESI-QTOF-HRMS

Il existe de nombreuses approches relatives à l'étude d'interactions entre des molécules cibles (substrat et/ou inhibiteur) et différentes enzymes d'intérêts. Dans le cas de l'analyse de mélanges ou d'extraits complexes **tels que le venin de frelon asiatique**, la spectrométrie de masse présente l'avantage d'une détection **rapide, sensible, précise et spécifique** et par conséquent, d'un suivi simultané de différentes molécules d'intérêts. Cette spécificité de détection offre la possibilité de s'abstenir d'une séparation chromatographique en amont [25]. Une approche de criblage d'interactions enzymes-ligands, a été développée en 2014 au sein de l'équipe analytique de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), approches basées sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS [66].

Cette méthodologie se base sur l'immobilisation de l'enzyme sur un support solide magnétique compatible avec le mode d'ionisation SALDI (Surface Assisted Laser Desorption/Ionization). Cette immobilisation sur bille de silice en core shell magnétique consiste en une liaison covalente entre les groupements terminaux ϵ -amino de résidu lysine de la protéine et la bille de silice via un bras espaceur, le glutaraldéhyde (GLA). Pour cela, les billes de silice initiales sont premièrement activées avec l'agent (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES). Le glutaraldéhyde est deuxièmement additionné à travers une réaction d'addition nucléophile entre le groupement amine du siloxane et le groupement aldéhyde du glutaraldéhyde. Finalement, grâce à des réactions entre les groupements ϵ -amino des résidus lysine et le deuxième groupement aldéhyde du glutaraldéhyde, l'enzyme est immobilisée sur les billes de support. Cette voie d'immobilisation est schématisée sur la **Figure II.20**.

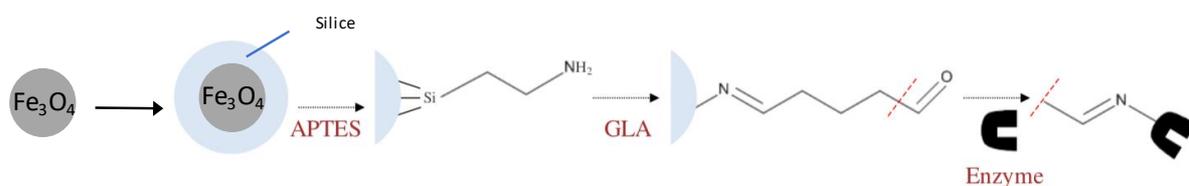


Figure II.20 : Stratégie d'immobilisation covalente des enzymes sur bille de silice. Image inspirée de la référence [67]

Cette approche de criblage peut être réalisée selon deux modes :

- **Mode direct** : ce protocole consiste à mélanger la solution d'étude avec l'enzyme cible, dans un tampon compatible au système biologique. Ensuite, une matrice organique MALDI est ajoutée dans le mélange. La solution est puis déposée sur plaque et analysée. Les inhibiteurs sont détectés par extinction de signal (**Ion Fading**).
- **Mode indirect** : la cible biologique est immobilisée sur un support solide. Ainsi, après isolement de l'enzyme du reste du mélange, il y a une extinction de signal de la molécule d'intérêt (Ion Fading). Par ailleurs, une augmentation du signal correspondant au pic de l'inhibiteur peut être détectée après dénaturation de l'enzyme qui permet de libérer l'inhibiteur (**Ion Hunting**).

Une première méthodologie consiste à déposer les échantillons d'intérêt sur un support MALDI en contact des solutions d'enzymes actives et dénaturées immobilisées sur billes magnétiques. La réaction est initiée in-situ sur la plaque lors de l'étape d'évaporation de la solution. Les spots secs peuvent être directement analysés par MALDI TOF-MS et le support d'immobilisation agissent comme la matrice solide. Cette technique d'analyse, développée au sein de l'équipe analytique de l'Institut de Chimie organique et Analytique (ICOA) permet de détecter une baisse d'intensité de l'ion inhibiteur *via* le principe « d'ion Fading ». Cette technique porte le nom de ENALDI-MS pour Enzyme-coupled Nanoparticles-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry [25] (**Figure II.21**) .

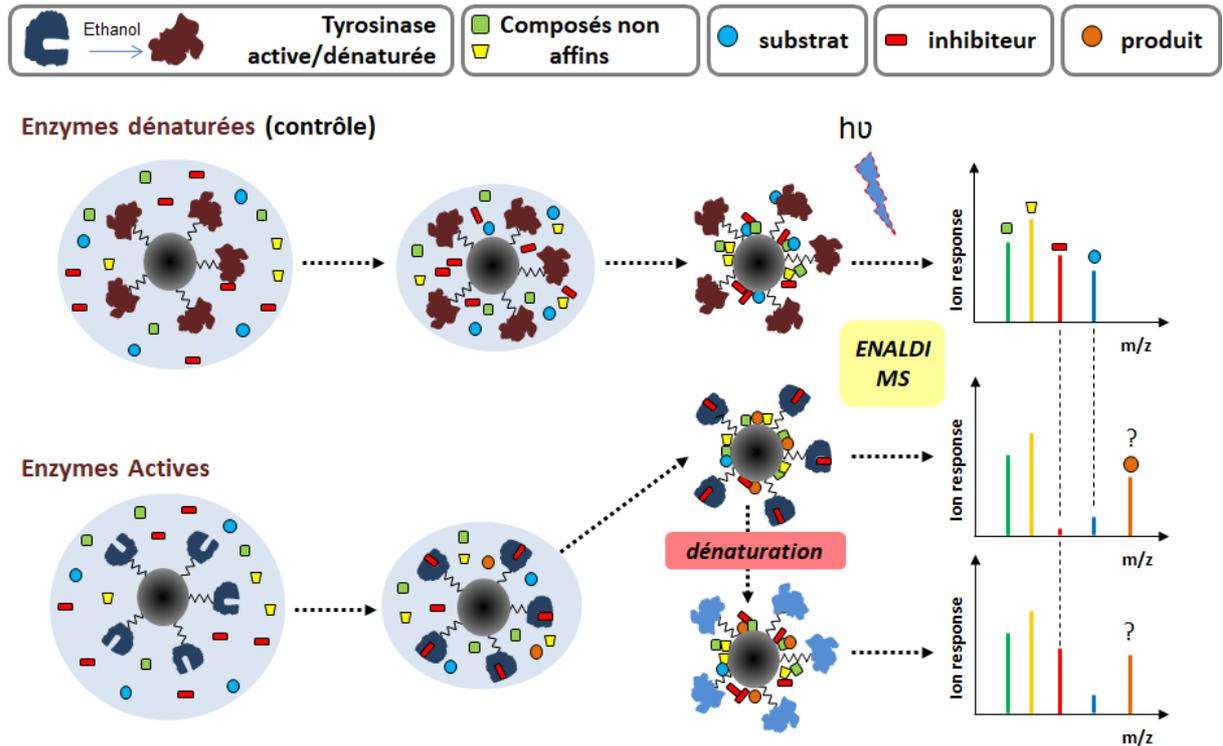


Figure II.21 : Illustration du principe ENALDI (Enzyme-coupled Nanoparticles-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry)

Une approche similaire en mode « Ion Fading » ou « Ion Hunting » peut être mise en place non plus directement déposées sur une plaque MALDI, mais en solution dans un vial en présence du cocktail moléculaire à cribler (**Figure II.22**). C’est cette approche qui a été sélectionnée dans le cadre de notre thèse.

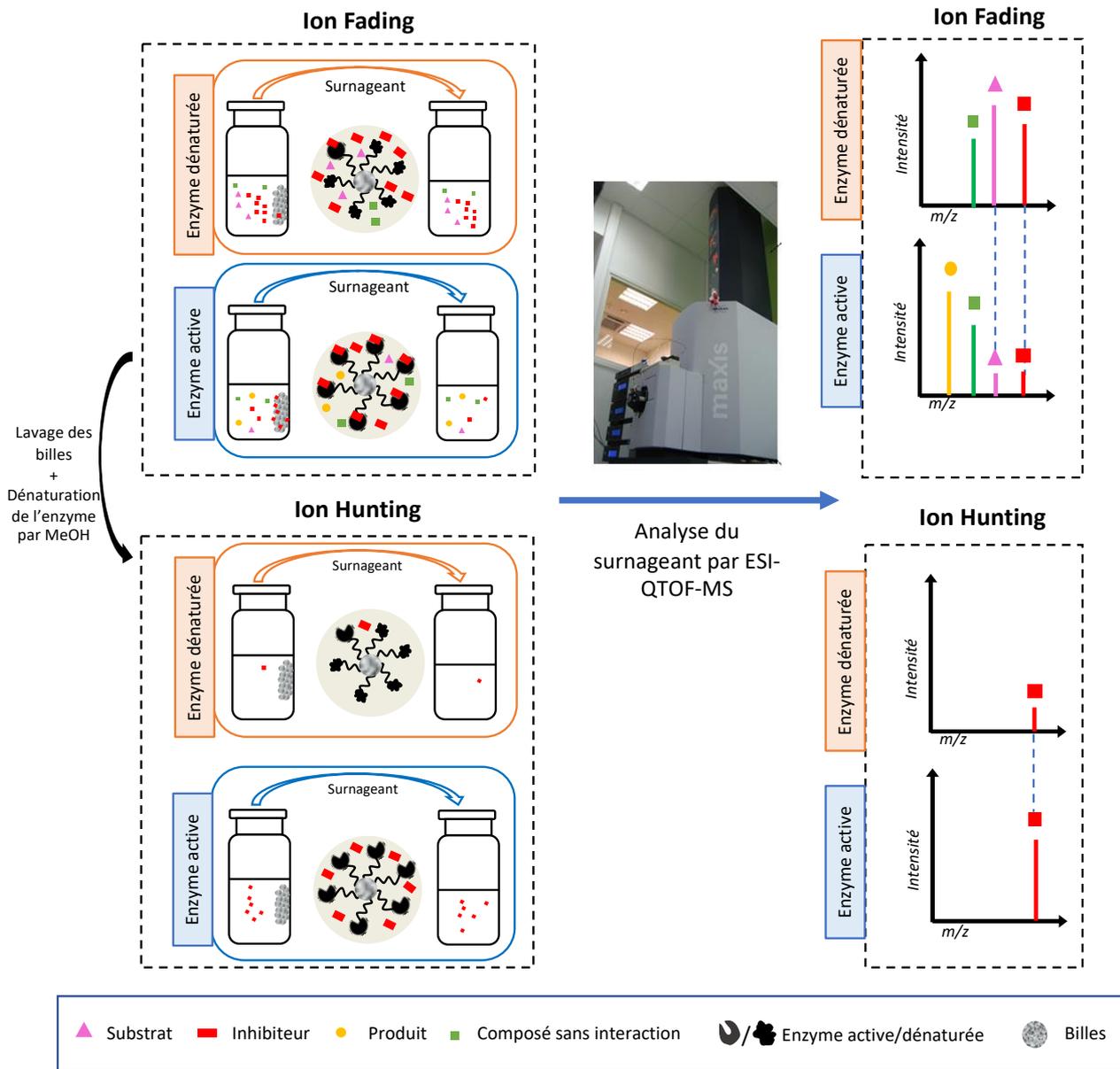


Figure II.22 : Illustration du mode « Ion Hunting » en utilisant la spectrométrie de masse ESI-QTOF-MS

Une troisième méthode permettant d'obtenir le classement simultané des inhibiteurs présent dans un mélange complexe en fonction de leurs affinités avec la cible biologique consiste à utiliser une phase stationnaire à base de silice comme support solide d'immobilisation des enzymes dans le cadre d'analyses par chromatographie d'affinité frontale (FAC) [67].

Dans le cadre de notre projet, nous avons procédé à l'immobilisation de deux enzymes, la **tyrosinase et l'élastase**, sur billes magnétiques afin de procéder à des études selon les deux modes « Ion Fading » et « Ion Hunting » en utilisant l'analyse par spectromètre de masse ESI-QTOF/MS. Les

protocoles d'immobilisation des enzymes et les résultats obtenus seront explicités et discutés dans le **chapitre IV**.

Afin d'évaluer le potentiel de ces molécules discriminantes en tant que molécules bioactives pour la dermacosmétique, la caractérisation de la séquence primaire de ces molécules est indispensable. C'est pourquoi une approche de **séquençage *de novo*** a été initiée.

4.3 Stratégies de caractérisation des structures primaires des peptides par spectrométrie de masse

L'étude analytique préférentiellement employée pour l'identification des peptides et protéines présentes dans le venin fait appel aux approches modernes de protéomiques. De nos jours, la spectrométrie de masse en tandem est devenue une technique incontournable en protéomique. Celle-ci permet d'apporter des données complémentaires lors de l'identification des protéines à travers la détermination de la séquence d'acides aminés des peptides analysés. En effet, les différents modes de fragmentations donnent accès à une information plus spécifique sur l'enchaînement de la séquence des acides aminés de la protéine à identifier et donc plus fiable pour l'identification qu'une simple information massique en mode MS. Une grande variété de mode de fragmentation, associée aux différents analyseurs, peut être utilisée dans le cadre d'une approche protéomique. Il existe plusieurs modes de fragmentations : CID (« Collision-Induced Dissociation »), ETD (« Electron-Transfert Dissociation ») sur trappe ionique ; SORI-CID (« Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-Induced Dissociation »), IRMPD (« InfraRed MultiPhoton Dissociation »), ECD (« Electron-Capture Dissociation ») sur FTICR ; LIFT sur TOF-TOF ; PSD (« Post-Source Decay ») sur TOF. En fonction du mode de fragmentation sélectionné et des instruments utilisés, les ions fragments obtenus peuvent être différents [68].

Dans le cas des études protéomiques, des données expérimentales sont comparées aux listes de masses théoriques obtenues *in silico* de l'ensemble des séquences protéiques contenues dans des banques de données dont il en existe deux types :

- i) les banques généralistes de dépôt (en anglais « sequence repositories », telle que GenPept, produites par NCBI « National Center for Biotechnology Information »
- ii) les banques de séquences corrigées, telles que SwissProt, produites par le consortium UniProt « Universal Protéin Resource ».

L'apparition des moteurs de recherche et de banques de données a donné naissance à de nombreuses stratégies d'identification des protéines. À l'heure actuelle, deux stratégies d'identification des protéines sont utilisées en protéomique : (i) la stratégie dite « Top-Down » ou descendante qui est basée sur l'analyse de protéines intactes (encore difficilement utilisable en routine), (ii) la stratégie dite « Bottom-Up » ou montante qui est réalisée à partir d'une digestion enzymatique du peptide ou de la protéine.

L'approche dite « Bottom-Up » ou montante nécessite l'analyse de protéines par différentes techniques de spectrométrie de masse (MS et MS/MS). Les résultats obtenus par ces deux techniques peuvent alors être soumis selon trois approches d'identification :

- i) identification d'empreinte peptidique massique (Peptide Mass Fingerprint PMF)
- ii) identification d'empreinte de fragments peptidiques (Peptide Fragment Fingerprint PFF).
- iii) Le **séquençage de novo**, processus par lequel la séquence de l'acide aminé est déduite sans connaissance préalable de l'ADN ou de la séquence protéique.

Dans notre projet, nous avons privilégié l'**approche de novo** étant donné que nous n'avons pas pu avoir recours à des banques de données dans lesquels le génome du frelon asiatique était connu.

L'approche *de novo* s'appuie sur des logiciels qui recherchent les similarités entre séquences, logiciels conçus pour accepter des variations telles des substitutions, insertions ou encore délétion d'acides aminés. Ainsi, l'approche *de novo* permet de repérer dans les banques de données des séquences en acides aminés non totalement identiques, mais présentant des analogies avec la séquence déduite du spectre MS/MS.

Dans le cadre de notre étude, nous avons recours, pour la détermination de la séquence d'acides aminés des peptides issus du venin de frelon, à une nomenclature pour la fragmentation de peptides proposée par P. Roepstorff et J. Fohlman en 1984 [69] dont est utilisée maintenant une version plus complète et simplifiée développée par Biemann en 1988 [70] (**Figure II.23**)

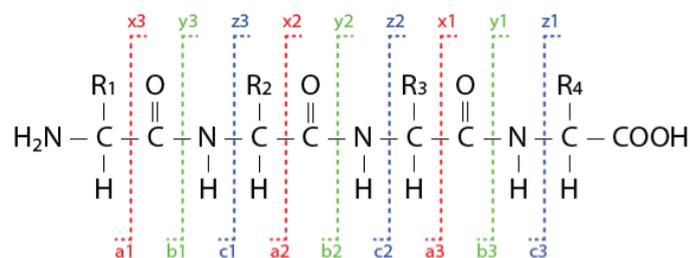


Figure II.23 : Nomenclature de fragmentation d'un tripeptide d'après Biemann (fragmentation basse énergie)[71]

Les ions positifs portant l'extrémité N-terminal sont nommés avec les lettres a_i , b_i , c_i alors que ceux positionnés en C-terminal, sont affublés des lettres x_i , y_i , z_i [72]. Dans la fragmentation basse énergie, les ions « b » et « y » sont ceux qui sont plus couramment générés [73]. La présence des ions « a » est utilisée fréquemment pour confirmer la masse de l'ion « b » dont la différence ($b-a$) est 28 Da correspondant à la fonction carbonyle C=O. La différence de masse entre deux ions consécutifs « b » ou « y » est, quant à elle égale exactement à la masse d'un acide aminé. À partir des différences de masse entre des ions consécutifs d'une même série, il est possible de déterminer l'identité des acides aminés consécutifs et d'en déduire par la même occasion la séquence du peptide. D'autres fragmentations, résultant de la perte de molécules neutres ($-NH_3$ ou $-H_2O$), sont souvent observées et dépendent de la nature des acides aminés présents dans le peptide.

Cependant, il existe une exception à la règle où il est très difficile de déterminer l'identité de l'acide aminé. Il s'agit d'acides aminés isobares : la Leucine/Isoleucine qui sont isomères et la Glutamine/Lysine dont la différence n'est que de 0.036 Da.

De plus, la fragmentation a lieu parfois de manière aléatoire ayant pour conséquence une série d'ions b ou y non continue. Dans ce cas, le recours à la relation ci-dessous permet de déduire la masse de l'ion b correspondant à la formation de l'ion y détecté :

$$[M+H]^+ - y_i + 1 = b_{n-i}$$

Un tutoriel détaillé pour le séquençage *de novo* est proposé qui est basé sur le cours de professeur Donald F. Hunt de l'université de Virginia en 1992 [74].

Ce type d'approche consiste à générer toutes les combinaisons possibles d'acides aminés à partir d'une masse connue du peptide analysé et donc à créer une liste de tous les peptides possibles. Un spectre théorique est généré pour chacun de ces peptides. Les spectres théoriques sont ensuite comparés aux expérimentaux avec une méthode similaire que dans une approche PFF [75]. Néanmoins, cette méthode peut induire l'explosion combinatoire du nombre de peptides artificiels générés. Ainsi, différentes méthodes basées sur ce type d'approche existent, ayant de différentes manières pour limiter l'impact de l'explosion combinatoire [76].

Récemment, un ensemble de logiciels permettent de pratiquer le séquençage *de novo*, tels que PEAKS Studio X [77], Luterfisk [78], PepNovo[79], EigenMS[80], Biotools[81]. Parmi elles, on peut

désigner la méthodologie de logiciel PEAKS par Mal et al. en 2003 [77]. Cette méthode fonctionne en deux étapes :

- ✓ En premier temps, une méthode de programmation dynamique est utilisée pour créer les meilleurs peptides candidats. Pendant cette étape, le score utilisé tient compte d'assez peu d'informations (abondance des ions a, b, c, x, y ainsi que des pertes de H₂O ou de NH₃).
- ✓ Puis, les candidats générés sont réévalués en utilisant un critère de score plus performant, qui utilise une tolérance de masse plus stricte et considère la présence d'autres types d'ions. Cette méthode a pour particularité de donner un score de confiance pour chaque acide aminé en plus de celui donné à la séquence complète.

À noter qu'il faut un spectre de bonne qualité pour que la méthode *de novo* peut correctement déduire une séquence à partir d'un spectre. Des spectres partiels ou avec des défauts (bruit) ne génèrent que rarement des résultats satisfaisants. Par exemple, l'absence de certains pics ou la forte présence de bruit peuvent se produire les difficultés lors de chercher d'un intervalle correspondant à la masse d'un acide aminé. La limite de l'interprétation est ainsi liée à la qualité des spectres qui est représentée par le ratio signal / bruit (le signal : l'information utile le bruit : toute l'information non désirée qui va perturber l'interprétation) [75].

Il faut alors garder à l'esprit qu'il existe des acides aminés propices à des modifications chimiques et plus particulièrement aux oxydations. Par exemple, les méthionines peuvent incorporer un atome d'oxygène au niveau du soufre afin de donner une méthionine sulfoxyde. Les tryptophanes peuvent également être oxydés. Certains peptides peuvent faire l'objet de modifications post traductionnelles peuvent se produire et compliquer d'autant plus le séquençage *de novo*. En effet, lorsque le peptide contient une sérine, une thréonine et une tyrosine car ces trois résidus peuvent être phosphorylés. De même, la sérine et la thréonine peuvent être glycosylées. Il en est de même un peptide pour lequel l'acide aminé suivant l'extrémité C-terminale est une lysine ou une arginine car la succession de deux sites de clivages augmente le risque de rater une étape hydrolyse [82].

De plus, les peptides cycliques potentiellement présents dans le venin induisent la complexité dans l'interprétation de spectre de masse. La masse moléculaire des peptides cycliques peut être déterminée comme dans le cas des peptides linéaires par l'observation des ions quasi-moléculaires [M+H]⁺, [M+Na]⁺ et [M+K]⁺ sous ionisation ESI. Néanmoins, le séquençage des peptides cycliques par MS/MS est très délicat parce que la protonation se fait aléatoirement sur tous les azotes de la

molécule conduisant les multiples possibilités de rupture du peptide durant la collision. En général, le cyclopeptide se linéarise préalablement pour former autant de peptides linéaires comportant d'acides aminés. Puis chacun des peptides linéaires formés se fragmente à son tour pour former des séries d'ions b_n , a_n et y_{m-n} . Ainsi, avec la superposition de l'ensemble des fragmentations, l'interprétation des spectres devient très difficile voire impossible [83].

Dans le cadre de nos recherches, afin de caractériser la séquence des peptides d'intérêt à partir de venin *V. velutina*, nous avons mis en place une stratégie de séquençage *de novo* en utilisant le logiciel **PEAKS Studio X** (version d'essai) et **Biotoools 3.2**.

Conclusion

Ce chapitre a permis de dresser le panorama des différentes stratégies, techniques et méthodologies qui seront appliquées au cours de notre étude. Parmi celles-ci, nous retrouvons les approches chromatographiques type SDS-PAGE et Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) pour ce qui concerne l'étude préalable des lots de venins bruts et le fractionnement des ces derniers en deux fractions distinctes **Vv < 10 kDa** et **Vv > 10 kDa**. Des méthodes d'analyses de statistique ainsi qu'une approche originale de criblage par « Ion Fading » et « Ion Hunting » faisant appel à la spectrométrie de masse ESI-QTOF/MS ont été appliquée dans le cadre de la valorisation du venin de frelon asiatique. Enfin, nous avons dans ce chapitre abordé une méthode de séquençage appelée *de novo* qui sera utilisée pour accéder à la séquence en acides aminés des peptides d'intérêt cosmétique.

Afin de valoriser ces activités potentielles en cosmétique du venin de frelon asiatique, nous emploierons dans un premier temps une stratégie de criblage rapide basée sur les activités du venin brut (**Vv**) et ses fractions partielles (**Vv < 10 kDa** et **Vv > 10 kDa**). Les différents résultats obtenus via cette stratégie seront présentés et discutés dans le **chapitre III**. Dans un second temps, une deuxième stratégie a été mise en œuvre afin de cibler et sélectionner des molécules d'intérêt (Hits) vis-à-vis d'allégations cosmétiques. Le **chapitre IV** rassemblera les résultats commentés et discutés issus de cette seconde stratégie.

Référence

- [1] N. B. Dias, B. M. de Souza, P. C. Gomes, and M. S. Palma, "Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): a comparison of the intra- and inter-colony compositions," *Peptides*, vol. 51, pp. 122–130, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.029.
- [2] N. Peiren, F. Vanrobaeys, D. C. de Graaf, B. Devreese, J. Van Beeumen, and F. J. Jacobs, "The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1752, no. 1, pp. 1–5, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.07.017.
- [3] N. Sookrung *et al.*, "Proteome and allergenome of Asian wasp, *Vespa affinis*, venom and IgE reactivity of the venom components," *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 1336–1344, Mar. 2014, doi: 10.1021/pr4009139.
- [4] S. M. Han, K. K. Park, Y. M. Nicholls, N. Macfarlane, and G. Duncan, "Effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom on keratinocyte migration in vitro," *Pharmacogn Mag*, vol. 9, no. 35, pp. 220–226, 2013, doi: 10.4103/0973-1296.113271.
- [5] Z. Liu *et al.*, "Deciphering the venom transcriptome of killer-wasp *Vespa velutina*," *Sci Rep*, vol. 5, p. 9454, Apr. 2015, doi: 10.1038/srep09454.
- [6] S. An *et al.*, "Purification and Characterization of Two New Allergens from the Venom of *Vespa magnifica*," *PLOS ONE*, vol. 7, no. 2, p. e31920, Feb. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031920.
- [7] N. C. Bhagavathula, M. Kumar, and C. Krishnappa, "A simple non-invasive technique for venom milking from a solitary wasp *Delta conoideum* Gmelin (Hymenoptera: Vespidae)," *Toxicon*, vol. 109, pp. 4–6, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.10.023.
- [8] L. D. Deyrup and R. W. Matthews, "A simple technique for milking the venom of a small parasitic wasp, *Melittobia digitata* (Hymenoptera: Eulophidae)," *Toxicon*, vol. 42, no. 2, pp. 217–218, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0041-0101(03)00132-6.
- [9] S. P. Gawade, "The effect of venom from the Indian tropical wasp *Vespa tropica* on nerve - muscle preparations from *Drosophila* larvae," *Toxicon*, vol. 21, no. 6, pp. 882–886, Jan. 1983, doi: 10.1016/0041-0101(83)90078-8.
- [10] U. Mueller *et al.*, "Comparison of biochemical and immunologic properties of venoms from four hornet species," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 67, no. 4, pp. 290–298, Apr. 1981, doi: 10.1016/0091-6749(81)90024-5.
- [11] L. D. dos Santos *et al.*, "Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*," *Proteomics*, vol. 11, no. 8, pp. 1403–1412, Apr. 2011, doi: 10.1002/pmic.201000414.
- [12] M. Handral and S. Gawade, "Evaluation of effects of photooxidized *Vespa orientalis* venom on memory and learning in rats," *J. venom. anim. toxins incl. trop. dis*, vol. 14, pp. 422–429, Jan. 2011, doi: 10.1590/S1678-91992011000400009.
- [13] J. Jalaei, M. Fazeli, H. Rajaian, and S. S. Shekarfroush, "In vitro antibacterial effect of wasp (*Vespa orientalis*) venom," *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*, vol. 20, p. 22, May 2014, doi: 10.1186/1678-9199-20-22.
- [14] P. Rungsa *et al.*, "Cloning, structural modelling and characterization of VesT2s, a wasp venom hyaluronidase (HAase) from *Vespa tropica*," *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*, vol. 22, no. 1, Oct. 2016, Accessed: Sep. 21, 2019. [Online]. Available: <https://link.galegroup.com/apps/doc/A467452207/AONE?sid=lms>.
- [15] R. E. Reisman, J. Wypych, M. Lazell, and C. E. Arbesman, "Sensitization to nonvenom contaminants in a venom preparation," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 64, no. 4, pp. 281–286, Oct. 1979, doi: 10.1016/0091-6749(79)90145-3.
- [16] A. N. Hoofnagle *et al.*, "Recommendations for the generation, quantification, storage and handling of peptides used for mass spectrometry-based assays," *Clin. Chem.*, vol. 62, no. 1, pp. 48–69, Jan. 2016, doi: 10.1373/clinchem.2015.250563.
- [17] S. R. Gallagher, "One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 75, no. 1, p. 10.2.1-10.2A.37, 2006, doi: 10.1002/0471142727.mb1002as75.
- [18] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- [19] B. J. S. C. Olson, "Assays for Determination of Protein Concentration," *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 73, no. 1, p. A.3A.1-A.3A.32, Jun. 2016, doi: 10.1002/cpph.3.
- [20] A. Boukil, "Étude des performances du procédé d'ultrafiltration lors de la concentration d'hydrolysats tryptiques de β -lactoglobuline prétraitée par hautes pressions hydrostatiques," thesis, Université Laval, 2018.
- [21] D. Garwolińska, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik, and W. Hewelt-Belka, "State of the art in sample preparation for human breast milk metabolomics—merits and limitations," *Trends Anal. Chem.*, vol. 114, pp. 1–10, May 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.02.014.

- [22] D. Martínez-Maqueda, B. Hernández-Ledesma, L. Amigo, B. Miralles, and J. Á. Gómez-Ruiz, "Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion," in *Proteomics in Foods: Principles and Applications*, F. Toldrá and L. M. L. Nollet, Eds. Boston, MA: Springer US, 2013, pp. 21–50.
- [23] E. L. Danneels, M. Van Vaerenbergh, G. Debyser, B. Devreese, and D. C. de Graaf, "Honeybee Venom Proteome Profile of Queens and Winter Bees as Determined by a Mass Spectrometric Approach," *Toxins (Basel)*, vol. 7, no. 11, pp. 4468–4483, Oct. 2015, doi: 10.3390/toxins7114468.
- [24] C. Longé, A. Brazdova, J. Brunet, C. Schwartz, B. Girodet, and P. Poncet, "IgE Cross-reactivity between European hymenoptera and Asian hornet (*Vespa velutina*) venom allergens." Accessed: Oct. 03, 2019. [Online]. Available: http://jlbam.free.fr/publications/jlbam_poster_lisbon.htm.
- [25] J. Ferey, "Développement d'outils analytiques basés sur la spectrométrie de masse pour le suivi d'interactions enzyme-ligand dans le domaine de la santé," Université d'Orléans, 2017.
- [26] I. Wagner and H. Musso, "New Naturally Occurring Amino Acids," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 22, no. 11, pp. 816–828, 1983, doi: 10.1002/anie.198308161.
- [27] A. Ambrogelly, S. Palioura, and D. Söll, "Natural expansion of the genetic code," *Nat Chem Biol*, vol. 3, no. 1, pp. 29–35, Jan. 2007, doi: 10.1038/nchembio847.
- [28] R. Gwarda, A. Tomczyszyn, A. Misicka, and T. Dzido, "Retention and Separation Efficiency of Some Synthetic Oligopeptides in Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography," *Acta Chromatographica*, vol. 1, pp. 1–10, Feb. 2015, doi: 10.1556/ACHrom.27.2015.1.1.
- [29] J. Biller, L. Morschheuser, M. Riedner, and S. Rohn, "Development of optimized mobile phases for protein separation by high performance thin layer chromatography," *J Chromatogr A*, vol. 1415, pp. 146–154, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.08.048.
- [30] T. Tuzimski, "Application of different modes of thin-layer chromatography and mass spectrometry for the separation and detection of large and small biomolecules," *J Chromatogr A*, vol. 1218, no. 49, pp. 8799–8812, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.10.028.
- [31] M. Friedman, "Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 3, pp. 385–406, Feb. 2004, doi: 10.1021/jf030490p.
- [32] M. Yamashita, S. Arai, and M. Fujimaki, "Applying Proteolytic Enzymes on Soybean: Part IV. A Ninhydrin-Negative Bitter Peptide in Peptic Hydrolyzate of Soybean Protein," *Agr Biol Chem*, vol. 33, no. 3, pp. 321–330, Mar. 1969, doi: 10.1080/00021369.1969.10859330.
- [33] Y. Zhang, R. Chen, H. Ma, and S. Chen, "Isolation and Identification of Dipeptidyl Peptidase IV-Inhibitory Peptides from Trypsin/Chymotrypsin-Treated Goat Milk Casein Hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 40, pp. 8819–8828, Oct. 2015, doi: 10.1021/acs.jafc.5b03062.
- [34] R. Anbuhezian, S. Ravichandran, D. Karthick Rajan, S. Tilivi, and S. Prabha Devi, "Identification and functional characterization of antimicrobial peptide from the marine crab *Dromia dehaani*," *Microb. Pathog.*, vol. 125, pp. 60–65, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.056.
- [35] A. C. M. Paiva and A. Grandino, "Evidence that pepsitensin is angiotensin I," *Experientia*, vol. 29, no. 2, pp. 154–155, Feb. 1973, doi: 10.1007/BF01945444.
- [36] R. Bhusan, V. K. Mahesh, and P. V. Mallikharjun, "Thin layer chromatography of peptides and proteins: A review," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 3, no. 3, pp. 95–104, May 1989, doi: 10.1002/bmc.1130030302.
- [37] I. Meisen *et al.*, "Direct coupling of high-performance thin-layer chromatography with UV spectroscopy and IR-MALDI orthogonal TOF MS for the analysis of cyanobacterial toxins," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 10, pp. 3858–3866, May 2009, doi: 10.1021/ac900217q.
- [38] R. Ł. Gwarda and T. H. Dzido, "Correlation of Migration Distance of Peptides in High-Performance Thin-Layer Chromatography and Pressurized Planar Electrochromatography Systems," *Chromatographia*, vol. 81, no. 11, pp. 1589–1594, Nov. 2018, doi: 10.1007/s10337-018-3602-5.
- [39] "ProteoChrom® HPTLC Silica Gel 60 Platte | 105650." https://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/ProteoChrom-HPTLC-silica-gel-60,MDA_CHEM-105650#anchor_PI (accessed Dec. 26, 2019).
- [40] J. F. Emory, M. J. Walworth, G. J. Van Berkel, M. Schulz, and S. Minarik, "Direct analysis of reversed-phase high-performance thin layer chromatography separated tryptic protein digests using a liquid microjunction surface sampling probe/electrospray ionization mass spectrometry system," *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, vol. 16, no. 1, pp. 21–33, 2010, doi: 10.1255/ejms.1041.
- [41] "La chromatographie liquide haute performance," Jun. 25, 2020. <http://atechimie.univ-lille.fr/Chromatographie-Phase-Liquide/Principe/> (accessed Jun. 25, 2020).
- [42] C. T. Cologna *et al.*, "Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil," *J. Proteom.*, vol. 94, pp. 413–422, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.017.

- [43] N. B. Dias, B. M. de Souza, F. K. Cocchi, H. M. Chalkidis, V. A. C. Dorce, and M. S. Palma, "Profiling the short, linear, non-disulfide bond-containing peptidome from the venom of the scorpion *Tityus obscurus*," *J Proteomics*, vol. 170, pp. 70–79, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jprot.2017.09.006.
- [44] Y. Bai, Q. Zhao, M. He, X. Ye, and X. Zhang, "Extensive characterization and differential analysis of endogenous peptides from *Bombyx batryticatus* using mass spectrometric approach," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 163, pp. 78–87, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2018.09.033.
- [45] C. Guette, C. Legros, G. Tournois, M. Goyffon, and M.-L. Célérier, "Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiadora parahybana* tarantula venom gland," *Toxicon*, vol. 47, no. 6, pp. 640–649, May 2006, doi: 10.1016/j.toxicon.2006.01.017.
- [46] "Size Exclusion Chromatography Principles and Methods." GE Healthcare, [Online]. Available: <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11639>.
- [47] D. Brinkman and J. Burnell, "Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*," *Toxicon*, vol. 51, no. 5, pp. 853–863, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.toxicon.2007.12.017.
- [48] R. S. Cherki, E. Kolb, Y. Langut, L. Tsveyer, N. Bajayo, and A. Meir, "Two tarantula venom peptides as potent and differential Na(V) channels blockers," *Toxicon*, vol. 77, pp. 58–67, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.toxicon.2013.10.029.
- [49] R. Li *et al.*, "Two-step purification and in vitro characterization of a hemolysin from the venom of jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, no. 1, pp. 14–19, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.03.005.
- [50] A. Munawar *et al.*, "Elapid snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera *Naja* and *Notechis*," *Toxins (Basel)*, vol. 6, no. 3, pp. 850–868, Feb. 2014, doi: 10.3390/toxins6030850.
- [51] J. A. Harrison and J. A. Aquilina, "Mass spectrometry data and size exclusion chromatography profiles of Australian taipan venom toxins," *Data Brief*, vol. 9, pp. 501–507, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.dib.2016.09.005.
- [52] D. Ianzer *et al.*, "Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography," *Peptides*, vol. 25, no. 7, pp. 1085–1092, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.peptides.2004.04.006.
- [53] R. Diniz-Sousa *et al.*, "Biochemical characterization of a phospholipase A2 homologue from the venom of the social wasp *Polybia occidentalis*," *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, vol. 24, p. 5, 2018, doi: 10.1186/s40409-018-0143-1.
- [54] Michael. Karas, Doris. Bachmann, and Franz. Hillenkamp, "Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules," *Anal. Chem.*, vol. 57, no. 14, pp. 2935–2939, Dec. 1985, doi: 10.1021/ac00291a042.
- [55] A. J. Dempster, "A new Method of Positive Ray Analysis," *Phys. Rev.*, vol. 11, no. 4, pp. 316–325, Apr. 1918, doi: 10.1103/PhysRev.11.316.
- [56] M. Yamashita and J. B. Fenn, "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme," *J. Phys. Chem.*, vol. 88, no. 20, pp. 4451–4459, Sep. 1984, doi: 10.1021/j150664a002.
- [57] J. Vinh, "Etude et caractérisation structurale de modifications post-traductionnelles de la tubuline par spectrométrie de masse : la polyglycylation et la polyglutamylolation," Université Pierre et Marie Curie - PARIS 6, 1999.
- [58] M. Fresnais, "Nouvelles approches par spectrométrie de masse pour la caractérisation de systèmes archéologiques et biologiques : application à l'étude de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine," thesis, Strasbourg, 2016.
- [59] M. Dubois, "Développement de techniques analytiques pour l'évaluation des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs par spectrométrie de masse," thesis, Université Paris VI, 2008.
- [60] "Signal, bruit, et limites de détection en spectrométrie de masse - PDF Téléchargement Gratuit." Agilent Technologies, 2011, Accessed: Jun. 27, 2020. [Online]. Available: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5990-7651FR.pdf>.
- [61] R. Legeron, "La spectrométrie de masse appliquée à la quantification absolue des anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu plasmatique pour la réalisation d'études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques," thesis, Université de Bordeaux, 2016.
- [62] C. A. Smith, E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, and G. Siuzdak, "XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 3, pp. 779–787, Feb. 2006, doi: 10.1021/ac051437y.
- [63] M. Katajamaa and M. Oresic, "Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data," *BMC Bioinformatics*, vol. 6, p. 179, Jul. 2005, doi: 10.1186/1471-2105-6-179.
- [64] R. A. van den Berg, H. C. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, and M. J. van der Werf, "Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data," *BMC Genomics*, vol. 7, no. 1, p. 142, Jun. 2006, doi: 10.1186/1471-2164-7-142.

- [65] A. Roux, "Analyse du metabolome urinaire humain par chromatographie liquide couplee a la spectrometrie de masse a haute resolution," phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011.
- [66] A. Salwiński, D. Da Silva, R. Delépée, and B. Maunit, "Enzyme-coupled nanoparticles-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for searching for low-mass inhibitors of enzymes in complex mixtures," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 25, no. 4, pp. 538–547, Apr. 2014, doi: 10.1007/s13361-014-0826-y.
- [67] A. Salwiński, "Development of novel mass spectrometry-based approaches for searching for low-mass tyrosinase inhibitors in complex mixtures," thesis, Université d'Orléans, 2014.
- [68] D. Da Silva, "Évaluation d'une approche protéomique par spectrométrie de masse pour l'identification de protéines cibles impliquées dans la Thérapie Photodynamique (PDT).," thesis, Laboratoire de spectrométrie de masse et chimie laser (LSMCL), Metz, 2011.
- [69] P. Roepstorff and J. Fohlman, "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides," *Biomed. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 11, p. 601, Nov. 1984, doi: 10.1002/bms.1200111109.
- [70] K. Biemann, "Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions)," *Meth. Enzymol.*, vol. 193, pp. 886–887, 1990, doi: 10.1016/0076-6879(90)93460-3.
- [71] "Interpreting Individual Peaks MS2 spectra | DC Biosciences," *DCB*. <https://www.dcbiosciences.com/news/interpreting-peaks-ms2-spectra/> (accessed Dec. 17, 2019).
- [72] K. F. Medzihradzsky and R. J. Chalkley, "LESSONS IN DE NOVO PEPTIDE SEQUENCING BY TANDEM MASS SPECTROMETRY," *Mass Spectrom Rev*, vol. 34, no. 1, pp. 43–63, 2015.
- [73] I. A. Papayannopoulos, "The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 49–73, 1995, doi: 10.1002/mas.1280140104.
- [74] "- De Novo Peptide Sequencing Tutorial," p. 48.
- [75] F. Cliquet, "Des spectres MS/MS à l'identification des protéines : interprétation des données issues de l'analyse d'un mélange de protéines d'un organisme non séquencé," thesis, Université de Nantes, 2011.
- [76] T. D. Alayi, "Un ensemble d'outils protéomiques pour la caractérisation de protéines d'organismes très divers : plantes, champignons et parasites," thesis, Université de Strasbourg, 2013.
- [77] B. Ma *et al.*, "PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 20, pp. 2337–2342, 2003, doi: 10.1002/rcm.1196.
- [78] J. A. Taylor and R. S. Johnson, "Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 9, pp. 1067–1075, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19970615)11:9<1067::AID-RCM953>3.0.CO;2-L.
- [79] A. Frank and P. Pevzner, "PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 4, pp. 964–973, Feb. 2005, doi: 10.1021/ac048788h.
- [80] M. Bern and D. Goldberg, "De novo analysis of peptide tandem mass spectra by spectral graph partitioning," *J. Comput. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 364–378, Mar. 2006, doi: 10.1089/cmb.2006.13.364.
- [81] A. Resemann, D. Wunderlich, J. Fuchser, and D. Suckau, "Mass Spectrometric Protein Sequencing de Novo: The Full Determination of a 13.7 kDa Camelid Nanobody Sequence by MALDI Top-Down-Sequencing," *J Biomol Tech*, vol. 21, Sep. 2010.
- [82] R. Simon, "La quantification ciblée de protéines et peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem: développements analytiques et applications," thesis, Université Claude Bernard Lyon 1, 2013.
- [83] H. Mohimani, Y.-L. Yang, W.-T. Liu, P.-W. Hsieh, P. C. Dorrestein, and P. A. Pevzner, "Sequencing Cyclic Peptides by Multistage Mass Spectrometry," *Proteomics*, vol. 11, no. 18, pp. 3642–3650, Sep. 2011, doi: 10.1002/pmic.201000697.

**Chapitre III: Mélange complexe du
venin - La recherche des molécules
bioactives pour l'application
cosmétique**

Table des matières

Chapitre III: Mélange complexe du venin - La recherche des molécules bioactives pour l'application cosmétique	135
Table des matières	136
Introduction.....	137
1 Action potentielle du venin de frelon sur les activités enzymatiques cutanées	138
1.1 Evaluation de l'action inhibitrice sur l'enzyme élastase du pancréas porcin	139
1.2 Evaluation de l'action inhibitrice sur l'enzyme collagénase extraite de <i>Clostridium histolyticum</i>	141
1.3 Évaluation de l'action inhibitrice sur la tyrosinase de champignon	143
2 Activité anti-oxydante du venin brut de frelon asiatique <i>V. velutina</i>	145
2.1 Caractérisation de molécule responsable de l'activité scavenging des radicaux libres.....	145
2.2 Étude des différents mécanismes antioxydants du venin et de la sérotonine	166
2.2.1 Résultats de la méthode TEAC	166
2.2.2 Résultats sur le test de la réduction du fer FRAP	167
2.2.3 Résultats sur le test indirect de l'activité de l'enzyme Superoxyde dismutase (SOD)	169
3 Activité antimicrobienne du venin	174
3.1 Protocoles d'évaluation l'activité antimicrobienne	175
3.2 Étude sur l'activité antimicrobienne du venin Vv et de la fraction Vv < 10 kDa	176
3.3 Tests d'activité antimicrobienne sur les fractions F'2 à F'6 issues du venin brut.....	177
Conclusion	178
Références.....	180

Introduction

Les extraits des plantes ou les venins d'animaux contiennent souvent des centaines jusqu'à quelques milles de composés [1]. Dans le cadre de nos études, le venin de frelon asiatique *V. velutina* est considéré comme une nouvelle source naturelle renfermant des composés potentiellement actifs d'intérêt pour le domaine dermacosmétique.

C'est ainsi qu'un criblage d'activité cosmétique des venins bruts et de ses fractions (grossières) a alors été effectué afin de faire ressortir des composés répondant à des allégations cosmétiques telles que antioxydants et/ou régénérant par exemple.

Ce chapitre s'articule autour de **trois axes principaux** que sont :

La mise en place d'un **criblage chimique et cellulaire des activités du venin brut et de ses fractions** sur des cibles enzymatiques telles que la **tyrosinase, l'élastase** ou bien encore la **collagénase** choisie pour leur rôle dans les processus engagés au niveau de la peau. À l'issue de ce criblage, **l'activité antioxydante** du venin brut sur le piégeage d'espèces réactives oxygénées a été évaluée. Puis finalement, l'effet de venin brut non plus sur une réponse enzymatique, mais sur sa potentielle capacité à agir en tant que **régénérant ou inhibiteur de la croissance microbienne dermique** a pu être estimée.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec l'Institut de Recherche sur la Biologie des Insectes (IRBI) UMR CNRS 7261 de l'Université de Tours qui a fourni les frelons asiatiques, le Centre Biophysique Moléculaire de l'Université d'Orléans au sein duquel ont été menés les tests cellulaires, l'équipe GlycoBio&Chimie de l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans pour les méthodes SDS-PAGE, Bradford et l'entreprise GlycoDiag pour les études sur les approches antimicrobiennes.

1 Action potentielle du venin de frelon sur les activités enzymatiques cutanées

La peau constitue un véritable organe comprenant plusieurs couches intégrées et chacune possède des propriétés spécifiques permettant à l'ensemble de réagir et de s'adapter aux conditions de son environnement. Le vieillissement de la peau est un des premiers signes extérieurs. Il résulte d'un certain nombre d'altérations observées au niveau de la matrice extracellulaire (fibres de collagène, de l'élastine). **La dégradation de l'élastine et du collagène** est directement liée à l'action de **l'élastase et la collagénase** enzymes sécrétées par les fibroblastes. **L'inhibition de ces enzymes** aurait alors un effet de diminution de la dégradation et donc augmenterait la stabilité de ces matrices pour **minimiser l'impact sur le vieillissement**.

Outre ces deux matrices, les mélanocytes constituent la deuxième grande population cellulaire de l'épiderme. Leur fonction est la synthèse des mélanines : **phéomélanines et eumélanines**, dans des organites spécialisés, les mélanosomes qui sont ensuite transférés aux kératinocytes. Dans le cadre d'une hyperpigmentation, **la tyrosinase est l'enzyme limitante de la mélanogénèse** dans les mélanocytes épidermiques. En effet, dans des conditions normales, la pigmentation de la peau est uniforme. Toutefois, au cours du temps, une pigmentation excessive peut se manifester localement par des taches de vieillissement (lentigo sénile) dues à une sécrétion accrue localisée de mélanine. Ainsi, **la recherche de molécules** pouvant agir directement sur les mélanocytes épidermiques en **inhibant l'activité de ces cellules** et/ou en **bloquant l'une des étapes de la biosynthèse des mélanines** reste un point d'intérêt pour la recherche en cosmétique et en dermatologie.

Un des nombreux challenges est donc la conception, la fabrication ou l'isolement de nouvelles substances anti-vieillessement non irritantes, non toxiques et/ou non allergisantes pour la peau. Dans ce contexte, la recherche de nouveau ingrédient non plus issue du végétal, mais de l'animal contribue à ce challenge. C'est dans ce contexte que ce projet de recherche s'intègre dans la valorisation du venin de frelon asiatique en tant que potentielle source d'actifs. En effet, de nombreuses études bibliographiques ont montré la présence d'inhibiteurs naturels dans des animaux vertébrés ou invertébrés comme une évolution permettant de les protéger de proies ou d'attaquer à leur tour certaines victimes. Certains de ces inhibiteurs présents dans le venin participeraient à l'arrêt des processus métaboliques et seraient décrits comme responsables de la mortalité de leurs proies tels que les systèmes des canaux ioniques ou les protéines de récepteur [2]. À titre exemple, le venin d'abeille contient l'oligopeptide mélitine qui peut imiter la structure

des certaines protéines et bloquer leur fonction. En particulier, il peut se lier avec la protéine calmoduline et réagir comme un inhibiteur compétitif à l'activité de cette protéine [3].

En outre, les venins renferment également les activateurs qui concernent la fibrinolyse, la coagulation sanguine telle que des protéases à sérine présentant dans le venin du serpent. Ces molécules réagissent comme les activateurs de protéine C ou de facteur V [4]. Nous définissons ici les activateurs comme des espèces qui augmentent l'activité enzymatique sans être eux-mêmes impliqués dans la réaction catalysée par l'enzyme.

Ainsi une étude de criblage d'activité cosmétique des venins de frelon asiatique a alors été initiée pour la première fois et présentée ci-dessous.

*Dans un premier temps, les venins bruts de frelons (Vv) ainsi que les fractions d'une part, supérieure à 10 kDa (Vv >10 kDa) et d'autre part inférieure à 10 kDa (Vv <10 kDa) ont été évalué quant à leur propriété inhibitrice des trois enzymes **élastase, collagénase et tyrosinase**.*

1.1 Evaluation de l'action inhibitrice sur l'enzyme élastase du pancréas porcin

Dans le cadre d'une activité inhibitrice de protéase à sérine, le patrimoine moléculaire de certains venins d'animaux a pu être révélé comme une nouvelle ressource potentielle. En effet, il a été isolé du venin de serpent *Bungarus fasciatus*, un inhibiteur de protéase à sérine - bungaruskunin (MW= 6753.7 u) avec une séquence contenant 83 résidus d'acides aminés pouvant avoir une capacité inhibitrice de l'élastase, trypsine, chymotrypsine[5]. Les inhibiteurs de protéase à sérine sont généralement des peptides riches en cystéines contenant environ 50-70 résidus des acides aminés [6]. Ainsi, nous avons mis en place le test d'évaluation de l'activité de notre venin de *V. velutina* sur l'élastase.

Le principe de ce test est de suivre la conversion du **substrat élastine marquée par fluorescence** lors de la mise en contact avec la cible enzymatique, ici **l'élastase du pancréas porcin**. **L'augmentation de fluorescence** a lieu lors de la **digestion d'élastine** par l'élastase. Ce produit possède alors une absorbance à la longueur d'onde maximale de **505 nm** et une émission de fluorescence à **515 nm**.

Dans ce contexte, le venin brut (Vv) et sa fraction inférieure à 10 kDa (Vv < 10 kDa) et supérieure à 10 kDa (Vv > 10 kDa) ont été évalués quant à leur rôle en tant qu'inhibiteur de l'élastase extrait du pancréas de porc en appliquant le protocole décrit dans **l'annexe 1, tableau A.3. Quatre**

concentrations de chaque échantillon ont été préparées par dilution en cascade dans la gamme de 12.5 – 100 µg/mL. Afin d'évaluer le bon fonctionnement du test enzymatique, **deux solutions contrôles** ont été réalisées, l'une en présence de l'inhibiteur de l'élastase standard (N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone à 0.01 mM) + le substrat et l'enzyme et l'autre en absence de l'inhibiteur. Parallèlement, l'influence de **l'effet matrice (venin+substrat)** a été évalué afin de le soustraire aux activités mesurées (**Figure III.1**). Il est à noter que les **concentrations des fractions** sont calculées à partir du **poids du matériel lyophilisé**.

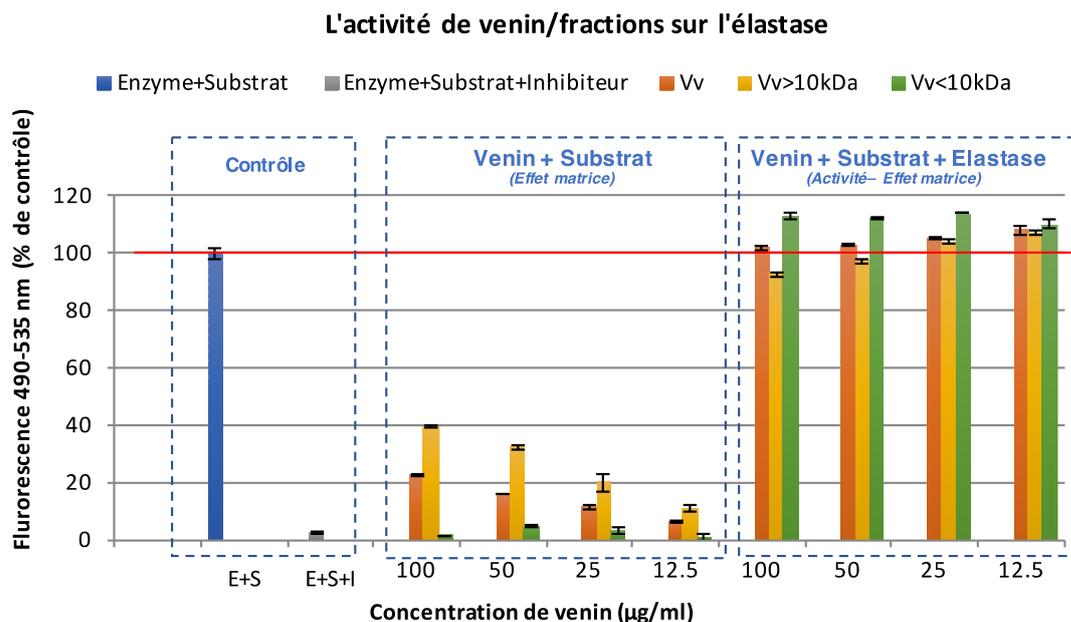


Figure III.1 : Évaluation de l'activité inhibitrice des venins et ses fractions Vv > 10 kDa et Vv < 10 kDa sur l'élastase, n=4

D'après les résultats contrôles indiqués dans la **Figure III.1**, nous pouvons conclure sur le **bon fonctionnement de notre enzyme** et de **son inhibition** en présence de l'inhibiteur standard. L'évaluation de l'effet matrice (venin + substrat) en absence de l'enzyme élastase prouve la présence **d'une interférence** pour l'échantillon de **venin brut** et la fraction protéique (**Vv > 10 kDa**) avec un effet dose-réponse. Ces effets devront être **pris en compte** afin d'éliminer d'éventuel faux positif. Contrairement à ces fractions en présence de protéines > 10 kDa, la fraction peptidique (**Vv < 10 kDa**) n'a présenté **aucune interférence matricielle**. L'effet « **activateur** » peut ici être expliqué par la présence, dans le venin, de **protéases à sérine** [7], tout comme l'élastase, qui peuvent elles-mêmes conduire à la **dégradation de l'élastine**. Ce résultat est en corrélation avec des études précédentes où l'effet protéolytique et élastinolytique est trouvé dans le venin, particulièrement ceux de serpents [8].

Ainsi afin de révéler la réelle activité du venin et de ses fractions sur l'enzyme élastase, l'activité en présence de l'enzyme et du substrat ont été **soustraite** à celles de l'effet matrice du venin pour chacune des fractions respectives. C'est ainsi que nous avons observé **un léger effet inhibiteur** présentant un effet dose-réponse pour le venin brut **Vv** (décroissance de 108 % à 101 %) et la fraction **Vv > 10 kDa** (décroissance de 107 % à 92 %) pour des concentrations allant de 12.5 à 100 µg/mL. Nous pourrions éventuellement étudier des concentrations supérieures à 100 µg/mL afin de voir si la capacité inhibitrice de la fraction **Vv > 10 kDa** serait augmentée. Cependant, nous devons anticiper les études qui seront effectuées sur cellules pour lesquelles de telles concentrations seraient sans doute **toxiques** pour les lignées cellulaires choisies.

Contrairement à ce que nous recherchions, la fraction peptidique (**Vv < 10 kDa**) de notre venin de frelon asiatique **n'a pas présenté d'activité inhibitrice**. En effet, les résultats de la **Figure III.1** semblent au contraire montrer une **surexpression constante de la fluorescence** (d'environ 16% d'augmentation) quelle que soit la concentration de la fraction. Cette fluorescence ne peut être liée à un effet matriciel, mais éventuellement à la capacité de **certaines molécules** de cette fraction à **promouvoir l'activité enzymatique** de l'élastase sur la dégradation de l'élastine. Néanmoins cette hypothèse reste à être confirmée. Afin de compléter notre stratégie de criblage d'activité, le venin de frelon et ses deux fractions ont été évalués sur l'enzyme collagénase.

1.2 Evaluation de l'action inhibitrice sur l'enzyme collagénase extraite de *Clostridium histolyticum*

Dans le cadre de cette enzyme, l'effet collagénolytique induit par les métalloprotéinases [9] a été démontré dans le venin des serpents [10] ou des araignées [11] et semble participer à la phase de cicatrisation[12]. Parallèlement, une autre étude sur l'application de venin de *Vespa orientalis* sur une peau de rats a permis de mettre en avant un mécanisme d'amélioration de la réparation dermique [13]. De plus, une étude sur le venin d'abeille a permis de mettre en évidence l'inhibition de la collagénase MMP-1 via la diminution de son expression dans les kératinocytes HaCaT [14]. Dans ce contexte, il a été intéressant d'évaluer l'activité collagénolytique de notre venin de frelon asiatique à la recherche de nouveaux inhibiteurs naturels comme nouveaux ingrédients. **Similairement au test de l'activité d'élastase**, le principe de cet essai est de mesurer **la fluorescence émise lors du clivage du substrat** par collagénase. Dans le cadre de ce test, le produit possède une absorbance maximale à **505 nm** et l'émission de fluorescence à **515 nm**.

Comme précédemment, le venin brut (**Vv**) et ses fractions (**Vv < 10 kDa et > à 10 kDa**) ont été évalués quant à leur rôle en tant qu'inhibiteur de la collagénase en appliquant le protocole décrit à l'**annexe 1, tableau A.4**. Quatre concentrations de chaque échantillon ont été préparées par dilution en cascade dans la gamme de 1.6 – 100 µg/mL. Afin d'évaluer le bon fonctionnement du test enzymatique, deux solutions contrôles ont été réalisées, l'une en présence de l'inhibiteur de la collagénase standard (1,10 Phénantroline à 0.1 µM) + le substrat et l'enzyme et l'autre en absence de l'inhibiteur. Parallèlement, l'influence de l'effet matrice (venin+substrat) a été évalué afin de le soustraire aux activités mesurées (**Figure III.2**).

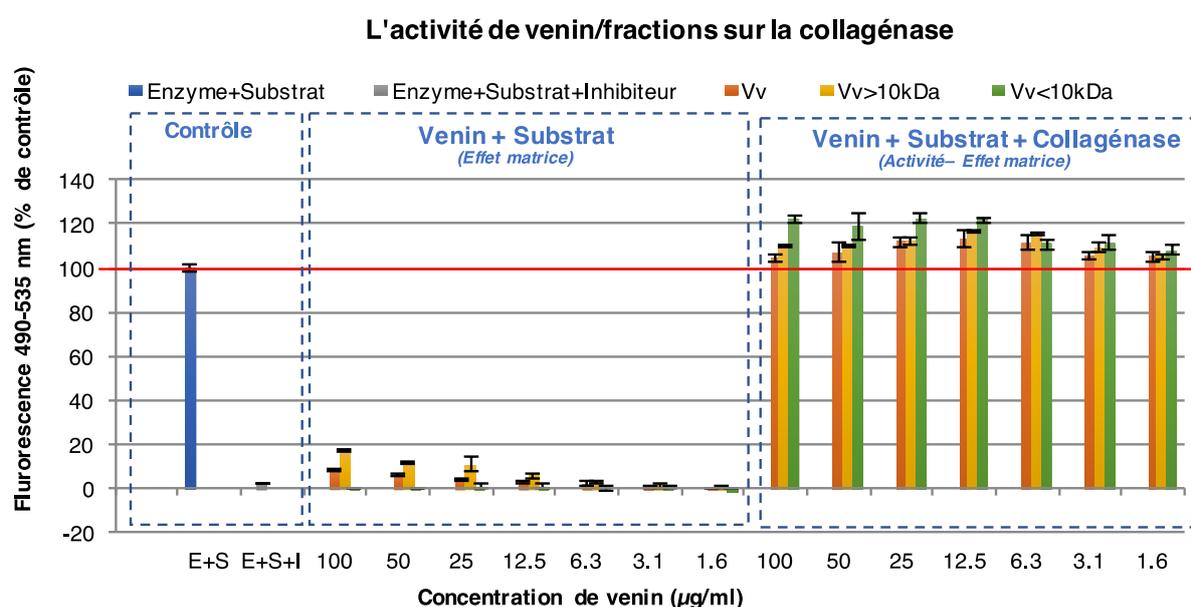


Figure III.2 : Évaluation de l'activité inhibitrice des venins et des fractions $Vv > 10\text{ kDa}$ et $Vv < 10\text{ kDa}$ sur la collagénase extraite de *Clostridium histolyticum*, $n=3$. E : Enzyme, S : substrat, I : inhibiteur

D'après les résultats contrôles indiqués dans la **Figure III.2**, nous pouvons conclure sur le bon fonctionnement de notre enzyme et de son inhibition en présence de l'inhibiteur standard. L'évaluation de l'effet matrice (venin + substrat) en absence de l'enzyme collagénase présente la **même interférence du venin brut et de sa fraction protéique ($Vv > 10\text{ kDa}$)** avec un effet dose-réponse que celle obtenue avec l'élastase. Comme pour l'élastase, ces observations sont confortées avec les études précédentes sur l'activité collagénolytique des venins des animaux mentionnés au-dessus. De la même manière, la fraction peptidique (**$Vv < 10\text{ kDa}$**) **n'a présentée aucune interférence matricielle**. Cette fraction reste donc la fraction d'intérêt afin d'évaluer un potentiel effet inhibiteur des peptides de venin de frelon asiatique.

Nous pouvons constater, dans la **Figure III.2**, après la soustraction de l'effet matrice, qu'un effet dose-réponse significatif existe pour la fraction **Vv > 10 kDa** et cela pour des concentrations comprises entre 1.6 et 12.5 µg/mL avec une augmentation de la fluorescence de 14%. Au-delà de la concentration de 12.5 µg/mL, **l'effet plateau semble être atteint**. Il est à noter que la **fluorescence mesurée est produite** à partir du **substrat spécifique étiqueté** (la gélatine) dans le kit. Dans ce cas, une hypothèse serait de dire qu'il y a **une concentration constante et saturée du substrat collagène** et que, toujours d'après la **Figure III.2**, la vitesse catalytique augmente en fonction des concentrations croissantes pour atteindre une vitesse limitante à des concentrations élevées : cela tendrait alors à penser que des molécules présentes dans le venin brut (**Vv**) et les fractions (**Vv > 10 kDa**) seraient des **activateurs**.

Malgré **aucun effet d'inhibition de la collagénase**, et ce pour les trois types d'échantillons, n'a été démontré, ces résultats participent à **une meilleure connaissance** de l'activité du venin de frelon. Afin de compléter notre panel de criblage d'activité pour la dermacosmétique, nous avons évalué le potentiel de blanchiment de la peau de notre venin.

1.3 Évaluation de l'action inhibitrice sur la tyrosinase de champignon

D'après la littérature, certains venins ont présenté de nouvelles molécules anti-mélanogénèse. C'est dans ce contexte que l'effet d'inhibition du venin d'araignée *Argiope lobata* ($IC_{50} = 70.4 \mu\text{g/mL}$) a été évaluée par le test oxydase de L-DOPA et la tyrosinase de champignon. La molécule responsable est une polyamine possédant le groupement aromatique 2,4 dihydroxyphenyl acetic acid (DHPA) [15]. La réactivité du venin de frelon asiatique sur la **tyrosinase** est basée sur cette recherche. Il s'agit dans ce cas de suivre la réaction d'oxydase permettant de transformer **le substrat L-DOPA (transparent) en dopachrome (pigment rouge)**. Cette transformation est alors suivie par absorbance à une longueur d'onde maximum de **475 nm**.

Il est aisé de travailler avec une tyrosinase de champignon dans la mesure où cette enzyme est disponible commercialement. Cependant, cette enzyme isolée reste éloignée de l'enzyme rencontrée in vivo. Le protocole est détaillé dans **l'annexe 1, tableau A.5**.

Lors de cette étude, **la glabridine** a été utilisée comme **témoin positif** de l'activité inhibitrice envers la tyrosinase du champignon. La glabridine est le composant principal de la fraction hydrophobe des extraits de réglisse et est utilisée en cosmétique pour ses propriétés éclaircissantes.

La glabridine influence la pigmentation en inhibant, de manière réversible et non compétitif la synthèse de la mélanine et en inhibant l'activité de la tyrosinase de manière dose-dépendante. Plus spécifiquement, la glabridine inhibe l'activité monophénolase (ajout d'une fonction OH sur un phénol), diphénolase (oxydation de 2 fonctions OH en cétones) de la tyrosinase.

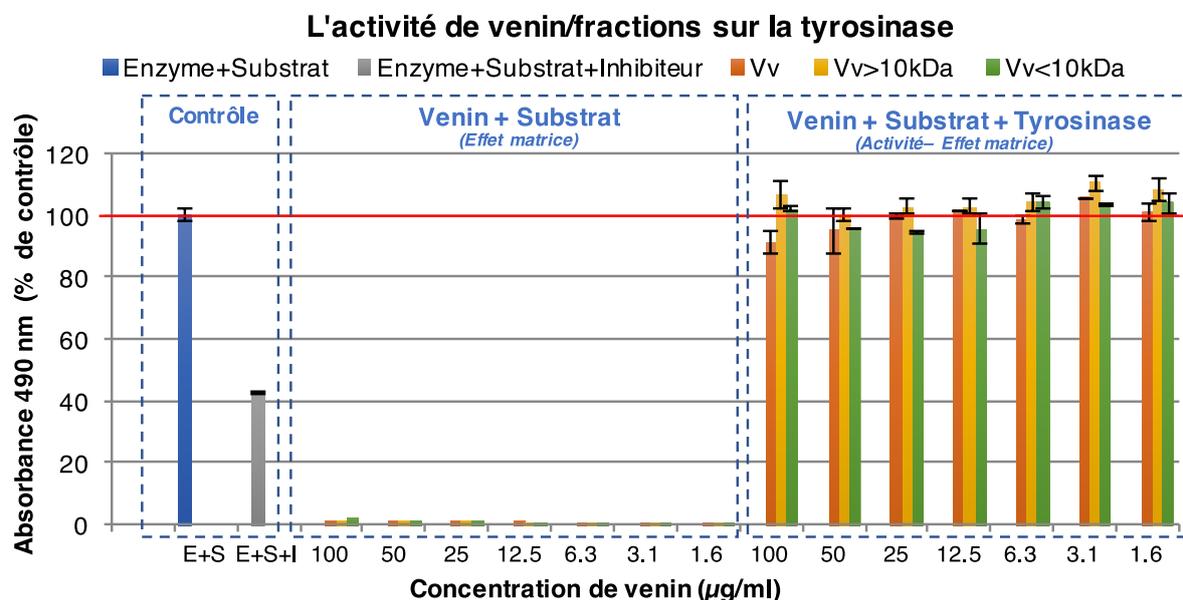


Figure III.3 : Évaluation de l'activité des venins et des fractions (Vv > 10 kDa et Vv <10 kDa) sur la tyrosinase de champignon (n=3). Gla: Glabridine. **Trait rouge :** limite de 100%

Contrairement aux deux précédents tests (élastase et collagénase) **aucune interférence matricielle** est observée pour le **venin brut et la fraction protéique**. Cependant d'après la **Figure III.3**, nous constatons, quant à l'activité de venin sur la tyrosinase, que, quel que soit l'échantillon étudié, venin brut (**Vv**), la fraction supérieure à 10 kDa (**Vv >10 kDa**) ou bien celle inférieure à 10 kDa (**Vv < 10 kDa**), **il n'y a pas d'effet dose réponse**. Malgré le faible pourcentage d'inhibition du venin brut (Vv) à 100 µg/mL (92% de contrôle) et de la fraction Vv < 10 kDa à 25 et 50 ug/mL (95% de contrôle), nous n'observons **pas un réel effet inhibiteur** des trois types d'échantillon.

Nous avons noté qu'un criblage de l'activité mélanogénèse par l'essai oxydase de L-DOPA a été réalisé sur 86 venins différents y compris des serpents, des scorpions, des araignées et des amphibiens. Néanmoins, il n'y avait que deux venins montrant une activité d'anti-tyrosinase significative [15]. Dans ce contexte, il est explicable que le venin de frelon asiatique ne possède pas cette propriété.

Malgré ces **résultats négatifs** sur l'**absence d'inhibiteurs** pour ces trois cibles enzymatiques, nous avons été en mesure d'évaluer **la présence d'interférence matricielle de la fraction protéique**. Ce résultat corrobore la présence éventuelle de protéase jouant le même rôle que nos enzymes d'intérêts au sein du venin de frelon. De ce fait, ces informations nous montrent l'intérêt de travailler spécifiquement sur **une fraction dépourvue de protéines (Vv >10 kDa)** afin d'identifier un criblage sans faux positif. Afin de compléter notre panel de criblage d'activité pour la dermacosmétique, nous avons évalué finalement le potentiel antioxydant de notre venin.

2 Activité anti-oxydante du venin brut de frelon asiatique *V. velutina*

Dans la recherche des molécules bioactives à visée cosmétique, les antioxydants sont de précieux alliés pour aider la peau à lutter contre les radicaux libres produits en concentration élevée lors du stress oxydatif. Au vu des publications récentes sur les travaux de l'activité antioxydante de venins animaux [16]–[19], nous avons mené des études sur l'effet antioxydant du venin brut (**Vv**) de frelon asiatique en mettant en œuvre des tests chimiques et biologiques dans le but d'identifier et caractériser par chromatographie sur couche mince (**TLC**) et chromatographie liquide couplée à un détecteur UV-visible (**HPLC-UV**) la structure chimique de la ou des molécules responsables de cet effet antioxydant du venin brut.

2.1 Caractérisation de molécule responsable de l'activité scavenging des radicaux libres

L'étude, réalisée sur un lot de frelons collectés en octobre 2016, visant à explorer la présence de molécules antioxydantes issues du venin de frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) pour prévenir ou réduire le vieillissement cutané est présentée sous forme d'une publication au journal **Toxicon** et disponible en ligne le **11 janvier 2020**.

Remarque : La numérotation des tableaux et des figures impliquées dans cet article est séparée de la totalité du manuscrit. Les références seront intégrées avec celles du manuscrit.

Asian hornet *Vespa velutina nigrithorax* venom: Evaluation and identification of the bioactive compound responsible for Human Keratinocyte protection against oxidative stress

Nhi Thao LE^a, David DA SILVA^{a*}, Cyril COLAS^{a,b}, Eric DARROUZET^c, Patrick BARIL^b, Lucie LESEURRE^d, Benoît MAUNIT^{a,e}

^a Univ. Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067, Orléans, France

^b CNRS, CBM, UPR 4301, Univ-Orléans, F-45071, Orléans, France

^c IRBI, UMR CNRS 7261, University of Tours, Faculty of Sciences, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

^d CHIMEX (groupe L'Oréal), 16 rue Maurice Berteaux, 95500 Le Thillay, France

^e Université Clermont Auvergne, INSERM, IMost, F-63000 Clermont-Ferrand, France

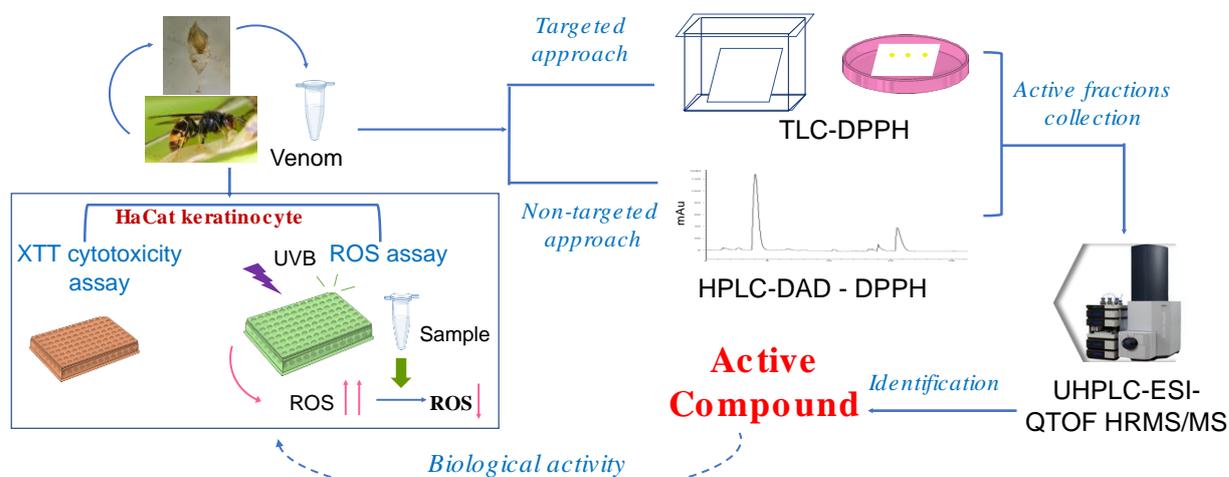
Received 22 July 2019; Received in revised form 6 December 2019; Accepted 9 January 2020.
Available online 11 January 2020, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.01.001>

* Corresponding author:

Abstract

The present study aimed to explore the potential antioxidant molecules of the Asian hornet venom (*Vespa velutina nigrithorax*) responsible for radical scavenging activity and human keratinocyte protection against oxidative stress. We developed a first technical platform that combined a DPPH radical scavenging chemical assay and cytotoxicity and ROS (reactive oxygen species) production in HaCaT keratinocyte cells exposed to UVB to evaluate the antioxidant property of *V. velutina* venom. We further employed Thin Layer Chromatography (TLC) combined with the DPPH assay as a targeted separation approach to isolate the antioxidant compounds responsible for the free radical scavenging property of *V. velutina* venom. In parallel, the latter was fractionated by a HPLC-DAD non-targeted separation approach. From this experiment, nine fractions were generated which were again evaluated separately for their antioxidant properties using DPPH assays. Results showed that only one fraction exhibited significant antioxidant activity in which serotonin was identified as the major compound by a UHPLC-ESI-QTOF HRMS/MS approach. We finally demonstrated, using purified serotonin molecule that this bioactive structure is mostly responsible for the free radical scavenging property of the crude venom as evidenced by DPPH and ROS assays in HaCaT cells exposed to UVB.

Key words: Antioxidant activity; Keratinocyte; Mass spectrometry; Reactive oxygen species; Thin Layer Chromatography; *Vespa Velutina* Venom.



Graphic abstract

Introduction

UV irradiation is the most important factor for the generation of reactive oxygen species (ROS) in cells, in which ions and free radicals derived from oxygen such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), oxygen (O_2), and superoxide ($O_2^{\cdot -}$) [20] are known to be toxic in cells. Free radicals are molecules with unpaired electrons that are highly unstable and tend to react with enzymes, receptors or the cellular lipid membrane. They remove electrons from any molecule in their path and create new free radicals. These reactions occur continuously, inducing tissue structure damage or cell function disorders. To deal with this impact, antioxidants have been used for many years to improve the organism's defense [21]. The antioxidant activity of animal venom has been reported in many studies, showing the potential of these natural sources to the human organism *in vitro* and *in vivo*. There is some evidence that a secretion of the mollusk *Cryptomphalus aspersa* possesses an antioxidant property *in vitro* and induces fibroblast proliferation by promoting the extracellular matrix assembly that can be applied for wound healing [22]. A research of active compounds in venom showed that a low molecular weight protein (6.7 kDa) isolated from Indian *Naja naja* snake venom can increase the antioxidant enzymes of Ehrlich ascites carcinoma mice [19]. Also, the *Chrysaora quinquecirrha* (sea nettle) nematocyst venom peptide fraction as proved to possess a significant antioxidant property against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice [18]. In fact, the presence of antioxidants in the insect venom, such as superoxide dismutase proteins, has been reported in case of parasitoid wasp *Scleroderma guani* [23] or endoparasitoid *Cotesia chilonis* [24]. The roles of these molecules were assumed to protect the venom components from degradation by ROS stress generated by this insect during course of production and accumulation of the venom reservoir [25], [26]. Effectively, some other studies have reported the potential antioxidant activity of hornet venom [27] and bee venom [17], [28] but without a specific characterization of the bioactive compounds responsible for this activity. Since the venom may lead to some adverse effect on the human organism, for example, insect venoms have been well-known to induce allergy such as edema, pain, pruritus and urticaria on the skin after a sting [29], the characterization of responsible molecules should be considered and identified.

Vespa velutina nigrithorax is an alien species from Asia that was accidentally introduced into Europe, first in southwest France [30]. Generally, *Vespid* venom comprises multiple potential bioactive compounds: low molecular weight compounds (bioamines such as histamine, tyramine and catecholamine [31] or pheromones such as aliphatic ketones and alcohols [32]), peptides (occupying up to 70% of the dried venom, the most popular peptides being mastoparan and wasp

kinins), and proteins (neurotoxins, proteases, phospholipases) [31]. Surprisingly, up to now the venom of the *Vespa velutina nigrithorax* species has been generally ignored as a potential natural source of bioactive compounds, and it was only recently that a study was carried out on *Vespa velutina* venom to investigate its toxin composition. From this analysis, 293 putative toxin-encoding sequences were identified in which the main groups of interest were hemostasis-impairing toxins, neurotoxins, proteases, antimicrobial proteins and peptides [33]. In two other papers, *V. velutina* venom was reported to contain apamine and melittin with structures similar to those found in the honeybee [34], [35].

To our knowledge, the antioxidant property has not been studied in *V. velutina* venom. In this study, we demonstrated that *V. velutina* venom possesses a strong antioxidant potential for the protection of keratinocytes against ROS. Our objective in this study was to identify the compounds responsible for this property in *V. velutina* venom. To deal with this challenge, an analytical methodology combined with biological assays was developed to determine and purify the bioactive compounds. Traditionally, HPLC and free radical scavenging DPPH assays are used to isolate and identify the antioxidants from a complex mixture [36]. However, these approaches have disadvantages such as non-targeted sample collection, significant sample consumption and, in the case of HPLC-DPPH online, the installation of specific and costly equipment [37]. Thin layer chromatography (TLC) is a simple, rapid and targeted method that is compatible with direct derivatization by DPPH solution and thus can help to visibly locate the antioxidants on the plate surface [38]. Therefore, in our study we conducted TLC and HPLC separations in parallel to collect active antioxidant compounds in *V. velutina* venom. Then high performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry was used for structural identification of the active compounds. In order to confirm the involvement of these molecules in the antioxidant mechanism, the identified compounds were tested in DPPH and ROS assays in HaCaT cells exposed to UVB.

Material and methods

Materials.

Vespa velutina nigrithorax workers were provided by the Institute of Research on Insect Biology (IRBI) located in Tours, France. The hornets were collected in the Indre-et-Loire (France) in October (2017) and were stocked at -80°C before use. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), serotonin, ascorbic acid, and ninhydrin were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Butanol, methanol, acetonitrile, formic acid, and acetic acid were HPLC grade and were purchased

from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). The Bradford reagents were purchased from Bio-Rad. Ultra-pure water was obtained from the Purelab water system of Elga LabWater.

Extraction of venom and preparation

A venom sample was pooled from 183 frozen hornets. The extraction protocol was based on existing methods [39]–[41] with some modifications to adapt it to our case. The stinger apparatus was gently pulled from the tip of the animal abdomen by forceps. The venom reservoir (about 1 mm in length, white and transparent) was collected and separated from the stinger apparatus, then washed with water to eliminate contaminants from the intestinal tract. Each venom reservoir was pressed against the Eppendorf tube wall to collect the venom inside. The empty reservoir was then removed with forceps from the tube. 100 μ L of ultra-pure water was added and the tube was then homogenized in vortex, followed by a centrifugation step at 10 000 xg for 15 min at 4°C. The supernatant was then collected, filtered through a 0.22- μ m syringe filter (Merck, Germany) and stored at -20°C. This venom solution was named Vv (Venom *Vespa velutina*) in our study. The venom protein concentration was determined by Bradford assay [42] (Bio-Rad Protein Assay protocol for microtiter plate) and found to contain a concentration of protein of 18.75 mg protein/mL.

Thin layer chromatography (TLC) collection: “targeted method”

The 10x20 cm TLC silica gel 60 F₂₅₄ glass plate (Merck) used for this separation method was pre-washed with methanol to eliminate contaminants. Different development solvent systems for TLC separation were screened and the optimized elution solvent system was selected (**Annexe 2, figure A.1**) and used in the present study.

Then 7 μ L of venom (Vv) was diluted in 20 μ L of water and spotted in four bands (5 μ L/band) to collect a significant amount of active spots and two control bands (1 μ L/band) for antioxidant detection and revelation with ninhydrin on the plate by a TLC autosampler (Linomat IV, CAMAG Muttenz, Switzerland). The instrumental parameters were as follows: a band 10 mm in length at the constant application rate of 5s/ μ L, a space of 8 mm between each band and a 20 mm start position. The plate was developed with the selected development solvent (1-butanol/acetic acid/water, 4:1:2, v/v/v) without the chamber pre-condition until the migration line reached 7 cm. The parts of the TLC plate containing each control band after elution were separated from the rest of the plate. The control band for antioxidant detection was revealed by manually dipping the plate in the 0.05% DPPH methanolic solution [43]. The other control band was used for peptide-amino acid detection and was sprayed with a 0.1% ninhydrin ethanolic solution. The samples were then heated in a drying

oven at 110°C for 5 min. In the part of the plate containing bands for venom collection, the antioxidant spot was obtained by scraping the band at the same R_f as the antioxidant band observed in the control band. The extraction of active compounds was carried out according to the protocol of Zhang et al. [44] with the following modifications. Briefly, the silica powder was extracted with 200 μ L of ultra-pure water and incubated in ice for 20 min (vortex for 2 min was performed twice). The extraction procedure was repeated once to recover as much active compound as possible. Then, the mixture was centrifuged twice at 12000 xg at 4°C for 20 min to collect the pre-cleared supernatant, the supernatant was lyophilized and stored at -20°C.

RP-HPLC-DAD collection: “non-targeted method”

10 μ L of venom (Vv) was precipitated with 40 μ L of ice cold methanol [45] (solvent screening result not shown) for 20 min at -20°C to eliminate proteins. The supernatant was then recovered after a centrifugation step at 10 000 xg for 10 min at 4°C. The precipitation process was repeated twice and the supernatants were pooled and named Vv0. 15 μ L of Vv0 supernatant was injected into the HPLC Agilent 1100-DAD system through the 2x125 mm LiChroCART Purosphere Star RP-18 endcapped 5 μ m column (Sigma Aldrich, France). The column was maintained at 30°C and eluted using a linear gradient with solvent A containing 0.1% formic acid in water and solvent B containing 0.1% formic acid in acetonitrile: 2-5% solvent B in 5 min and 5-50% B from 5 to 15 min, then an increase to 60% B in 5 min at a constant flow rate of 0.3 mL/min. The fractions were manually collected following the peak detection at 214 nm, 254 nm and 280 nm and lyophilized and stored at -20°C.

DPPH assay for antioxidant activity

The lyophilized fractions acquired from TLC-DPPH or RP-HPLC-DAD separation were re-dissolved in the initial volume of crude venom used in each separation method. The crude venom Vv was then diluted with ultra-pure water to obtain a concentration of 28 μ g protein/mL. The fractions were also diluted with the same dilution factor as the crude venom to ensure that the percentage of each compound in the fractions was equivalent to that in the crude venom. The DPPH assay was subsequently performed in a 96-well microplate with these fractions.

The radical scavenging activity (RSA) of venom was evaluated by the DPPH assay, following a previously described method [46]. 100 μ L of solution of Vv crude venom, Vv0 precipitated venom or fraction from TLC and HPLC were added in triplicate to the 96-well microplate. For IC_{50} determination of crude venom, various concentrations in ultra-pure water were prepared between

0.24 to 31.25 µg protein/mL. 100 µL of 0.2 mM DPPH methanolic solution was then added to each well. The plate was shaken manually, kept in darkness at 37°C for 30 min before reading the absorbance at 515 nm using a Thermo scientific Multiskan GO UV/Vis microplate spectrophotometer. Ultra-pure water and ascorbic acid were used for blank and positive control, respectively. Radical scavenging activity (RSA) was determined as the percent of DPPH inhibition. The IC₅₀ of these compounds was graphically determined by Graphpad Prism 6.0 (USA) and used for antioxidant activity comparison.

Identification of antioxidant compounds by high resolution mass spectrometry

The fractions showing the highest % RSA in both approaches TLC and HPLC-DAD were analyzed with RP-HPLC-MS using the Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Darmstadt, Germany) coupled with a Bruker Daltonik ESI-QTOF-HRMS system (Bremen, Germany). 1 µL of the fraction was injected into a Acquity Waters 2.1x50 mm BEH C18 1.7µm column (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) maintained at 42°C and eluted at a flow rate of 0.5 mL/min with a gradient starting at 2% of solvent B, maintained for 0.2 min and increased to 50% of solvent B from 0.2 to 3 min (solvent A consisted of 0.1% formic acid in water and solvent B was 0.08% formic acid in acetonitrile). The eluate was then loaded into an ESI-QTOF-MS mass spectrometer system with the following parameters: 4500V of capillary voltage; 2.0 bar of nebulizer gas; 9.0 L/min at 200°C of dry gas; 1 Hz of frequency and the spectrum was acquired in positive mode over the range 50-1660 m/z. The MS/MS scans were carried out with the peak of interest obtained at the collision energies of 10 eV, 20 eV, and 30 eV. The data were handled by Compass DataAnalysis software (Bruker) and submitted to the online MassBank database (<https://massbank.eu/MassBank/>) for identification.

Human keratinocyte cell culture and treatments

The immortalized human keratinocyte cell line HaCaT was obtained from ATCC, cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 50 IU/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin and 2 mM glutamine and maintained in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ at 37°C. Before treatment, the cells were plated at a density of 2x10⁴ cells/well in 96-well plates overnight to reach about 90% of confluence the following day and then treated with venom extracts or purified molecules in serum-free media. For the cytotoxic assay, the Cell Proliferation kit II (XTT- Roche) was employed to evaluate the potential toxicity of extracts according to the manufacturer's instructions. Briefly, at the indicated time post-treatment,

the XTT solution at a final concentration 0.3 mg/mL was added to each well and incubated for 4 hours at 37°C to form orange-colored formazan produced by viable cells. The intensity of coloration was then quantified by measuring the absorbance with a specific absorbance filter at 450nm using a Victor spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The data were expressed as percentage of viability by normalizing the absorbance value detected in non-treated cells to the arbitral value of 100 %. For the ROS protection assay, the cells were also plated in 96-well plates as indicated above but treated with the compounds for six hours at 5 % CO₂ at 37°C before loading the 200 µL of 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate at 10 µM in PBS (DCF-DA Sigma Aldrich, France) for 20 min. After a quick wash in PBS, the plate was irradiated at 25 mJ/cm² and then incubated for 30 min at 37°C at 5% CO₂. Then, the fluorescence values at 485-535 nm were read with the same spectrophotometer. Non-UVB irradiated cells were used as internal control to measure the basal level of ROS content in cells. The final data were expressed as the percentage of ROS production by normalizing the absorbance value detected in non-treated cells to the arbitral value of 100 %. All experiments were repeated at least three times in triplicate.

Statistical analysis

The tests were carried out in triplicate or in quintuplicate and performed at least twice. The significant difference between bioactivity values was evaluated by an ANOVA test. These statistical analyses were done with Rstudio software (version 1.0.153) and statistical significance was set at $p < 0.05$. Graphpad Prism 6.0 was used to construct IC₅₀ and graphics in inhibition activity.

Results and discussion

Antioxidant activity of *Vespa velutina* crude venom

First, a simple assay was applied to quickly screen for compounds possessing antioxidant activities. The DPPH assay is an easy, sensitive and rapid method for investigation of the free radical scavenging activity of a compound by spectrophotometry [47]. The results of this assay shown in the **Figure 1.A** demonstrated that *V. velutina* venom (Vv) has a free radical scavenging property. Remarkable significant inhibition of DPPH was observed in a dose-response manner. The IC₅₀ of *V. velutina* venom Vv was graphically calculated as 13.050 µg protein/mL.

The antioxidant activity of *V. velutina* venom was then tested in HaCaT immortalized human keratinocytes exposed to UVB as a source of ROS induction. This assay is considered as a crucial criterion for the screening of antioxidant activity in vitro [48].

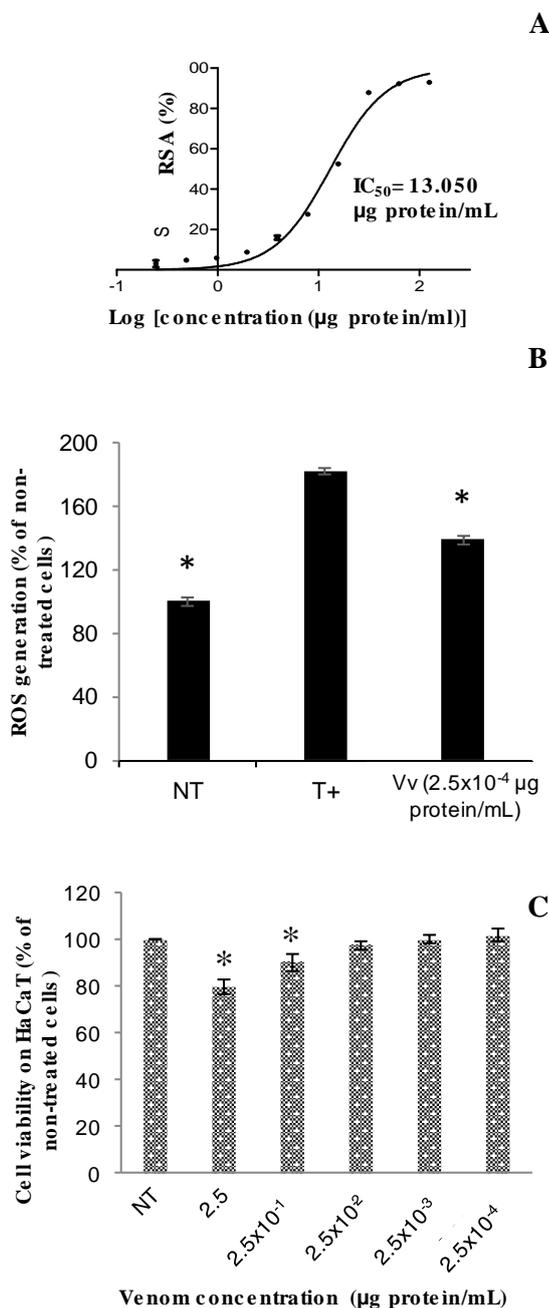


Fig. 1. Antioxidant activity evaluation of *Vespa velutina* venom (Vv). (A) Dose-response curve of *V. velutina* venom on DPPH radical scavenging activity assay measured at 515 nm. These results are representative of three independent experiments, the value is expressed as Mean \pm SD, n=3. RSA: Radical scavenging activity. IC₅₀ was calculated by Graphpad Prism 6.0. (B) Reactive oxygen species (ROS) reduction effect of *V. velutina* venom (Vv at 2.5x10⁻⁴ ug protein /mL) in HaCaT cells irradiated by UVB, the cells were treated with venom for six hours.

NT: Non-treated cells, T+: HaCaT cell irradiated with UVB without adding venom, *: significant discrimination versus T+ group at $p < 0.05$ in ANOVA test (R software). (C) XTT cytotoxicity assay of *V. velutina* venom in HaCaT cells for 48h. The value is expressed as Mean \pm SD, $n=3$. NT: Non-treated cells. *: significant discrimination versus non-treated group at $p < 0.05$ in ANOVA test (R software).

According to **Figure 1.B**, irradiation of HaCaT cells with UVB (named T+) resulted in a substantial production of ROS. Remarkably, when the cells were pre-incubated with *V. velutina* venom for six hours, a significant reduction in ROS production was detected at 2.5×10^{-4} μg protein/mL, resulting in a 43 % of ROS inhibition. We performed a cytotoxicity assay to determine the concentration of venom that was well tolerated by the cells, as the relative toxicity of compounds at low concentration is a key point when considering a potential human application. Our results from the XTT assay, shown on **Figure 1.C**, demonstrated a slight toxicity of the venom at concentrations of 2.5×10^{-1} and 2.5 μg protein/mL. No significant toxicity was observed when the concentration of venom tested ranged from 2.5×10^{-4} to 2.5×10^{-2} μg protein/mL after 48 hours of incubation. It has been recently reported that bee venom (*Apis mellifera* L.) induces a strong toxicity (60% loss of cell viability compared with the control) in HaCaT cells at 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [14]. Our results demonstrate therefore that *V. velutina* venom is better tolerated by HaCaT cells than the bee venom. These results prompted us to identify the molecules responsible for this activity. Detection and isolation of antioxidant compound in TLC plate.

The advantage of the DPPH assay is that antioxidant spots can be directly detected on the plate and the active fractions visible on the surface can then be collected by scraping. It is known from the literature that peptides and amino acids can be separated by thin layer chromatography [49], [50]. In a second step, we therefore conducted TLC separation of *V. velutina* venom (Vv) whose composition is rich in proteins, peptides and amino acids.

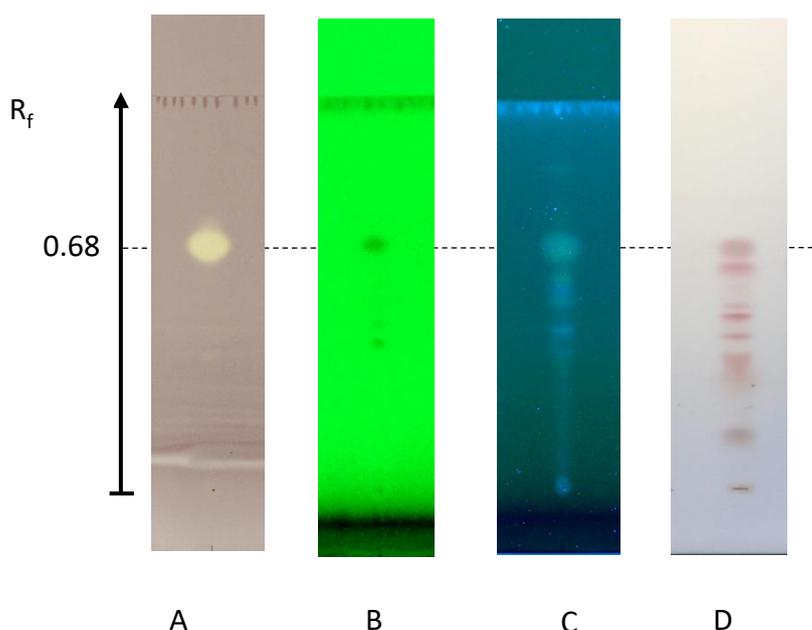


Fig. 2. *DPPH scavenging activity detection and separation of Vespa velutina venom (Vv) on TLC silica gel plate 60. The elution solvent was 1-butanol : acetic acid : water = 4:1:2 (v:v:v) in 90 min. (A) Detection by immersing in DPPH 0.05% solution. The yellow zone on the purple background detected by DPPH presents an antioxidant activity. (B) UV detection at 254 nm. (C) UV detection at 366 nm. (D) Detection by spraying with ninhydrin 0.1% solution. The orange/yellow zone indicates the presence of primary or secondary amines in the molecule.*

As shown in **Figure 2.A**, one intense yellow spot was detected with DPPH 0.05% methanolic solution at the $R_f = 0.68$ while no yellow spots were detected in the elution zone. It was therefore deduced that the compounds responsible for the antioxidant activity of the venom were mainly located in this yellow spot. To obtain more information on the property of this spot, different detection methods were applied. As shown in **Figure 2.B** and **2.C**, this spot can be detected under a UV lamp at 254 nm or 366 nm. It was assumed to possess conjugated C=C double bonds in the structure. The ninhydrin reagent is used to detect ammonia and primary amines by generating a purple Schiff base compound, or a yellow-orange iminium salt in the case of secondary amines [51]. **Figure 2.D** shows that there are many purple bands, indicative of the amine-rich profile of *V. velutina* venom (Vv). The spot at $R_f = 0.68$ reacted with ninhydrin solution and produced a purple spot. Therefore, we hypothesized that molecules present in the yellow spot possessed structures containing the amine group. This spot (named S-TLC) was then scraped for in-plate antioxidant activity and structure identification [44].

Isolation of the compound of interest by RP-HPLC

Although the TLC technique is simple and rapid, it can be contaminated by interferences from the migration system and it has a poor recovery for spot collection. RP-HPLC was therefore carried out to enable comparison with antioxidant isolation on the TLC plate. Several fractions were collected to determine which of them had an antioxidant activity using a DPPH assay in a microtiter plate. The previous TLC results indicated that this main spot corresponds to a peptide or simple amino acids. Therefore, we eliminated the protein of *V. velutina* venom (Vv) by precipitation with the organic solvent method [45] (methanol was chosen as the most suitable and effective solvent compared to acetone and acetonitrile, result not shown) before injection into the HPLC system.

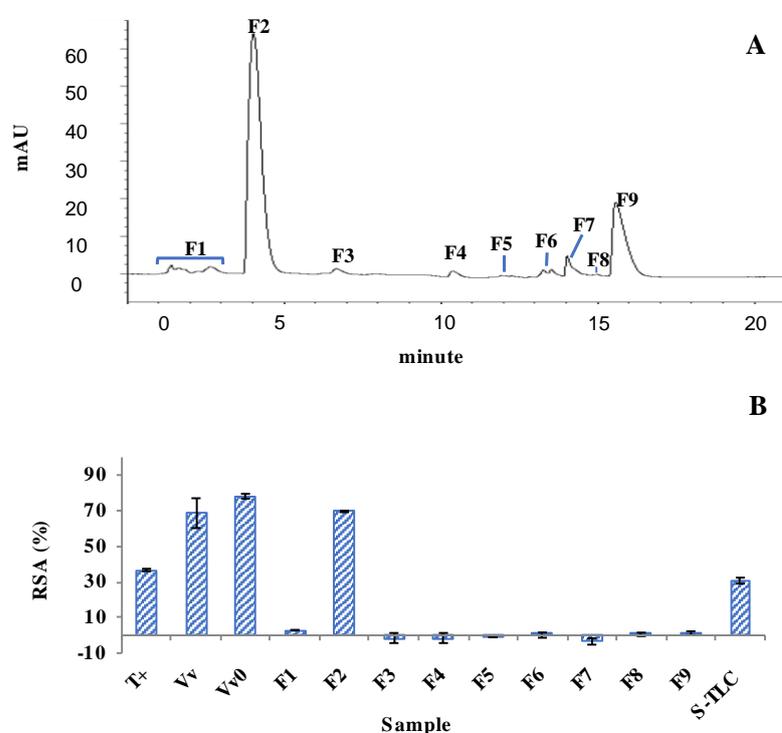


Fig. 3. RP-HPLC chromatogram of precipitated venom (Vv0) and active antioxidant detection by DPPH scavenging activity assay (A) RP-HPLC-DAD profile of precipitated venom at 254 nm (B) DPPH scavenging activity assay of RP-HPLC-DAD fractions and TLC-active spot.

As can be seen from **Figure 3.A**, nine fractions were separated from the venom by RP-18 HPLC-DAD at 254 nm and their antioxidant activities were evaluated as shown in figure 3.B. To verify the influence of the protein precipitation step, the antioxidant activity of crude *V. velutina* venom (Vv) and precipitated venom (Vv0) were investigated. **Figure 3.B** shows that antioxidant activity was mostly retained after precipitation. Among the HPLC fractions, only fraction F2 collected at 4 min

showed a marked DPPH scavenging activity (69.59%). It is thought that F2 might be the main fraction responsible for the antioxidant activity of *V. velutina* venom (Vv). The abundant fraction F9 (high absorbance at 254 nm) was used as a non-active reference for antioxidant identification. In parallel, the antioxidant activity of the active spot collected from the TLC approach was also confirmed with the DPPH assay. However, only mild inhibition was observed in comparison with that of F2, indicating that the quantity of active molecules that can be collected by TLC is much lower than that obtained by HPLC.

Identification of antioxidant compound

The active spot $R_f = 0.68$ (S-TLC) from the TLC method and the active fraction F2 from the RP-HPLC method were analyzed by LC-MS. The non-active fraction (F9) was used as negative control. Their LC-MS profiles were studied to compare the targeted and non-targeted approaches and identify the antioxidant compound. As can be seen from **Figure 4.A**, the S-TLC and F2 fractions contain a common peak at $t_r = 0.95$ min which was not present in the non-active fraction F9, indicating that this peak is the main molecule responsible for the antioxidant activity.

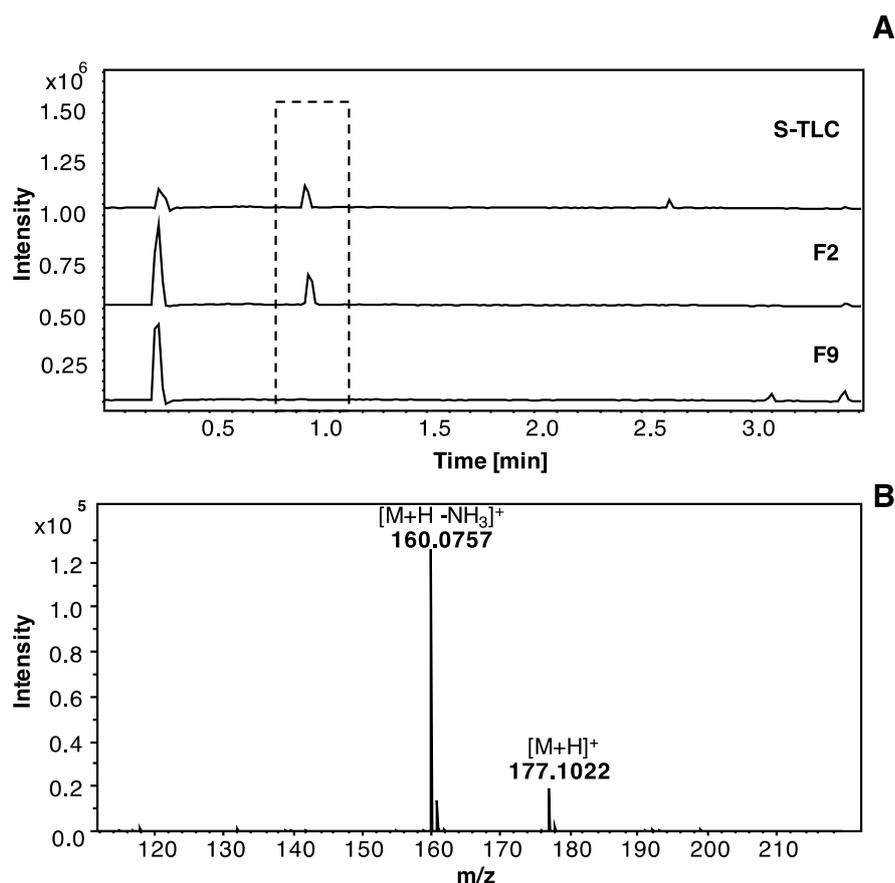


Fig. 4. LC-MS profile of active fraction obtained from TLC and RP-HPLC separation. **(A)** Comparison of LC-MS profiles among active spots scraped from TLC glass plate, RP-HPLC active fraction and RP-HPLC non-active fraction. The dotted line indicates the coincident peak of two active fractions obtained from two distinct collection methods (S-TLC and F2). This peak is not present in the non-active fraction (F9). **(B)** Mass spectrum of coincident peak at the $t_r = 0.95$ min.

The mass spectrum corresponding to the peak at $t_r = 0.95$ min reveals a single-charge ion $[M+H]^+$ at m/z 177.1022 with a major fragment $[M+H-NH_3]^+$ m/z 160.0757 (**Figure 4.B**). Using the Smart formula tool (Compass DataAnalysis software, Bruker), we deduced that this ion corresponds to a compound with a molecular weight of 176.0943 Da and with a molecular formula $C_{10}H_{12}N_2O$ (the mass error of ion $[M+H]^+$ is 0.1 ppm, $m\sigma = 8.5$, theoretical mass $[M+H]^+ = 177.1023$). Additionally, the MS/MS profile of ion $[M+H]^+$ at m/z 177.1022 was acquired by FIA-ESI-QTOF-HRMS/MS at different collision energies (10 eV, 20 eV, 30eV) from the two active fractions. On applying the MS/MS profiles to the online database library (<https://massbank.eu/MassBank/>), the active compound present in the F2 and S-TLC fractions was determined as serotonin. The standard serotonin analyzed in MS/MS showed a similar mass fingerprint (**Figure 5.A** and **5.B**).

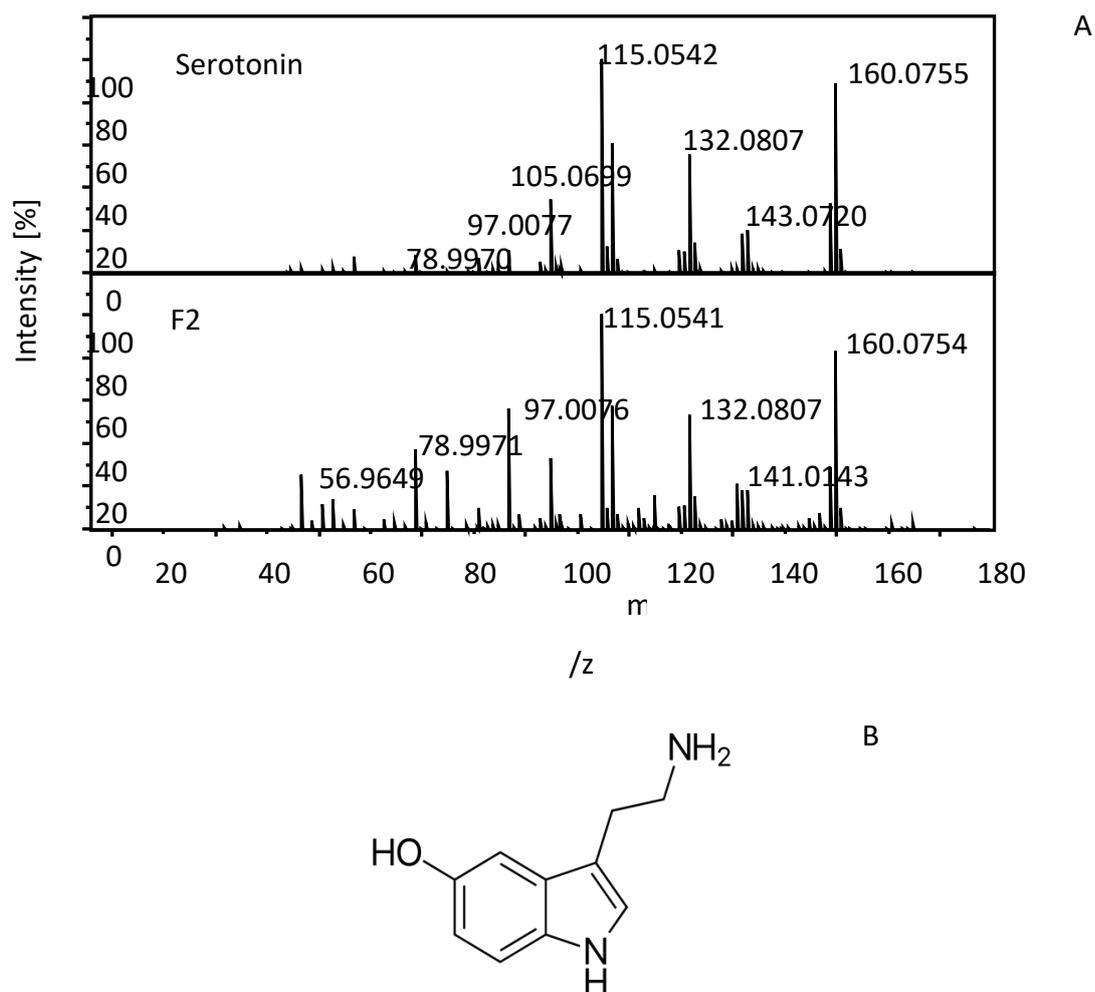


Fig. 5. Coincident peak characterization. (A) MS/MS profile at the collision energy 30 eV of *m/z* 177.1022 of serotonin (upper spectrum) and active fraction F2 (lower spectrum). **(B)** Primary chemical structure of serotonin.

Serotonin antioxidant activity evaluation

To confirm serotonin as the compound responsible for antioxidant activity in *V. velutina* venom (Vv), a serotonin standard was tested for its antioxidant property by DPPH assay on a TLC plate (**Annexe 2, Figure. A2**). Results of this experiment indicate that serotonin presents a strong antioxidant activity as demonstrated by the presence of a yellow spot at the same $R_f = 0.68$ as that of crude venom. Moreover, in the detection with ninhydrin 0.1%, serotonin also displays a purple-orange spot at $R_f = 0.68$, which can be explained by its amine structure containing one primary amine and one secondary amine (see **Figure 5.B**).

The antioxidant property of serotonin was then quantified with DPPH assay in 96-well microtiter plates, in the same conditions as those used previously. As shown in **Figure 6.A**, serotonin inhibits free radicals in a dose-dependent manner. The IC_{50} value of serotonin was lower than the IC_{50} of ascorbic acid (3.578 $\mu\text{g/mL}$), suggesting that serotonin has a stronger free radical scavenging capability in DPPH assay than ascorbic acid. This result is consistent with the result reported in a recent study that demonstrated that serotonin possesses high free radical scavenging properties [52]. In this context, we wanted to evaluate if serotonin was well involved in the antioxidant mechanism of HaCat cells and then compare with the results obtained on our venom.

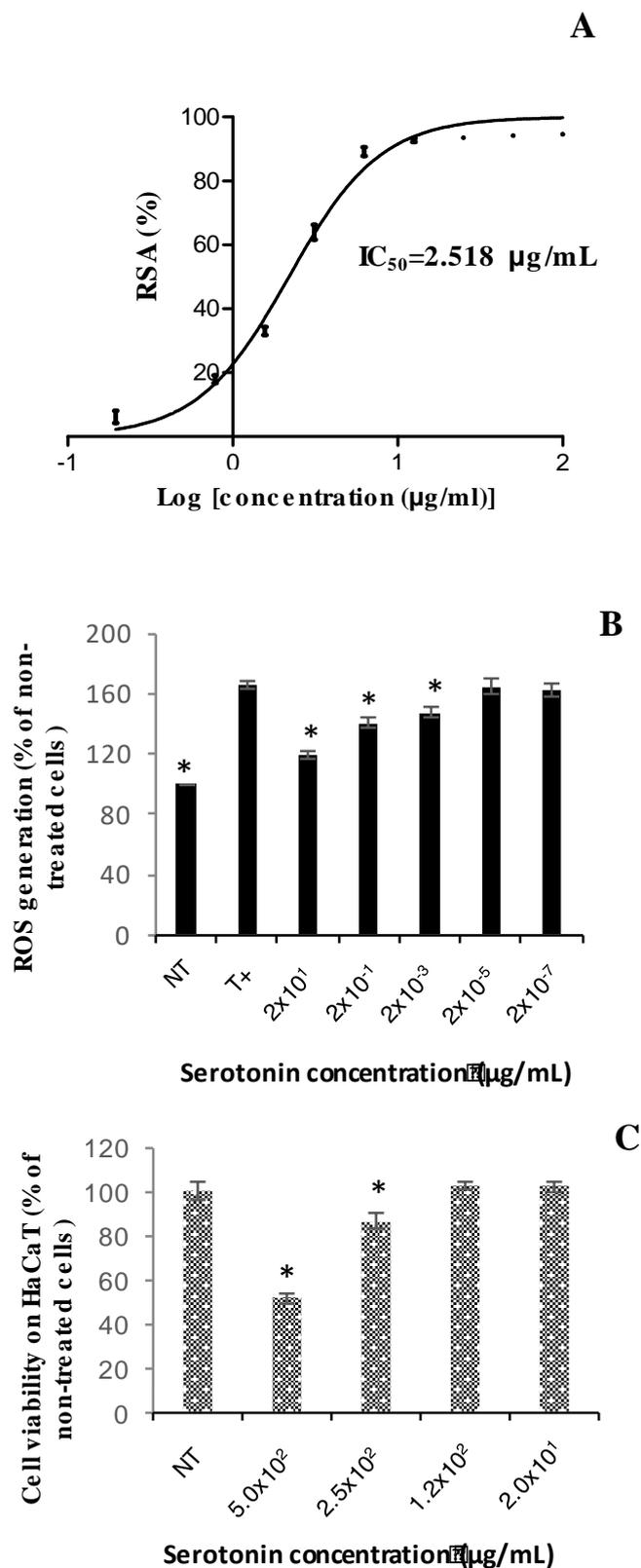


Fig. 6. Figure 6: Antioxidant activity of serotonin. (A) Dose-response curve of serotonin in DPPH scavenging activity assay measured at 515 nm, results are expressed as Mean \pm SD, $n=3$. RSA: Radical scavenging activity. IC_{50} was calculated by Graphpad Prism 6.0. **(B)** Reactive oxygen species (ROS) reduction effect of serotonin in HaCaT cells irradiated by UVB, the cells

*were treated with venom for six hours. Results are expressed as Mean \pm SD, n=3. T+: HaCaT cell irradiated by UVB without adding venom. NT: Non-treated cells *: significant discrimination versus T+ group at $p < 0.05$ in ANOVA test (R-software). (C) XTT cytotoxicity assay of serotonin in HaCaT cells for 48h. Results are expressed as Mean \pm SD, n=3. NT: Non-treated cells *: significant discrimination versus non-treated group at $p < 0.05$ in ANOVA test (R software).*

Serotonin was then tested in the concentration ranging from 20 and 2×10^{-7} $\mu\text{g/mL}$ in the ROS cellular assay to evaluate the potential of its antioxidant property in keratinocytes. As shown in **Figure 6.B**, serotonin significantly decreases the production of ROS in HaCaT cells exposed to UVB in comparison with the positive control (T+) with a dose-response effect ranging from 20 $\mu\text{g/mL}$ to 2 ng/mL ($2 \times 10^1 - 2 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$). Below these concentrations values none anti-ROS activity was detected.

The cytotoxicity assay revealed that serotonin is not toxic for the HaCaT cells up to 125 $\mu\text{g/mL}$ (equivalent to 710 μM) (**Figure 6.C**). Apparent toxicity was detectable from intermediate to high concentration (from 250 $\mu\text{g/mL}$ to 500 $\mu\text{g/mL}$) with a dose-response effect. Consequently, we demonstrate that serotonin has a considerable protective property against oxidation in HaCaT cells exposed to UVB. In a recent paper, serotonin was demonstrated to decrease the viability of HaCaT cells when a concentration >10 μM was used; the effect was even more pronounced when a concentration >100 μM was evaluated [53]. Additionally, serotonin was not found to have any inhibition property against ROS produced in HaCaT cells exposed to H_2O_2 at concentrations of 1 μM and 10 μM . In another review, serotonin was described as a causative agent for increased ROS generation in diabetes mellitus [54]. In our study, the results show that serotonin has a cytoprotective property in UVB-irradiated HaCaT cells at a low concentration and is not toxic at a higher concentration. These results were also supported by research into the mechanism involving serotonin as an antioxidant agent and its interaction with lipid membranes, protecting them from oxidation [55]. Moreover, a conformational space study of serotonin recently indicated that the structure of the indole ring is a reactive site for free-radical scavenging activity [56].

Although our study has succeeded in confirming the antioxidant property of serotonin found in Asian hornet venom on UVB-irradiated keratinocyte cells, it is necessary to discuss the role of serotonin in the venom and the impact of this compound on the human health.

Serotonin is a well-known neurotransmitter with vasoactive, immunomodulatory, and growth factor properties. This compound produces pro-inflammation, vasodilation and pro-edema [57]. In some studies, serotonin is reported to be frequently well represented in Vespid venom and to be derived from tryptophan in venom-producing cells. This bioactive amine is generally considered to be the major pain-producing factor in Vespid venom for defense purposes, in particular toward vertebrate attackers [31], [58]. In the case of marine snail venom, serotonin has been known to induce muscular paralysis or vasodilation in prey, thereby increasing the distribution of the other venom compounds [58].

In human skin, the detection of serotonin and serotonergic machinery including its transporters and receptors in the epidermis have proved the serotonin production capability of this organ. This expression may be involved in the regulatory function of the skin and serotonin may be part of this system [57], [59]. Another study has shown that serotonin can enhance cell proliferation and cell migration in both keratinocytes and fibroblasts, making serotonin a potential therapeutic candidate for wound healing [60]. Therefore, in an injection of Asian hornet venom into the human skin, serotonin will certainly react as a pain-producing molecule but will also simultaneously induce the effects related to its strong antioxidant property and its impact on the skin serotonergic system.

Conclusions

This study is the first to investigate the antioxidant activity of Asian hornet venom (*Vespa velutina nigithorax*). We demonstrate that this venom showed an inhibition capability against HaCaT intracellular Reactive Oxygen Species at a low concentration (2.5×10^{-4} μg protein/mL) without cytotoxicity.

A biotechnologically-oriented strategy was developed using TLC-DPPH targeted and HPLC-DPPH non-targeted separation methods to purify the active fraction. Serotonin was identified by UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS as the major active compound responsible for free radical scavenging activity in this venom. These results contribute to current knowledge in bioactivity research of *Vespa velutina nigithorax* and the methodology applied in this study can be exploited in the search for other biological targets and topics.

Author contributions section

LE Thao Nhi: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Validation, Investigation, Writing - Original Draft. David DA SILVA: Funding acquisition, Conceptualization, Project

administration, Writing - Review & Editing. Cyril COLAS: Investigation, Eric DARROUZET: Re- sources, Patrick BARIL: Investigation, Writing - Review & Editing. Lucie LESEURRE: Conceptualization. Benoît MAUNIT: Project administration, Supervision, Writing - Review & Editing.

Acknowledgment

We express our acknowledgement to Mr. Yoan LAURENT of the Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, CNRS UPR4301) for the XTT cytotoxicity and ROS assay performed on HaCaT cells. This research was supported by ARD 2020 Cosmetosciences, a global training and research program dedicated to the cosmetic industry. Located in the heart of the cosmetic valley, this program led by University of Orléans is funded by the Région Centre-Val de Loire.

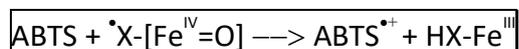
2.2 Étude des différents mécanismes antioxydants du venin et de la sérotonine

En complément de l'étude précédente, d'autres techniques de dosage appropriées ont été également mises en œuvre afin d'évaluer l'efficacité antioxydante du venin brut et de la sérotonine. Aussi, nous discuterons ci-après sur les résultats concernant l'utilisation de la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), le test de la réduction du fer FRAP (*Ferric reducing-antioxidant power*) et le test indirect de l'activité de l'enzyme Superoxyde dismutase (SOD).

2.2.1 Résultats de la méthode TEAC

L'activité antioxydante du venin brut **Vv**, de la fraction de **Vv >10 kDa** et **Vv < 10 kDa** (100 µg/mL) et de la sérotonine (5 µg/mL) est évaluée par la méthode TEAC selon le protocole SigmaAdrich (CS0790) présenté à l'**annexe 1, tableau A.6**.

La méthode TEAC est une technique spectrophotométrique basée sur l'utilisation d'un radical cationique coloré (**bleu vert**) stable, l'ABTS•+ (acide 2,2'-Azino-bis-(3-éthylbenthioazoline-6-sulfonique), qui se décolore lorsque **réduit par un antioxydant** (mesure spectrophotométrique à **405 nm**), suite à un transfert d'électron :



La formation d'un radical de ferryle myoglobine ($\cdot\text{X-}[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$) à partir de réaction de métmyoglobine ($\text{HX-Fe}^{\text{III}}$) avec le peroxyde hydrogène (H_2O_2) induit l'oxydation de la molécule ABTS vers un cation radicalaire $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Une molécule de référence, le Trolox, (acide (+)-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxilique), est utilisée afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux. Il s'agit d'un analogue structural hydrosoluble de la vitamine E.

Dans ce test, la capacité antioxydante en équivalent Trolox® (TEAC) correspond à la **concentration (mmol/L ou mg/L) de Trolox®** ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester.

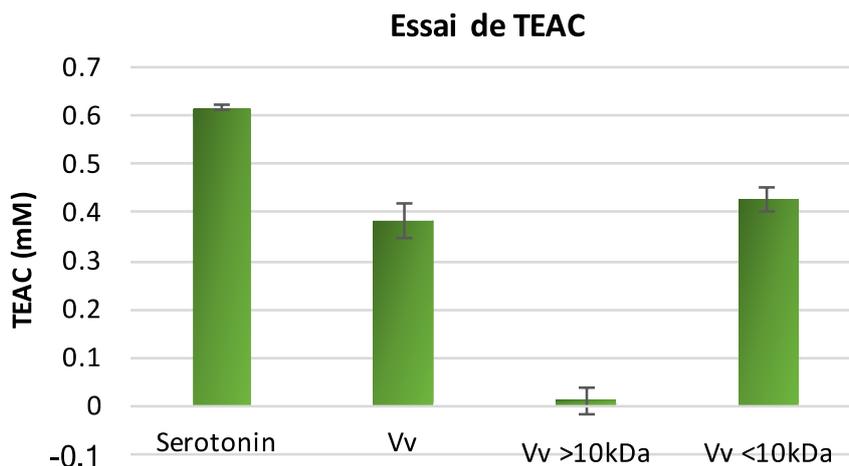


Figure III.4 : Mesure de l'activité antioxydante du venin brut **Vv** et des fractions **Vv < 10 kDa** et **Vv > 10 kDa** par la méthode TEAC T, n=3

D'après la **Figure III.4**, le venin brut et la fraction de venin **Vv < 10 kDa** indiquent tous deux des valeurs de TEAC très proches de l'ordre de 0.4 mmol/L alors que la fraction de venin **Vv >10 kDa** ne montre **aucune activité antioxydante**. La **sérotonine**, quant à elle présente une **activité significative** à la concentration testée 5 ug/mL. Il apparait ici que la fraction du venin **Vv < 10 kDa** « porte » l'activité antioxydante du venin de frelon asiatique et que parmi les molécules constitutives de cette fraction, la **sérotonine semble jouer une grande part** dans ce rôle **anti-radicalaire**. À noter que le principal inconvénient de cette méthode est que celle-ci est basée sur l'hypothèse que les réactions d'oxydoréductions se déroulent rapidement, de sorte que toutes les réactions soient terminées entre 4 et 6 en une dizaine de minutes. Or, il existe des réactions d'oxydoréductions plus lentes. Donc la méthode n'est pas adéquate pour toutes les réactions, ce qui peut donner conclusions erronées si la fin de réaction n'est pas atteinte.

2.2.2 Résultats sur le test de la réduction du fer FRAP

Les antioxydants sont, également ici, déterminés par colorimétrie. Le complexe ferrique-tripyridyltriazine $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$, réduit en la forme ferreux-tripyridyltriazine $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ en présence d'antioxydants perd **sa couleur jaune pour un bleu foncé**. Cette coloration mesurée après 4 minutes à **593 nm** est proportionnelle à la concentration en antioxydants présents dans les échantillons. Aussi, la formation de complexe ferreux indiquera un pouvoir réducteur qui détermine la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant.

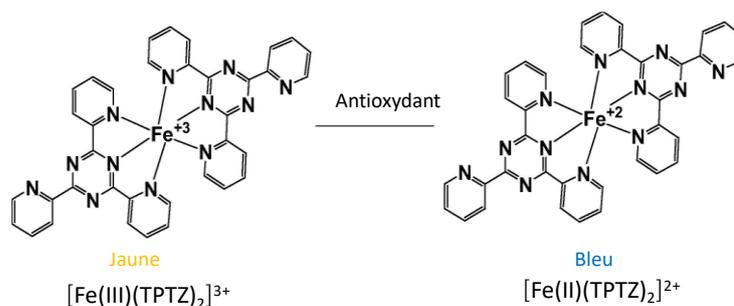


Figure III.5 : Mécanisme de réaction dans l'essai de FRAP [61].

Les valeurs sont comparées avec l'absorbance d'un **témoin qui est le sulfate de fer (II)** selon le protocole présent dans l'annexe 1, tableau A.7.

Concernant l'étude de l'acide ascorbique, on assiste à une réponse proportionnelle dose réponse et ce pour des concentrations allant de 1.6 µg/mL à 25 µg/mL. **La sérotonine** présente une activité antioxydante **plus importante que l'acide ascorbique** (augmentation d'un facteur 2) pour ces mêmes concentrations. Ce résultat est en accord avec une étude menée par l'équipe Chan et al (1996)[62].

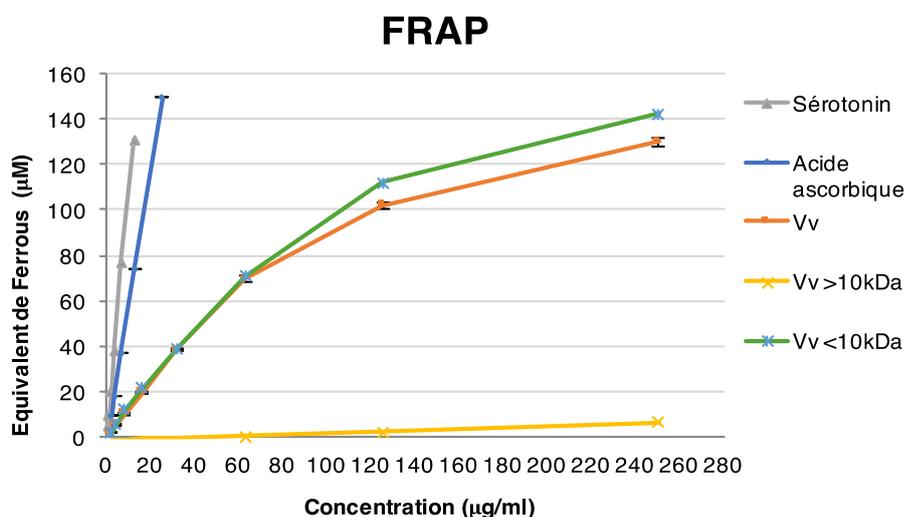


Figure III.6 : Mesure de l'activité antioxydante du venin brut Vv par le test de la réduction du fer, n=3

Nous constatons enfin pour le venin brut de frelon **Vv** et la fraction **Vv < 10 kDa** un effet dose-réponse (capacité antioxydante = f (concentration)). Néanmoins, l'effet antioxydant du venin brut (**Vv**) semble **légèrement plus faible** que celle de la fraction (**Vv < 10 kDa**). En effet, nous observons

une diminution d'environ 10 μM en équivalent complexe ferreux à 250 $\mu\text{g/mL}$. En parallèle, l'évaluation de l'activité de la sérotonine a permis de montrer un fort caractère antioxydant de cette molécule sur ce test ascorbique. A l'inverse, la fraction **Vv >10 kDa** ne présente **aucune activité significative** sur le test FRAP.

Ces résultats nous permettent de déduire que le venin brut **Vv** possède une activité antioxydante liée au mécanisme de **pouvoir réducteur**. On s'aperçoit ici que l'effet antioxydant du venin brut ne présente pas le même profil que celle de la sérotonine: aussi nous ne pouvons ici affirmer que l'effet **antioxydant du venin brut Vv** vienne exclusivement de la **présence de sérotonine**. En prenant en compte les résultats obtenus précédemment par la méthode TEAC, le test de la réduction du fer FRAP confirme que la capacité antioxydante du venin est **principalement due à la fraction Vv < 10 kDa**, de par la faible activité antioxydante du venin brut **Vv** montrée dans le test de la réduction du fer FRAP.

À noter que la principale limite de cette méthode réside, tout comme la méthode TEAC, dans le temps de réaction. Ainsi, le potentiel antioxydant des molécules, qui réagissent plus lentement et demandent un temps de réaction plus long pour leur détection, ne peut être mesuré par FRAP[63]. De plus, elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le groupe sulfhydryle SH, incluant les thiols, qui peuvent transférer l'hydrogène[64]. De plus, le pH à utiliser dans ce test est incompatible au domaine physiologique.

2.2.3 Résultats sur le test indirect de l'activité de l'enzyme Superoxyde dismutase (SOD)

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capter un radical libre, l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$. Ce radical est généré in vitro par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le sel de tétrazolium WST-1 [2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H tétrazolium] (**transparent**) en **formazan de couleur jaune** qui absorbe à **440 nm**. Ainsi un composé antioxydant capable de capter l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution **restera moins jaune**. Les absorbances obtenues permettent de calculer un **pourcentage d'inhibition de la réduction** du WST-1 par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composés antioxydants.

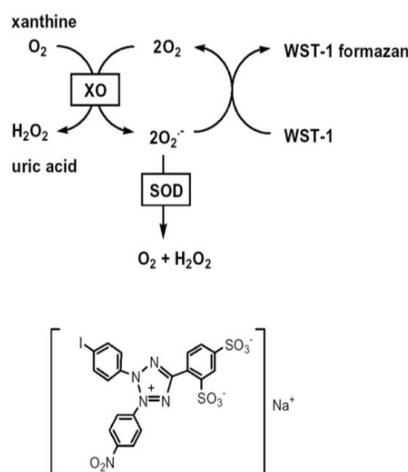


Figure III.7 : Principe de l'essai de SOD

2.2.3.1 Activité du venin brut et ses fractions protéique et peptidique sur l'activité SOD

Différentes études menées en utilisant ce test ont permis d'étudier des échantillons de venin brut **Vv** (200 $\mu\text{g/mL}$) et ses fractions **Vv >10 kDa** (200 $\mu\text{g/mL}$), **Vv < 10 kDa** (200 $\mu\text{g/mL}$) ainsi que la sérotonine (10 $\mu\text{g/mL}$). De plus, ces mesures ont également été menées sur les fractions F'1 à F'6. Le protocole SigmaAldrich (19160 SOD Determination Kit, SigmaAldrich) a été appliqué pour ce test et présenté dans l'annexe 1, tableau A.8.

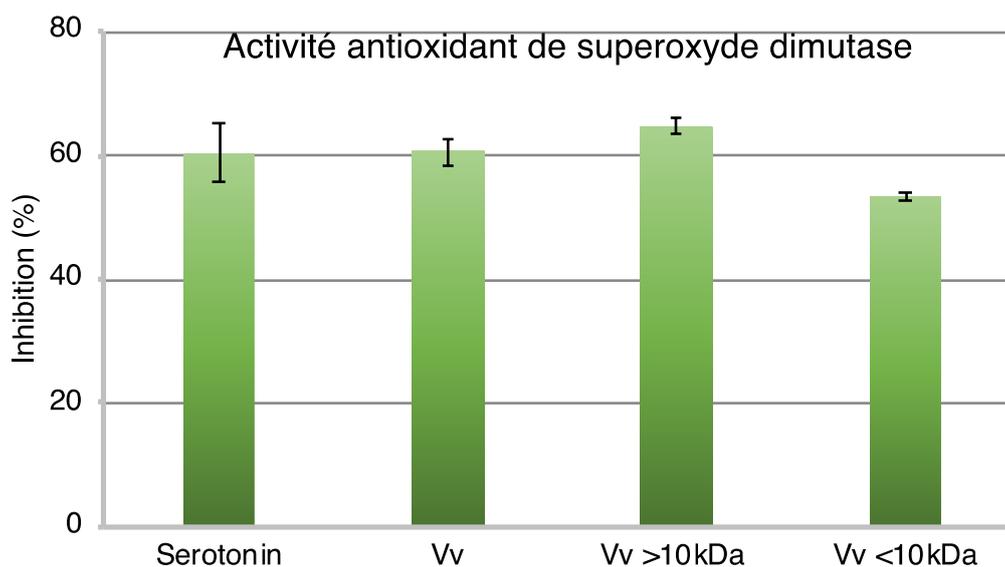


Figure III.8 : Mesure de l'activité antioxydante du venin brut **Vv** et des fractions **Vv < 10 kDa** et **Vv > 10 kDa** par le test indirect de l'activité de l'enzyme Superoxyde dismutase (SOD)

La **Figure III.8** indique une activité antioxydante similaire que ce soit pour la sérotonine à 10 µg/mL ou le venin brut à 200 µg/mL. Concernant les deux fractions supérieure et inférieure à 10 kDa à une concentration de 200 µg/mL, la seconde montre **une activité antioxydante plus faible que le venin brut**. Cela est quelque **peu contradictoire** avec les résultats obtenus avec le test TEAC qui laissait apparaître un effet antioxydant essentiellement dû à la fraction **Vv <10 kDa**. Nous pouvons également soulever **une faible augmentation** de l'activité antioxydante de la fraction **Vv >10 kDa** en comparaison avec le **venin brut**. Compte tenu des résultats, notamment obtenus sur la fraction protéique supérieure de 10 kDa, nous avons décidé de fractionner l'échantillon de venin brut en fraction protéique afin d'affiner la masse des protéines d'intérêt. Pour cela, nous avons soumis les échantillons de venin brut à une chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

2.2.3.2 Protocole de fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Le venin brut a été fractionné sur une la colonne Superdex 75 Increase 10/300 GL avec une phase mobile composée d'acétate d'ammonium **0.1 M, pH=5, filtrée à 0.22 µm**. **1.75 mg** de venin brut (**Vv**) a été solubilisé dans 100 µl du tampon d'élution et injecté manuellement dans le système AKTA pure. L'élution est faite avec **1.5 volume de colonne** (1 volume de colonne (CV) = 24 mL) au débit de **0.8 mL/min**. La collecte des fractions est faite automatiquement avec détection par spectrophotométrie UV-visible à $\lambda = 280 \text{ nm}$ et le volume de chaque fraction dépend le signal de pic détecté dans le chromatogramme. Le profil protéique de chaque fraction a été étudié sur électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) à 12 % et 15 % d'acrylamide. Étude des fractions obtenues en chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC), basée sur la séparation des protéines par tamisage moléculaire, permet ainsi de séparer les constituants moléculaires du venin brut **Vv** selon leur masse moléculaire. **14 fractions ont été collectées (Figure III.9)** et pour chacune de ces fractions a été effectué le profil protéique sur SDS-PAFGE 15 et 12 %.

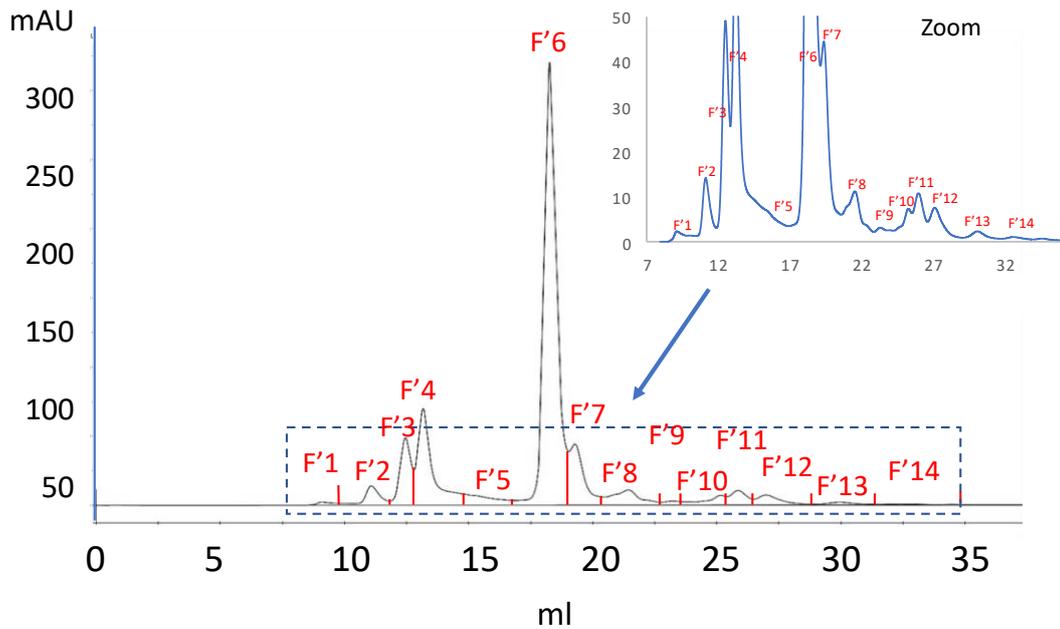


Figure III.9 : Analyse du venin brut **Vv** par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) avec détection spectrophotométrique à 280 nm

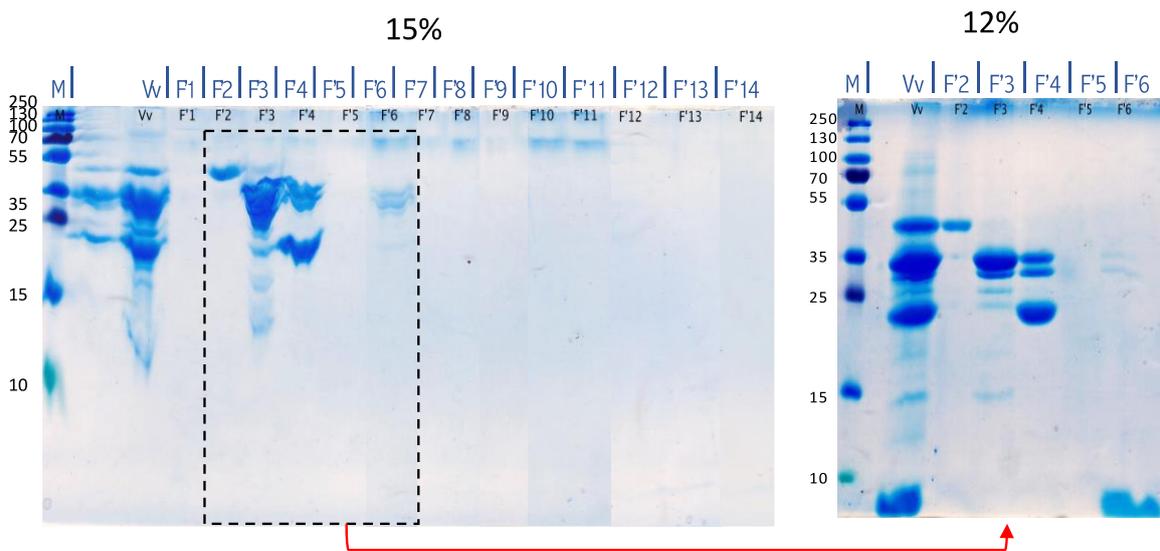


Figure III.10 : Profil protéique des 14 fractions sur SDS-PAGE 15 % et 12% (**Vv** : venin brut de *V. velutina*, **F'x** : Fraction de SEC)

D'après la **Figure III.10**, et ce malgré une définition de largeur de bande chromatographique non optimale venant d'un problème lié au tampon de migration, nous pouvons, dans un premier temps, observer que les fractions de **F'2**, **F'3**, **F'4**, **F'6** renferment des molécules de haut poids moléculaire supérieur à 20 kDa avec une distribution plus élargie en masse moléculaire pour les fractions **F'3** et **F'4** (de 20kDa à 40 kDa) avec toutefois une bande marquée à 20 kDa pour la fraction

F'4. La fraction **F'2** est caractérisée, quant à elle, principalement par une bande autour de 50 kDa. Les fractions **F'6**, **F'8**, **F'10** et **F'11** laissent apparaître une bande autour de 80 kDa, mais cette bande vient probablement d'un **contaminant issu du gel** lors de la migration. En effet, cette bande est présente dans toutes les fractions migrées sur ce gel. Afin d'affiner ces plages de masse moléculaire, une autre étude a été effectuée sur SDS-PAGE 12 % spécifiquement sur les fractions de **F'2 à F'6**, les plus représentatives en termes de contenu en molécules de haut poids moléculaire (protéines). La fraction **F'2** affiche une unique bande protéique intense autour de 45 kDa, la fraction **F'3** laisse apparaître quatre bandes principales entre 25 kDa et 35 kDa avec une bande intense à 15 kDa. La fraction **F'4** révèle deux des quatre bandes visibles également dans la fraction **F'3** à savoir 30 kDa et 35 kDa avec en plus une bande très intense à 20 kDa. La fraction **F'6** indique, quant à elle, des bandes de faibles intensités à 30kDa et 35 kDa et une « tache » très large dans le domaine inférieur à 10 kDa.

Aussi, afin de confirmer ou infirmer le potentiel de certaines protéines, en termes de gamme de masse, à être impliquées dans cet effet antioxydant, nous avons mené les études sur les fractions **F'1 à F'6**.

2.2.3.3 Résultat du test d'activité de SOD sur les fractions obtenues à partir de SEC

Les résultats dans la **Figure III.11** montre que les fractions **F'3** et **F'4** contribuent à l'activité de la fraction **Vv > 10 kDa**.

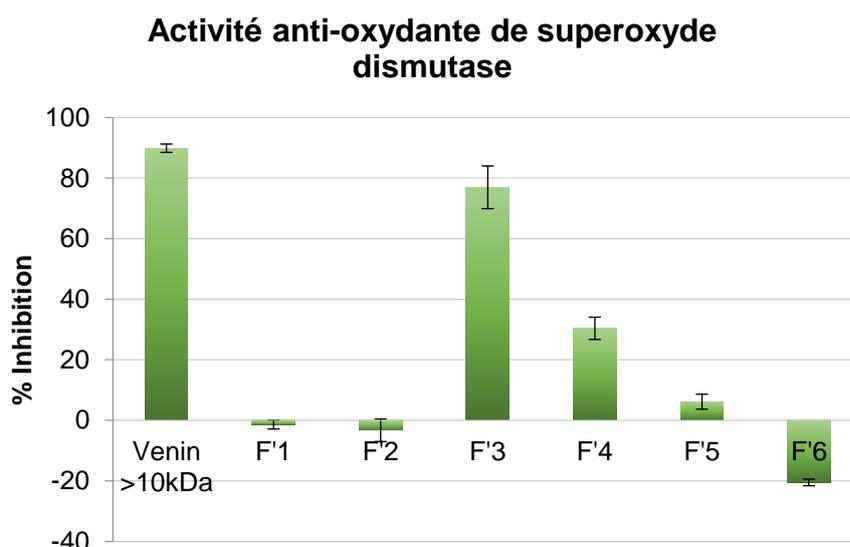


Figure III.11 : Mesure de l'activité antioxydante de la fraction **Vv >10 kDa** et des fractions **F'1 à F'6** par le test indirect de l'activité de l'enzyme Superoxyde dismutase (SOD)

La fraction **F'2** et **F'6** montre un pourcentage négatif, une hypothèse serait la présence d'une molécule pouvant surexprimée l'activité de l'enzyme xanthine oxydase et de ce fait induire une perturbation sur le signal.

Parmi ces deux fractions protéiques, la fraction **F'3**, regroupant des protéines autour de 25 kDa, 35 kDa et 15 kDa, semble être celle qui donne une plus grande capacité à cet effet antioxydant avec un pourcentage d'inhibition significatif de l'ordre de 80 %.

La présence de l'enzyme SOD dans le venin a été démontrée chez certains insectes hyménoptères tels que la guêpe parasitoïde *Scleroderma guani* [23], l'endoparasitoïde *Cotesia chilonis* [24] et l'abeille. Ces protéines sont connues pour être synthétisées dans le tissu de la glande à venin et pouvant être secrétées dans le milieu extracellulaire [65]. Un des rôles de celle-ci étant de protéger le venin ou le tissu du sac à venin contre les stress oxydatifs pendant le stockage [25], [26]. De plus, les SODs sont connues pour intervenir lors du processus de mélanisation associée à la phénoloxidase produisant les ROS [26].

3 Activité antimicrobienne du venin

L'objectif des travaux suivant visait à évaluer les propriétés antimicrobiennes des extraits du venin de frelon asiatique pour des applications cosmétiques. Les données de la littérature indiquent en effet que les venins d'abeille et de serpent pour ne citer ces espèces animales possèdent de nombreuses structures bioactives exploitées dans le domaine du cosmétique. À ce titre on peut citer pour ses propriétés antimicrobiennes, le venin d'abeille a été rapporté de posséder une capacité antimicrobienne sur une gamme large de bactéries [16], [66]. Cette propriété est exploitée comme composant anti-acnés en cosmétique (crème ou sérum) [67], [68]. Un effet « anti-acnés » de ce venin d'abeilles a également été mis en évidence et est utilisé dans certaines formulations cosmétiques [67].

*Dans ce contexte précis, nous avons mis en place une panoplie de 2 tests d'activité biologique pour évaluer l'effet du venin de frelon asiatique sur 1) l'activité antimicrobienne sur la bactérie *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) et 2) le champignon *Malassezia furfur* (*M. furfur*)*

***Malassezia furfur* (ou *Pityrosporum ovale*)** est une levure lipophile, appartenant au groupe des champignons imparfaits et présente dans la flore commensale naturelle des humains et d'autres

espèces de mammifères [69]. Cette souche de champignon est particulièrement abondante dans les zones riches en glandes sébacées telles que le cuir chevelu dans lequel *Malassezia* est connu comme la principale cause d'inflammation provoquant des pellicules.

Propionibacterium acnes (ou ***Cutibacterium acnes***) *Propionibacterium acnes* (ou *Cutibacterium acnes*) est une bacilliforme provoquant l'acné sur la peau, en particulier sur le visage. Il s'agit d'une bactérie anaérobie, saprophyte et gram positif [70]. Il s'épanouit dans l'environnement anaérobie riche en lipides et follicules sébacés contenant des microcomédones. Ces bactéries libèrent des enzymes protéolytiques et des lipases qui perturbent l'épithélium folliculaire et produisent une réponse inflammatoire médiée. La production de facteurs chimiotactiques par ces bactéries attire les neutrophiles induisant la bactériolyse et augmentant la libération d'hydrolases. Ces réactions entraînent la formation de papules rouges, de pustules et d'abcès sous-cutanés [71].

C. acnes est sensible avec des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif [72]. Ainsi, différents composés antimicrobiens ont été développés sous forme de traitement topique pour soulager les troubles causés par des acnés grâce à leur efficacité dans l'antimicrobien et l'anti-inflammation. Les principaux antibiotiques utilisés sont l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline. Leur effet antimicrobien est attribué à l'inhibition de la synthèse des protéines bactériennes et leur activité anti-inflammatoire est liée à l'inhibition de la chimiotaxie des leucocytes polymorphonucléaires. Un titre de l'exemple, les composés naturels exploités pour l'activité antibactérienne telle que l'acide azélaïque (acide dicarboxylique) est largement utilisé pour traitement topique des acnés [73].

3.1 Protocoles d'évaluation l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne du venin (**Vv**) et de la fraction **Vv < 10 kDa** a été évaluée sur deux cibles d'intérêt dans le domaine cosmétique : la bactérie *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), vivant dans et autour des glandes sudoripares et des glandes sébacées et est liée à l'éclosion de l'acné et le champignon de *Malassezia furfur* (*M. furfur*) qui peut se développer et être responsable de *pityriasis versicolor* (desquamation de la peau en fines pellicules blanchâtres). Ces différentes études ont été réalisées au sein de la société **GlycoDiag (Orléans)** spécialisée dans le secteur d'activité de la recherche-développement en biotechnologie en s'appuyant sur une plateforme unique qui intègre

à la fois des méthodes de criblages à la fois cellulaires et moléculaires destinées à la recherche d'activités biologiques ou microbiologiques.

Protocole : Les concentrations étudiées du venin brut **Vv** et de la fraction **Vv < 10 kDa** varient de 1 à 1000 µg/mL. Le Phenoxyéthanol, préparé à 5% (v/v) est utilisé comme témoin positif. Les activités antimicrobiennes ont été présentées en valeur de concentration minimale inhibitrice (**CMI**) en microplaque 96 puits.

Afin de déterminer la **CMI**, le venin ou la fraction **Vv < 10 kDa** est testé en dilutions sériées en microplaque 96 puits directement dans le milieu de culture destiné à favoriser la croissance des bactéries/champignons. Puis, chaque point de dilution est complété par la souche *C. acnes* à une concentration de $5.1.10^5$ UFC/mL (UFC : Unité Faisant Colonie) par puits ou par *M. furfur* à une concentration de $3.2. 10^4$ UFC/mL. Enfin, les plaques sont incubées 48 heures à $37 \text{ °C} \pm 0.5 \text{ °C}$, en prenant soin de respecter les paramètres respiratoires du micro-organisme utilisé.

3.2 Étude sur l'activité antimicrobienne du venin Vv et de la fraction Vv < 10 kDa

Les réponses du venin et ses fractions sur les bactéries *C. acnes* et le champignon *M. furfur* sont présentées dans le **Tableau III.1**.

Tableau III.1 : Concentration Minimale Inhibitrice (**CMI**) du venin et sa fraction **Vv < 10 kDa** sur *C. acnes* et le champignon de *M. furfur*

Inhibition microbienne							
Concentration (µg/mL)	<i>C. acnes</i>		<i>M. furfur</i>		Concentration (v/v%)	<i>C. acnes</i> / <i>M. furfur</i>	
	Vv	Vv < 10kDa	Vv	Vv < 10kDa		Contrôle positive	
1000	+	+	-	-	5.00%	+	+
100	+	-	-	-	2.50%	+	+
50	+	-	-	-	1.25%	+	+
25	+	-	-	-	0.63%	+	+
12.5	+	-	-	-	0.31%	-	-
1	-	-	-	-	0.16%	-	-
CMI (µg/mL)	12.5	1000	x	x	CMI (%)	0.63	0.63

D'après le **Tableau III.1**, un effet inhibiteur du venin brut et de la fraction a été démontré sur la souche *C. acnes*. La **CMI** du venin brut est égale à 12.5 µg/mL alors que celle de la fraction **Vv < 10 kDa** est **bien plus importante**, car égale à 1 mg/mL. Nous pouvons déduire que l'effet inhibiteur dans le venin peut être **induit par les molécules supérieures de 10 kDa**.

En ce qui concerne l'activité inhibitrice du venin **Vv** ou de la fraction **Vv < 10 kDa** sur *M. furfur*, celle-ci est inexistante sur la gamme de concentration testée.

Compte tenu des résultats, notamment obtenus sur le venin brut, nous avons décidé de tester l'activité des sous-fractions protéiques obtenues par la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans la **section 2.2.3.2, chapitre III**.

3.3 Tests d'activité antimicrobienne sur les fractions F'2 à F'6 issues du venin brut

Tableau III. 2 : Activité inhibitrice sur *C. acnes* des fractions F'2 à F'6 issus du venin brut

Concentration des différentes fractions (µg/mL)	F'2	F'3	F'4	F'5	F'6	Tampon de fractionnement
100	+	+	+	+	+	-
50	-	+	+	-	-	-
25	-	+	+	-	-	-
12.5	-	+	-	-	-	-
6.25	-	+	-	-	-	-
3.125	-	-	-	-	-	-
MIC (µg/mL)	100	6.25	25	100	100	x

D'après les résultats présents dans le **Tableau III. 2**, l'activité antimicrobienne du venin brut est concentrée dans toutes les fractions pour une concentration égale à 100 µg/mL. À noter que le tampon de fractionnement utilisé en tant qu'**éluant** lors de la chromatographie d'exclusion **n'a aucun effet inhibiteur** vis-à-vis de *C. acnes*. Les fractions **F'3** et **F'4** montrent **un effet inhibiteur** respectivement à des concentrations de 6.25 µg/mL et 25 µg/mL. Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que les protéines de masse moléculaire égales à **30 kDa et 35 kDa** seraient susceptibles d'être les **responsables** de cet effet antibactérien. Cela semble d'autant plus plausible que la quantité de ces protéines à 30 kDa et 35 kDa dans ces fractions sont présentes **en quantité**

suffisante (bande d'intensité importante sur gel SDS-PAGE) et donc peuvent avoir un **effet inhibiteur marqué** à des concentrations plus faibles. Cependant, des études menées sur l'activité antimicrobienne du venin de guêpe ou frelon ont indiqué que cet effet inhibiteur pouvait provenir de protéine telles que la phospholipase A₂ (PLA₂) appartenant à une famille d'enzymes hydrolysant les phospholipides membranaires ou bien de peptides comme le mastoparan [74]. Aussi, de par la présence d'une bande moins intense dans la fraction **F'3** à 15 kDa, nous pouvons émettre également l'hypothèse de la présence dans cette fraction la phospholipase A₂ sécrétée (sPLA₂) dont la masse moléculaire est comprise entre 13 et 19 kDa [75], [76].

Conclusion

L'étude indiquée dans ce chapitre a pour l'objectif de présenter une stratégie sur l'étude du venin brut du frelon asiatique en mettant en œuvre une méthode chromatographique de fractionnement guidé afin de rechercher, via différents tests chimiques ou biologiques, les fractions protéiques et/ou molécules issues de ce venin responsables d'activités inhibitrices spécifiques (anti tyrosinase, anti élastase, anti collagénase, antimicrobienne) et de l'activité antioxydante. Concernant les résultats, le venin brut Vv et les fractions Vv < 10 kDa et Vv >10 kDa ne montrent pas d'activité inhibitrice notable vis-à-vis de la tyrosinase, l'élastase et la collagénase.

Par la suite, des études ont été menées des études sur l'effet antioxydant du venin brut de frelon asiatique en mettant en œuvre des tests chimiques et biologiques dans le but d'identifier et caractériser par chromatographie sur couche mince TLC et chromatographie liquide couplée à un détecteur UV-visible (HPLC-UV) la structure chimique de la ou des molécules issues du dit venin. Pour accéder à la caractérisation de la ou des molécules d'intérêt, nous avons alors mis en place divers techniques chromatographiques (TLC, SEC, UHPLC) couplés soit avec un détecteur spectrophotométrique UV-Visible soit avec un spectromètre de masse (ESI-QTOF). Nous avons démontré que le venin montre une capacité d'inhibition contre les espèces réactives oxygénées intracellulaires sur lignée cellulaire HaCaT à une faible concentration (2.5×10^{-4} µg protéine/mL) sans montrer de cytotoxicité.

Une stratégie axée sur la biotechnologie a été mise en place et optimisée à l'aide de méthodes de séparation ciblées par TLC-DPPH et non ciblées par HPLC-DPPH afin de purifier une fraction d'intérêt. La sérotonine a été ainsi identifiée par UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS comme un composé actif responsable de l'activité de piégeage des radicaux libres dans ce venin.

Comme ce composé a un effet nocif sur le système nerveux humain, l'utilisation directe de la sérotonine comme nouvel ingrédient cosmétique doit être envisagée avec prudence. Néanmoins, ces résultats contribuent aux connaissances actuelles dans la recherche sur la bioactivité de cet insecte. De plus, la méthodologie appliquée dans cette étude peut être exploitée dans la recherche d'autres molécules de type peptides ou protéines susceptibles d'être actives vis-à-vis des cibles biologiques investiguées dans nos travaux ou vis-à-vis d'autres allégations d'intérêt pour la cosmétique.

Une question à laquelle nous devons apporter attention demeure : faut-il systématiquement isoler la ou les molécules actives ? En effet, cette stratégie semble la plus adéquate quant à formuler un soin cosmétique avec un actif unique et identifié, mais cette démarche fait abstraction d'un effet de synergie entre plusieurs molécules présentes dans le venin qui pourraient alors avoir un effet avéré vis-à-vis de telle ou telle cible.

Références

- [1] I. Vetter *et al.*, "Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery," *Amino Acids*, vol. 40, no. 1, pp. 15–28, Jan. 2011, doi: 10.1007/s00726-010-0516-4.
- [2] O. D. Lopina, "Enzyme Inhibitors and Activators," in *Enzyme Inhibitors and Activators*, M. Senturk, Ed. InTechOpen, 2017.
- [3] M. Kataoka, J. F. Head, B. A. Seaton, and D. M. Engelman, "Melittin binding causes a large calcium-dependent conformational change in calmodulin," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 86, no. 18, pp. 6944–6948, Sep. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.18.6944.
- [4] S. Vaiyapuri, N. Thiyagarajan, E. G. Hutchinson, and J. M. Gibbins, "Sequence and phylogenetic analysis of viper venom serine proteases," *Bioinformation*, vol. 8, no. 16, pp. 763–772, Aug. 2012, doi: 10.6026/97320630008763.
- [5] J. Lu *et al.*, "A novel serine protease inhibitor from Bungarus fasciatus venom," *Peptides*, vol. 29, no. 3, pp. 369–374, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.peptides.2007.11.013.
- [6] J. Yang *et al.*, "Anti-fibrinolytic and anti-microbial activities of a serine protease inhibitor from honeybee (*Apis cerana*) venom," *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, vol. 201, pp. 11–18, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.cbpc.2017.09.001.
- [7] J. Han *et al.*, "An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*," *Toxicon*, vol. 51, no. 5, pp. 914–922, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.toxicon.2008.01.002.
- [8] Z. Werb, M. J. Banda, J. H. Mckerrow, and R. A. Sandhaus, "Elastases and Elastin Degradation," *J Invest Dermatol*, vol. 79, no. 1, Supplement, pp. 154–159, Jul. 1982, doi: 10.1038/jid.1982.28.
- [9] L. Feitosa *et al.*, "Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom," *Toxicon*, vol. 36, no. 7, pp. 1039–1051, Jul. 1998, doi: 10.1016/S0041-0101(97)00083-4.
- [10] J. A. Price, "Microplate fluorescence protease assays test the inhibition of select North American snake venoms' activities with an anti-proteinase library," *Toxicon*, vol. 103, pp. 145–154, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.06.020.
- [11] R. Medina-Santos *et al.*, "Diversity of astacin-like metalloproteinases identified by transcriptomic analysis in Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom and in vitro activity characterization," *Biochimie*, vol. 167, pp. 81–92, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.biochi.2019.08.017.
- [12] H. C. Grillo and J. Gross, "Collagenolytic activity during mammalian wound repair," *Dev. Biol.*, vol. 15, no. 4, pp. 300–317, Apr. 1967, doi: 10.1016/0012-1606(67)90029-2.
- [13] D. Dayan, L. Barr-Nea, M. Sandbank, I. Binderman, G. L. Mechanic, and J. S. Ishay, "Oriental hornet venom enhances wound healing and repair in rat skin, possibly through its collagenolytic activity," *Acta Trop.*, vol. 40, no. 2, pp. 147–153, Jun. 1983.
- [14] H. Lee *et al.*, "Anti-wrinkle Effect of PLA2-free Bee Venom against UVB-irradiated Human Skin Cells," *J. Agric. Life Sci.*, vol. 49, pp. 125–135, Feb. 2015, doi: 10.14397/jals.2015.49.1.125.
- [15] M. Verdoni *et al.*, "ArgTX-636, a polyamine isolated from spider venom: A novel class of melanogenesis inhibitors," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 24, no. 22, pp. 5685–5692, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.bmc.2016.08.023.
- [16] M. Morais, L. Moreira, X. Feás, and L. M. Estevinho, "Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 5, pp. 1096–1101, May 2011, doi: 10.1016/j.fct.2011.01.020.
- [17] S. Somwongin, P. Chantawannakul, and W. Chaiyana, "Antioxidant activity and irritation property of venoms from *Apis* species," *Toxicon*, vol. 145, pp. 32–39, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.toxicon.2018.02.049.
- [18] E. Balamurugan, B. V. Reddy, and V. P. Menon, "Antitumor and antioxidant role of *Chrysaora quinquecirrha* (sea nettle) nematocyst venom peptide against ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice," *Mol Cell Biochem*, vol. 338, no. 1, pp. 69–76, May 2010, doi: 10.1007/s11010-009-0339-3.
- [19] T. Das *et al.*, "Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice," *Toxicon*, vol. 57, no. 7, pp. 1065–1072, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.toxicon.2011.04.012.
- [20] P. Sharma, A. B. Jha, R. S. Dubey, and M. Pessarakli, "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions," *J. Bot.*, vol. 2012, p. 26, 2012, doi: 10.1155/2012/217037.
- [21] I. Kusumawati and G. Indrayanto, "Chapter 15 - Natural Antioxidants in Cosmetics," in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 40, Atta-ur-Rahman, Ed. Elsevier, 2013, pp. 485–505.
- [22] A. Brieva *et al.*, "Molecular Basis for the Regenerative Properties of a Secretion of the Mollusk *Cryptomphalus aspersa*," *Skin Pharmacol Physiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 15–22, 2008, doi: 10.1159/000109084.

- [23] N.-Y. Liu, J.-M. Huang, X.-M. Ren, Z.-W. Xu, N.-S. Yan, and J.-Y. Zhu, "Superoxide dismutase from venom of the ectoparasitoid *Scleroderma guani* inhibits melanization of hemolymph," *Arch Insect Biochem Physiol*, vol. 99, no. 3, p. e21503, 2018, doi: 10.1002/arch.21503.
- [24] Z.-W. Teng *et al.*, "Protein Discovery: Combined Transcriptomic and Proteomic Analyses of Venom from the Endoparasitoid *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae)," *Toxins*, vol. 9, no. 4, p. 135, Apr. 2017, doi: 10.3390/toxins9040135.
- [25] L. D. dos Santos *et al.*, "Profiling the Proteome of the Venom from the Social Wasp *Polybia paulista*: A Clue to Understand the Envenoming Mechanism," *J. Proteome Res.*, vol. 9, no. 8, pp. 3867–3877, Aug. 2010, doi: 10.1021/pr1000829.
- [26] D. Colinet, D. Cazes, M. Belghazi, J.-L. Gatti, and M. Poirié, "Extracellular Superoxide Dismutase in Insects: characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 46, pp. 40110–40121, Nov. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.288845.
- [27] M. J. Yang, W.-Y. Lin, K.-H. Lu, and W.-C. Tu, "Evaluating antioxidative activities of amino acid substitutions on mastoparan-B," *Peptides*, vol. 32, no. 10, pp. 2037–2043, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.peptides.2011.08.026.
- [28] F. Sobral *et al.*, "Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 94, no. Supplement C, pp. 172–177, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.fct.2016.06.008.
- [29] Y. Dongol, B. L. Dhananjaya, R. K. Shrestha, and G. Aryal, "Pharmacological and Immunological Properties of Wasp Venom," *Pharmacol. Ther.*, Jul. 2014, doi: 10.5772/57227.
- [30] K. Monceau, O. Bonnard, and D. Thiéry, "*Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe," *J Pest Sci*, vol. 87, no. 1, pp. 1–16, Mar. 2014, doi: 10.1007/s10340-013-0537-3.
- [31] T. Piek, *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Elsevier, 2013.
- [32] Y. Cheng, P. Wen, S. Dong, K. Tan, and J. C. Nieh, "Poison and alarm: the Asian hornet *Vespa velutina* uses sting venom volatiles as an alarm pheromone," *J Exp Biol.*, vol. 220, no. 4, pp. 645–651, Feb. 2017, doi: 10.1242/jeb.148783.
- [33] Z. Liu *et al.*, "Deciphering the venom transcriptome of killer-wasp *Vespa velutina*," *Sci Rep*, vol. 5, p. 9454, Apr. 2015, doi: 10.1038/srep09454.
- [34] W.-J. Shi, S.-F. Zhang, C.-X. Zhang, and J.-A. Cheng, "Cloning and comparative analysis of the venom prepro-melittin genes from four wasp species," *Yi Chuan Xue Bao*, vol. 30, no. 6, pp. 555–559, Jun. 2003.
- [35] Z. Su-fang, S. H. I. Wan-jun, C. Jia-an, and Z. Chuan-xi, "Cloning and Comparison of the Genes Encoding Preproapamin from the Venom of 2 Honeybee and 4 Wasp Species," *Insect Sci*, vol. 10, no. 1, pp. 21–26, Mar. 2003, doi: 10.1111/j.1744-7917.2003.tb00360.x.
- [36] C.-Z. Zhu, W.-G. Zhang, G.-H. Zhou, X.-L. Xu, Z.-L. Kang, and Y. Yin, "Isolation and Identification of Antioxidant Peptides from Jinhua Ham," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 6, pp. 1265–1271, Feb. 2013, doi: 10.1021/jf3044764.
- [37] D. Bandonienè and M. Murkovic, "On-Line HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Radical Scavenging Phenols Extracted from Apples (*Malus domestica* L.)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 9, pp. 2482–2487, Apr. 2002, doi: 10.1021/jf011475s.
- [38] S.-C. Lam, S.-F. Lam, J. Zhao, and S.-P. Li, "Rapid Identification and Comparison of Compounds with Antioxidant Activity in *Coreopsis tinctoria* Herbal Tea by High-Performance Thin-Layer Chromatography Coupled with DPPH Bioautography and Densitometry," *J. Food Sci.*, vol. 81, no. 9, pp. C2218–2223, Sep. 2016, doi: 10.1111/1750-3841.13402.
- [39] N. Peiren, F. Vanrobaeys, D. C. de Graaf, B. Devreese, J. Van Beeumen, and F. J. Jacobs, "The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1752, no. 1, pp. 1–5, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.07.017.
- [40] N. B. Dias, B. M. de Souza, P. C. Gomes, and M. S. Palma, "Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): a comparison of the intra- and inter-colony compositions," *Peptides*, vol. 51, pp. 122–130, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.029.
- [41] N. Sookrung *et al.*, "Proteome and allergenome of Asian wasp, *Vespa affinis*, venom and IgE reactivity of the venom components," *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 1336–1344, Mar. 2014, doi: 10.1021/pr4009139.
- [42] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- [43] A. V. Badarinath, K. M. Rao, C. M. S. Chetty, S. Ramkanth, T. V. Rajan, and K. Gnanaprakash, "A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations," *Int J Pharmtech Res*, vol. 2, no. 2, pp. 1276–1285, 2010.

- [44] Y. Zhang, R. Chen, H. Ma, and S. Chen, "Isolation and Identification of Dipeptidyl Peptidase IV-Inhibitory Peptides from Trypsin/Chymotrypsin-Treated Goat Milk Casein Hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 40, pp. 8819–8828, Oct. 2015, doi: 10.1021/acs.jafc.5b03062.
- [45] E. J. Want *et al.*, "Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 3, pp. 743–752, Feb. 2006, doi: 10.1021/ac051312t.
- [46] Y. Lu, T. J. Khoo, and C. Wiart, "Antioxidant Activity Determination of Citronellal and Crude Extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 Different Methods," *Pharmacol Pharm*, vol. 05, no. 04, pp. 395–400, 2014, doi: 10.4236/pp.2014.54047.
- [47] S. B. Kedare and R. P. Singh, "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay," *J Food Sci Technol*, vol. 48, no. 4, pp. 412–422, Aug. 2011, doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- [48] S. Dunaway, R. Odin, L. Zhou, L. Ji, Y. Zhang, and A. L. Kadekaro, "Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation," *Front Pharmacol*, vol. 9, p. 392, Apr. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00392.
- [49] R. Bhusan, V. K. Mahesh, and P. V. Mallikharjun, "Thin layer chromatography of peptides and proteins: A review," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 3, no. 3, pp. 95–104, May 1989, doi: 10.1002/bmc.1130030302.
- [50] on Neda, P. Vlazan, R. Oana, P. Sfarloaga, I. Grozescu, and A.-E. Segneanu, "Peptide and Amino Acids Separation and Identification from Natural Products," in *Analytical Chemistry*, I. S. Krull, Ed. InTech, 2012, pp. 135–146.
- [51] M. Friedman and L. David Williams, "Stoichiometry of formation of Ruhemann's purple in the ninhydrin reaction," *Bioorg. Chem.*, vol. 3, no. 3, pp. 267–280, Sep. 1974, doi: 10.1016/0045-2068(74)90017-0.
- [52] I. Gülçin, "Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent," *J Enzyme Inhib Med Chem.*, vol. 23, no. 6, pp. 871–876, Jan. 2008, doi: 10.1080/14756360701626223.
- [53] J.-Y. Choi, H. Kim, Y.-J. Choi, A. Ishihara, K. Back, and S.-G. Lee, "Cytoprotective activities of hydroxycinnamic acid amides of serotonin against oxidative stress-induced damage in HepG2 and HaCaT cells," *Fitoterapia*, vol. 81, no. 8, pp. 1134–1141, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.fitote.2010.07.015.
- [54] Y. Yang, H. Huang, Z. Xu, and J. Duan, "Serotonin and Its Receptor as a New Antioxidant Therapeutic Target for Diabetic Kidney Disease," *J Diabetes Res*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/7680576.
- [55] S. Azouzi *et al.*, "Antioxidant and Membrane Binding Properties of Serotonin Protect Lipids from Oxidation," *Biophys J*, vol. 112, no. 9, pp. 1863–1873, May 2017, doi: 10.1016/j.bpj.2017.03.037.
- [56] R. M. Lobayan and M. C. P. Schmit, "Conformational and NBO studies of serotonin as a radical scavenger. Changes induced by the OH group," *J Mol Graph Model*, vol. 80, pp. 224–237, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.jmgm.2018.01.006.
- [57] A. Slominski *et al.*, "Serotonergic and melatoninergic systems are fully expressed in human skin," *The FASEB Journal*, vol. 16, no. 8, pp. 896–898, Jun. 2002, doi: 10.1096/fj.01-0952fje.
- [58] A. Weisel-Eichler and F. Libersat, "Venom effects on monoaminergic systems," *J Comp Physiol A*, vol. 190, no. 9, pp. 683–690, Sep. 2004, doi: 10.1007/s00359-004-0526-3.
- [59] R. A. Sansone and L. A. Sansone, "Sunshine, Serotonin, and Skin: A Partial Explanation for Seasonal Patterns in Psychopathology?," *Innov Clin Neurosci*, vol. 10, no. 7–8, pp. 20–24, 2013.
- [60] A. Sadiq *et al.*, "The Role of Serotonin during Skin Healing in Post-Thermal Injury," *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 4, Mar. 2018, doi: 10.3390/ijms19041034.
- [61] K. Pérez-Cruz *et al.*, "Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins," *Arab. J. Chem.*, vol. 11, no. 4, pp. 525–537, May 2018, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.007.
- [62] T.-Y. Chan and P.-L. Tang, "Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro," *J. Pineal Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 187–191, May 1996, doi: 10.1111/j.1600-079X.1996.tb00257.x.
- [63] D. Huang, B. Ou, and R. L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1841–1856, Mar. 2005, doi: 10.1021/jf030723c.
- [64] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, May 2005, doi: 10.1021/jf0502698.
- [65] N.-Y. Liu, J.-Q. Wang, Z.-B. Zhang, J.-M. Huang, and J.-Y. Zhu, "Unraveling the venom components of an encyrtid endoparasitoid wasp *Diversinervus elegans*," *Toxicon*, vol. 136, pp. 15–26, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.toxicon.2017.06.011.
- [66] N. S Surendra, G. N Jayaram, and M. S Reddy, "Antimicrobial activity of crude venom extracts in honeybees (*Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*) tested against selected pathogens," *Afr. J. Microbiol. Res.*, vol. 5, no. 18, pp. 2765–2772, Sep. 2011, doi: 10.5897/AJMR11.593.
- [67] S. M. Han, K. G. Lee, and S. C. Pak, "Effects of cosmetics containing purified honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on acne vulgaris," *J Integr Med*, vol. 11, no. 5, pp. 320–326, Sep. 2013, doi: 10.3736/jintegrmed2013043.
- [68] S. M. Han, S. C. Pak, Y. M. Nicholls, and N. Macfarlane, "Evaluation of anti-acne property of purified bee venom serum in humans," *J Cosmet Dermatol*, vol. 15, no. 4, pp. 324–329, 2016, doi: 10.1111/jocd.12227.

- [69] P. Nenoff, C. Krüger, G. Ginter-Hanselmayer, and H.-J. Tietz, "Mycology – an update. Part 1: Dermatomyces: Causative agents, epidemiology and pathogenesis," *J Dtsch Dermatol Ges*, vol. 12, no. 3, pp. 188–210, 2014, doi: 10.1111/ddg.12245.
- [70] M. V. Shields, L. Abdullah, and S. Namdari, "The challenge of *Propionibacterium acnes* and revision shoulder arthroplasty: a review of current diagnostic options," *J Shoulder Elbow Surg*, vol. 25, no. 6, pp. 1034–1040, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.jse.2016.01.009.
- [71] S. Popovic, E. Urbán, M. Lukic, and J. M. Conlon, "Peptides with antimicrobial and anti-inflammatory activities that have therapeutic potential for treatment of acne vulgaris," *Peptides*, vol. 34, no. 2, pp. 275–282, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.peptides.2012.02.010.
- [72] H.-H. Tan, "Antibacterial Therapy for Acne," *Am J Clin Dermatol*, vol. 4, no. 5, pp. 307–314, May 2003, doi: 10.2165/00128071-200304050-00002.
- [73] M. Kosmadaki and A. Katsambas, "Topical treatments for acne," *Clin. Dermatol.*, vol. 35, no. 2, pp. 173–178, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.10.010.
- [74] R. Perumal Samy, B. G. Stiles, O. L. Franco, G. Sethi, and L. H. K. Lim, "Animal venoms as antimicrobial agents," *Biochem. Pharmacol*, vol. 134, pp. 127–138, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2017.03.005.
- [75] R. P. Samy *et al.*, "Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, no. 3, pp. 650–659, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03161.x.
- [76] R. Ma, R. Mahadevappa, and H. F. Kwok, "Venom-based peptide therapy: insights into anti-cancer mechanism," *Oncotarget*, vol. 8, no. 59, pp. 100908–100930, Oct. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.21740.

**Chapitre IV: Apport d'une approche
multivariée dans l'étude de
« sourcing » et caractérisation des
molécules discriminantes**

Table des matières

Chapitre IV: Apport d'une approche multivariée dans l'étude de « sourcing » et caractérisation des molécules discriminantes	185
Table des matières	186
Introduction.....	187
Partie I : Étude du « sourcing » de venin de frelon asiatique : Approche peptidomique pour une investigation de variation intraspécifique et recherche de marqueurs potentiels dans le venin	188
1 Développement d'une méthode analytique multivariée pour comparer les profils peptidiques des différents venins	188
2 Influence des comportements (ouvrière prédatrice) sur la composition du venin de frelon asiatique.....	207
2.1 Échantillonnage des venins : ouvrières prédatrices et ouvrières au sein du nid	208
2.2 Comparaisons des profils.....	209
2.3 Effet prédateur ou non : molécules discriminantes et communes entre 2017-2018.....	211
3 Influence de la nature de la caste du frelon asiatique sur la composition du venin de frelon asiatique	212
3.1 Echantillonnage des venins : castes (reines, fondatrices et ouvrières) au sein du nid	213
3.2 Comparaisons des profils.....	213
3.3 Molécules discriminantes en 2017	215
Partie II : Mise en place d'une méthode de criblage d'interaction Ligand/enzymes immobilisée basée sur la spectrométrie de masse : Apport de l'approche Ion-Fading/Ion-Hunting couplée à l'ESI-MS sur le criblage de venin de frelon	220
4 Criblage de candidat possédant une interaction ligand/enzyme au sein des fractions peptidiques de venin de frelon	220
4.1 Préparation des fractions peptidiques.....	220
4.1.1 Séparation et collecte des fractions par HPLC-UV.....	220
4.1.2 Analyse des profils des sous-fractions HPLC-UV par spectrométrie de masse (MS).....	222
4.2 Mise en place de l'approche d'immobilisation des enzymes sur un support solide de billes magnétiques	223
4.2.1 Immobilisation de l'enzyme élastase sur billes magnétiques	224
4.2.2 Description de l'approche Ion - Fading et ion - Hunting	224
4.2.3 Criblage des sous-fractions avec le lot de billes élastase immobilisé	227
4.2.4 Evaluation de l'interaction non spécifique des fractions peptidiques de venin sur les supports de MPs-APTES-GLA	233
Partie III : Séquençage <i>de novo</i>	235
5 Mise en place d'une approche de séquençage <i>de novo</i> pour une caractérisation préliminaire des peptides de venin de frelon asiatique	235
5.1 Preuve de concept de l'approche séquençage <i>de novo</i> sur les peptides de BSA digérée par logiciel PEAKS Studio et Biotoools	236
5.2 Séquençage <i>de novo</i> sur les peptides du venin de <i>V. velutina</i>	243
5.2.1 Résultat du séquençage <i>de novo</i> du venin de frelon asiatique	243
5.2.2 Observation du patrimoine peptidique du venin de frelon	246
5.2.3 Approche de vérification des séquences peptidiques du venin de frelon	247
Conclusion	256
Références.....	259

Introduction

Contrairement à la stratégie de criblage d'orientation biologique développée dans le chapitre précédent (**Chapitre III**), dans de ce chapitre :

✓ Une stratégie peptidomique a été mise en place afin de comparer l'influence de « sourcing » (période de collecte, castes...) des venins de frelon disponibles dans ce projet par notre partenaire Eric Darrouzet de l'IRBI (**Partie I**).

✓ Parallèlement, il a été envisagé d'appliquer une approche de criblage basée sur la spectrométrie de masse afin d'évaluer, dans des sous-fractions peptidiques-petites molécules, la présence de molécules ayant une interaction avec des enzymes de type inhibiteurs ou substrats. Ces informations pourront ainsi être convoluées avec celles obtenues lors de l'approche de « sourcing » et émettre une sélection de molécules discriminantes avec un potentiel actif pour la dermacosmétique (**Partie II**).

✓ **Puis nous mettrons en place une méthode de** caractérisation par séquençage *de novo* des peptides discriminants et actifs obtenus à partir de deux études précédentes. Ces molécules potentiellement actives pourront ainsi être synthétisées et valider lors d'essai sur cellules (**Partie III**).

Partie I : Étude du « sourcing » de venin de frelon asiatique : Approche peptidomique pour une investigation de variation intraspécifique et recherche de marqueurs potentiels dans le venin

1 Développement d'une méthode analytique multivariée pour comparer les profils peptidiques des différents venins

Cette partie est consacrée au développement d'une méthode multivariée permettant de discriminer de faibles variations des profils de venin inférieur de 10 kDa (contenant les peptides et les petites molécules) de *V. velutina* afin de définir **i)** l'utilisation des venins selon leurs « sourcing » et **ii)** l'identification de potentiels marqueurs. Dans le cadre de ce projet de recherche, cette méthodologie a été appliquée sur la variation des venins de frelons issus de périodes de collecte, des comportements (prédateur) et des castes différentes. Le développement de cette méthodologie et son application sur l'influence de l'effet de la période de collecte des frelons asiatiques sur le profil peptidique du venin (comme preuve de concept) a fait l'objet d'une soumission d'un article au journal **Analytical and Bioanalytical Chemistry** et acceptation au 20 décembre 2019, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-019-02372-2>

Remarque : Cette partie est alors intégrée dans ce chapitre de thèse sous la forme de l'article scientifique soumis et rédigé **en anglais**. Dans ce contexte, il est à noter que les figures et les tableaux de l'article (sauf le graphique de résumé) sont numérotés différemment du **chapitre IV** (en cohérence avec le texte). Les références sont quant à elles fusionnées avec l'ensemble des références du chapitre.

Development of an LC-MS multivariate non-targeted methodology for differential analysis of the peptide profile of Asian hornet venom (*Vespa velutina nigrithorax*): Application to the investigation of the impact of collection period variation

Thao Nhi LE^a, David DA SILVA^{a*}, Cyril COLAS^{a,b}, Eric DARROUZET^c, Patrick BARIL^b, Lucie LESEURRE^d, Benoît MAUNIT^{a,e}

^a Univ. Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067, Orléans, France

^b CNRS, CBM, UPR 4301, Univ-Orléans, F-45071, Orléans, France

^c IRBI, UMR CNRS 7261, University of Tours, Faculty of Sciences, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

^d CHIMEX (groupe L'Oréal), 16 rue Maurice Berteaux, 95500 Le Thillay, France

^e Université Clermont Auvergne, INSERM, IMost, F-63000 Clermont-Ferrand, France

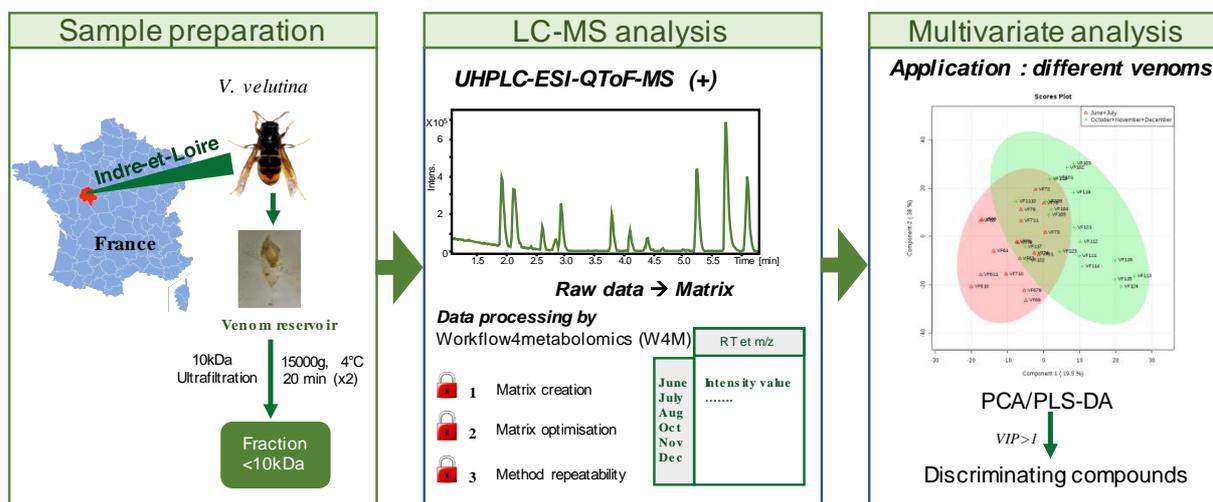
Received: 18 October 2019 / Revised: 7 December 2019 / Accepted: 20 December 2019

* Corresponding author:

Abstract

Insect venom is a highly complex mixture of bioactive compounds, containing proteins, peptides and small molecules. Environmental factors can alter the venom composition and lead to intra-specific variation in its bioactivity properties. The investigation of discriminating compounds caused by variation impacts can be a key to manage sampling and explore the bioactive compounds. The present study reports the development of a peptidomic methodology based on UHPLC-ESI-QTOF-HRMS analysis followed by a non-targeted multivariate analysis to reveal the profile variance of *Vespa velutina* venom collected in different conditions. The reliability of the approach was enhanced by optimizing certain XCMS data processing parameters and determining the sample peak threshold to eliminate the interfering features. This approach demonstrated a good repeatability and a criterion coefficient of variation (CV) >30% was set for deleting non-repeatable features from the matrix. The methodology was then applied to investigate the impact of collection period variation. PCA and PLS-DA models were used and validated by cross validation and permutation tests. A slight discrimination was found between winter and summer hornet venom in two successive years with 10 common discriminating compounds.

Key words: mass spectrometry; multivariate analysis; peptidomic; venom variation; *Vespa velutina*; XCMS.



Graphic abstract

Introduction

The interest of elucidating intra-specific variation in animal venom has recently been raised due to the significant impact of composition variability on the sourcing quality and anti-venom strategy. Factors such as seasonal and geographical variation, diet, and castes have shown either qualitative (absence/presence) or quantitative (intensity of compounds) influences on venom composition . For instance, it is known that the existence of different behavioral groups within the *Solenopsis invicta* fire ant society can produce a variation in venom components, especially alkaloids, between queen and workers or between non-reproductive and reproductive queens [1]. The peptidomic profile of *Neoponera villosa* ant venom also reported a remarkable variability induced by seasonal shifts or types of nesting (ground-dwelling or arboreal) [2]. Moreover, these intra-specific variations originating from venom composition can be related to modifications in the bioactivity properties of venom [3], [4]. A study on the neurotoxic and cytotoxic effect of four *Scorpio maurus palmatus* venom samples from different areas in the Western Mediterranean Coastal Desert showed a significant geographical variability in their potency [5]. Thus, the research for variable compounds associated to changes in the environment may become a novel strategy to explore novel bioactive compounds for therapeutic and cosmetic applications.

Although many studies have been carried out on this topic, the comparison was usually explored based on the pooled profile and ignoring individual variation in each population. Biological samples often present a wide individual variation, particularly in the case of animals whose behaviors are difficult to control. Previous studies on plants and in clinical settings have shown that using multivariate analysis in a non-targeted -omics approach can discriminate between metabolomic profiles. This approach also proved highly efficient for the discovery of biomarkers [6]–[8]. By analyzing the individual profiles, chromatography analysis combined with multivariate analysis such as Principal Component Analysis (PCA) or Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) [9] has the advantage of producing a representative image for the whole population, thus minimizing individual variation. This strategy has been recently reported in certain studies of venom to discriminate between different profiles as well as identify the variable compounds [10], [11]. Moreover, using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) combined with multivariate analysis to compare the peptidome is gradually becoming a common strategy and is considered as a promising application. Recently, an LC-MS non-targeted approach was applied to search for the biomarkers of *Bombyx batryticatus* polypeptides [1] or to analyze intraspecific variation in the peptidome of *Odontomachus haematodus* venom (Formicidae: Ponerinae) [13]. However, the

reliability of the methodologies as well as the influence of data processing on the quality of analysis have not been fully documented.

In an untargeted -omics methodology, the goal is to obtain a database with a considerable number of compounds and simultaneously ensure a highly reliable matrix [14]. Many free-access software packages have been developed such as XCMS [15] or MetaboAnalyst [16]. These approaches enable users to create a variable matrix through a workflow, including multiple steps such as peak filtering, peak detection, peak alignment and identification [17]. The quality of the matrix is known to depend strongly on the parameters of the processing procedure [18]–[20]. It is therefore essential to optimize the data processing parameters. Certain optimization approaches have been suggested for such a requirement. For example, the IPO package for automated optimization of XCMS parameters [21] or the use of design of experiment (DoE) [18] are considered effective strategies.

Vespa velutina nigrithorax is an alien species from Asia that was accidentally introduced into Europe [22]. Vespine venom is composed of potentially active compounds: proteins (neurotoxins, proteases, phospholipases), peptides (accounting for about 70% of the dried venom) and small molecules (bioamines, alkaloids, inorganic salts) [23]. Nevertheless, although the venom of *Vespa velutina nigrithorax* species is known to be a potential natural source of bioactive compounds, little research interest has been shown in it to date. Only one study on the toxin composition in *Vespa velutina* (*V. velutina*) venom has been reported. This study identified 293 putative toxin-encoding sequences in which the principal groups of interest were hemostasis-impairing toxins, neurotoxins, proteases, antimicrobial proteins and peptides [24]. Importantly, it has been known that the peptides present in venom are responsible for a bioactivity potency that can be exploited for therapeutic and cosmetic applications [25]. In this context, investigating the differential peptidomic profiles will help to understand the responses of this novel insect to the impact of environmental factors and simultaneously discover new biomarkers which can become lead molecules for activity research.

To the best of our knowledge, no study has been carried out to investigate the relation between the venom peptidome of *Vespa velutina* and the intrinsic or the extrinsic factors, such as collection periods, castes or animal behavior. Such study contributes to the sourcing knowledges for the homogeneous sampling or the antivenom strategy. Also, understanding the variation of venom profiles helps to screen new biomarkers which may be potentially bioactive. As a novel sample, no

information about the peptidic profile of the *Vespa velutina*'s venom has been found. Therefore, a suitable method for comparing the peptidic profiles of the various venoms is required. The LC-MS combined with non-targeted multivariate analysis shows an advantage in analysis repeatability, high resolution and shows a global representation of venom fingerprint facilitating comparison. Therefore, to extend its use on this new venom matrix, we developed a methodology using Ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization–quadrupole-time of flight–high resolution mass spectrometry (UHPLC-ESI-QTOF-HRMS), followed by data processing with XCMS package and multivariate analysis (PCA, PLS-DA) to differentiate the peptide-low molecular weight compounds (LMWC) profile of *V. velutina* venom collected in different conditions and reveal potential biomarkers. The reliability of the data processing and analysis procedures was assessed in an attempt to optimize certain parameters and evaluate the repeatability of the methodology. The developed method was then applied to investigate the impact of collection period on the venom peptidome in two continuous years (2017 and 2018).

Materials and methods.

Materials

Acetonitrile, formic acid, ESI-TOF MS tuning mix calibration (Supelco) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ultra-pure water was obtained from the Purelab water system from Elga LabWater. The HLB cartridge (Oasis, 30 mg, 1 cc) used for sample desalting was purchased from Water Corp (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The ultrafiltration tube (Sartorius Vivaspin 500, PES) was purchased from WVR (Fontenay-sous-Bois, France).

Venom sampling

Venom was extracted from frozen insects using the existing extraction protocol [26]–[28] with the following modifications to adapt it to our study. In brief, the stinger apparatus was pulled from the hornet abdomen by forceps. The venom reservoir (about 1 mm in length, white and transparent) was separated from the stinger and cleaned with water. Venom was collected by pressing the venom reservoir against the tube and then removing the empty reservoir from the tube. Venom was pooled (2-5 reservoirs/replicate) and 50 μ L of ultra-pure water was added. The tube was centrifuged at 4°C, at 10000 xg for 10 min to eliminate the debris (the protocol was repeated 2 times). The supernatant was then lyophilized in 24 hours, and kept at -20°C for the following step. The quantity of venom was determined by the difference in the tube weight before and after lyophilizing.

A total of 435 worker hornets were collected in hornet colonies from different locations in the Indre-et-Loire department (area 6126.70 km²), in the Centre-Val-de-Loire region, France, as follows: in 2017, June (9 replicates from La Riche), July (9 replicates from Beaumont-la-Ronce), October (6 replicates from Nouzilly), November (10 replicates from Vouvray and Lublé) and December (4 replicates from Montlouis-sur-Loire); in 2018, June (6 replicates from two colonies in Montlouis-sur-Loire), July (7 replicates from Nouzilly and Chinon), August (10 replicates from Luynes) and October (13 replicates from Saint-Paterne-Racan). Asian hornets in France are not currently covered by legislation on the protection of animals used for scientific purposes

Sample preparation

Lyophilized venom was dissolved in ultra-pure water and the volume adjusted to obtain a concentration of 3 mg/mL. A 10 kDa-ultrafiltration tube (Sartorius Vivaspin 500, PES) was used to separate the peptide fraction and the protein fraction. The tubes were pre-washed with 100 µL of ultra-pure water at 15000 xg for 15 min at 4°C. 25 µL of each venom solution was diluted with 175 µL ultra-pure water and added to the tube, followed by a centrifugation at 15000xg, at 4°C for 20 min. 150 µL of ultra-pure water was added and a second centrifugation was applied. The filtered solution containing the peptide and small-molecule fraction was collected, lyophilized for 48h and stocked at -20°C before use. The lyophilized sample was then dissolved in 375 µL of 0.1 % formic acid (FA). A desalting step with the SPE cartridge HLB (30 mg, 1 cc, Oasis, Water Corp) was carried out following the producer's protocol [29] with the following modifications to adapt it to our samples: column conditioning with 2 mL acetonitrile (ACN), column equilibration with 2 mL 0.1% FA, sample loading with 300 µL venom sample, washing with 2 mL 0.1% FA and 1 mL of water, elution with 1 mL ACN/water/FA (60/40/0.1) and 0.5 mL ACN/water/FA (70/30/0.1). The eluted solutions were then injected into LC-MS. A quality control (QC) sample was prepared by pooling all the samples at the same volume. This sample was usually injected between the analyses to evaluate the stability of analysis [20].

LC-MS analysis

3 µL venom solutions were randomly injected into the UHPLC system (Dionex Ultimate 3000, Darmstadt, Germany) coupled with Maxis ESI-QTOF-HRMS-MS/MS (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). The column used was a Phenomenex XB-C18 Aeris wide-pore 3.6 µm, 2.1x150 mm, 200 Å (Le Pecq, France), thermostable at 40°C, with a flow rate of 0.5 mL/min. Mobile phase was a gradient

of solvent A (ACN: 0.08% FA) and B (water: 0.1% FA) with a modification of solvent A as follows: 0-11.4 min: 2-75%; 11.4-12 min: 75-90%; 12-14 min: 90%; 14-14.5 min : 90-2%; 14.5-16.5: 2%.

MS calibration was carried out with an ESI-TOF tuning mix (Sigma-Aldrich). Full scan mass was set over the range of 50-2500 m/z. The eluate went directly to the ESI-QTOF-MS mass spectrometer system with the following parameters: capillary voltage 4500V, nebulizer gas 2.0 bar, dry gas 9.0 L/min at 200°C. LC-MS analyses were controlled by Chromeleon Express (Thermo Fisher) and OTOF Control (Bruker) software and data were processed with the Compass DataAnalysis software (Bruker). A QC sample was added every 6 samples during analysis.

Data matrix creation by XCMS data processing

This step aimed to create a matrix in which rows correspond to samples and columns correspond to variables (Retention time (RT)-m/z). The data from LC-MS analysis was converted to mzXML files in line spectrum by the CompassXport tool (Bruker) and then imported to the free-access Galaxy web platform [30], [31] of Workflow4Metabolomic (W4M) <https://galaxy.workflow4metabolomics.org> [32]. This platform functions using the XCMS package (R software), allowing one to create an online workflow to generate the matrix from the raw LC-MS database in the order: peak detection → peak grouping 1 → peak alignment → peak grouping 2 → Peak filling → Annotation [15]. The XCMS parameters were defined based on pre-observation of the raw chromatography profile of the venom in the Compass DataAnalysis software (**Annexe 2, Table A1**). During this process, 3 parameters presented several options: in the peak detection step, (1) “ppm” (max tolerated m/z deviation in consecutive scans in ppm), and two parameters in the first peak-grouping step, namely (2) “binsize” (related to m/z, which defines the intervals of m/z for including the peak in a group) and (3) “bandwidth” (related to RT(second), which is the standard deviation of time of gaussian meta-peaks for pooling in a group). These parameters were reported in previous studies to have a significant impact on the matrix quality [18], and were therefore evaluated in our study. The screening ranges for each parameter were selected based on the literature [33], adapting them to our instrumental accuracy and the chromatogram observed in the Compass DataAnalysis software: ppm (5-10 ppm), binsize (0.001-0.002 m/z), bandwidth (15-20s). As the second peak-grouping step was conducted after the alignment step, a smaller bandwidth value of 10 s could be chosen; for the binsize, however, the same value as in the first grouping step was kept.

Improvement of matrix quality

XCMS processing parameters

In order to optimize data processing, a Design of Experiment (DoE) approach combined with maximizing the matrix reliability was applied [18], [19]. Briefly, a pooled venom sample (Vv) was injected into UHPLC-MS in different volumes (0.3-0.6-1.2-2.0-2.5 μL) to obtain the various concentrations. The raw data obtained from UHPLC-MS were imported into the W4M platform. To optimize the three XCMS parameters, a full-factorial DoE was created. The three screening factors were: ppm (5-10 ppm), bandwidth (15-25 s), and binsize (0.001-0.002 m/z). Next, the coefficient of determination R^2 between sample concentration and intensity was used to define the reliable peaks [18], [19]. Here, peaks with $R^2 > 0.9$ were considered reliable peaks (RP) while $R^2 < 0.1$ were defined as unreliable peaks (UP). The reliability index (RI) was proposed in some studies [18], [19] as a criterion for the evaluation of matrix quality. This index was calculated based on the ratio of the number of reliable and unreliable peaks ($(N_{\text{Reliable peak}})^2 / N_{\text{Unreliable peak}}$). The expected responses for this optimization protocol are a high reliability index and a low number of unreliable peaks. The optimized condition in W4M was determined by maximizing the desirability in JMP software. The experimental conditions and raw results of XCMS parameter optimization are described in Table 1.

Determination of the threshold to eliminate noisy peaks

Setting a peak threshold to remove the noisy features appearing in blanks has been shown to improve the data quality [18]. In detail, a peak must be higher than a B/S value (peak intensity in blank/ in sample) and have a minimum intensity to be considered as a real sample peak. The blank used for this optimization protocol was ultra-pure water obtained under the same analysis conditions as the sample. An optimization with DoE based on the reliability index and number of unreliable peaks was performed to determine these thresholds. A full factorial DoE was applied with the range of factors: B/S (0.1, 0.25, 0.5, 0.75) and intensity (1000-10000). The experimental conditions and raw results of this optimization are given in **Annexe 2- Table A2**.

Method repeatability

The repeatability of the analytical method was evaluated by analyzing a Vv sample with four independent filters. The matrix was obtained from the W4M platform using the optimization parameters and treated with the noisy peaks threshold. All the data were then normalized with the total intensity method. The repeatability of this methodology was evaluated by calculating the

coefficient of variation ($CV\%_{\text{repeatability}}$). This $CV\%_{\text{repeatability}}$ was used to determine the non-repeatable peaks that were deleted from the final matrix.

Matrix pretreatment

Firstly, adductions, isotopes, and fragments were eliminated from the matrix with the help of the CAMERA package in W4M [34]. Next, the non-repeatable peaks were excluded from the matrix. Then, during comparative analysis, the QC sample was used to verify the stability of analysis, thus, all the peaks with $CV\%_{\text{Stability}} > 30\%$ were removed from the matrix.

Multivariate data analysis

After treatment, the matrix was imported to the MetaboAnalysis 4.0 platform for statistical analysis with the following settings: missing values were replaced with small values (half of the minimum value in the data), near constant values were removed by applying the interquartile range (IQR), normalization by sum and Pareto scaling were used.

PCA and PLS-DA plots were used to discriminate between the groups. The model was validated by cross-validation in which Q^2 is used to estimate the predictive ability of the model [35] and the permutation test is used to verify the significance of a specific classification compared with the random classification [36]–[38]. The cross-validation method applied in this study was 10-fold CV. The permutation test was calculated based on the ratio of the between sum of squares and within sum of squares (B/W) of each class assignment [38].

Determination of discriminant compounds

Ions with a value of Variable importance on projection (VIP) >1 in the PLS-DA model were selected as discriminant variables. The fold change FC and the p-value of the t-test were calculated to estimate the significance of the discrimination.

Results and discussion

Optimization protocol of XCMS parameters

The correlation between the concentration of venom and its intensity was used to optimize the reliability of the methodology. The optimization was based on maximizing the reliability index (RI) and minimizing the unreliable peaks (UP) in the matrix. In XCMS data processing, three parameters

(ppm, binsize, bandwidth) were imported to the JMP software to build a DoE for optimization. The responses for each condition were the RI and UP values (**Table 1**).

Table 1. Condition and results of optimization of the XCMS parameters. RP: reliable peaks, UP: unreliable peaks, RI: reliability index. In the column Code, +: high, 0: intermediate and - : low level in each condition.

N°	Code	ppm	bandwidth	binsize	RP (R ² >0.9)	UP	RI
		(ppm)	(second)	(m/z)		(R ² <0.1)	
1	+-	10	15	0.001	654	239	1790
2	+++	10	25	0.002	681	177	2620
3	++	10	15	0.002	681	175	2650
4	+-	5	25	0.001	649	213	1977
5	++	5	25	0.002	650	205	2061
6	---	5	15	0.001	649	273	1543
7	++	10	25	0.001	666	239	1856
8	--+	5	15	0.002	653	208	2050
9	000	8	20	0.0015	684	211	2217
10	000	8	20	0.0015	684	211	2217

The application of the JMP model to our data was validated by **Fig. 1** which plots the observed versus the predicted values for each response.

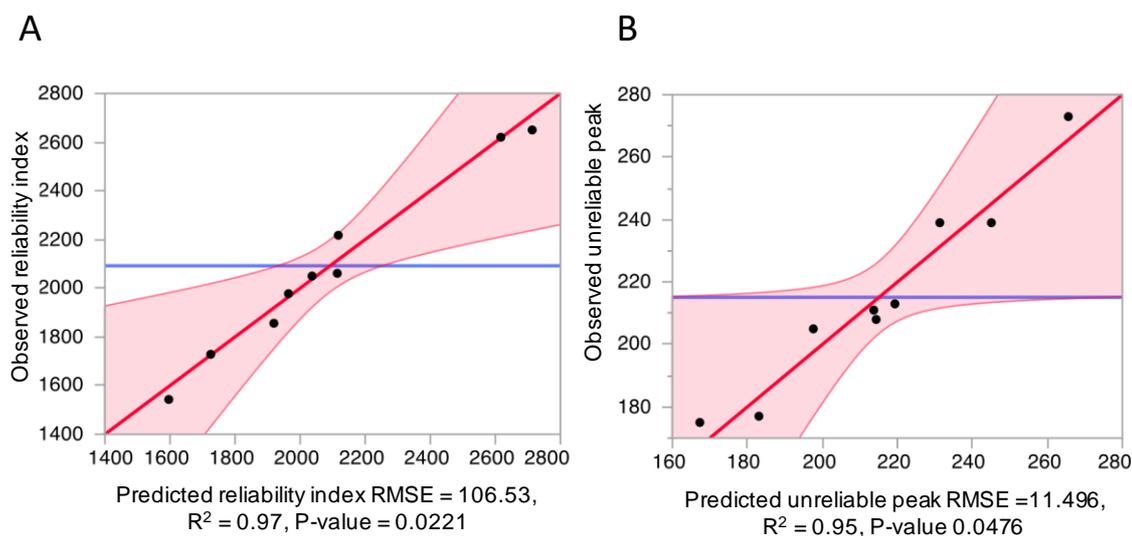


Fig. 1. Optimization of XCMS parameters by JMP software. **(a)** Observed versus predicted value of the Reliability index, **(b)** Observed versus predicted value of Unreliable peaks. Black dot: the response value for each condition, red zone: 95% confidence interval for mean values, red line: relationship between the actual and predicted value, RMSE: root mean square error

The relationship between the actual and predicted value is shown by the red line, the 95% confidence interval for mean values by the red zone, and the response value for each condition by the black dots. The smaller the p-value is, the more significant the model is. RMSE (root mean square error) means random error in the model [39]. As shown in **Fig. 1**, the JMP model produces significant results for both RI and UP responses with $p < 0.05$ (p -value = 0.0221 and p -value = 0.0476, respectively). The modification of RI and UP when the parameters change is well explained by this model with a high R^2 of 97% and 95% respectively. Also, the random errors in both models are relatively small [39]. The red zones in **Fig. 1** showing the 95% confidence interval are quite narrow, indicative of a good correlation between experimental and predicted values. In the present case, all the dots are within this zone. Therefore, the model used in this study to evaluate the influence of three factors (ppm, binsize, bandwidth) on the multi-responses (RI and UP) is significant and realistic. This model can be used to optimize the reliability of the processing method.

Fig. 2 presents the predicted trend of RI and UP and the desirability as a function of parameter variation.

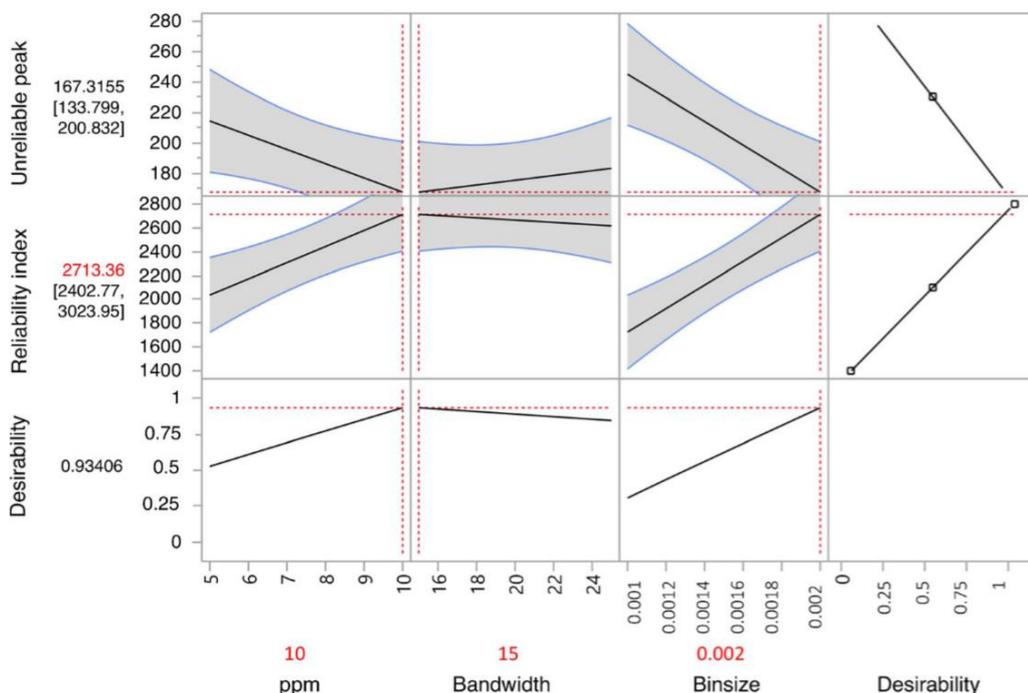


Fig. 2. Prediction profiler of optimization of XCMS parameters by JMP software. Grey zone: 95% confidence interval for mean values

The plot shows that when ppm and binsize increase, RI increases and UP decreases. Binsize has the strongest effect on both RI and UP, as evidenced by the relatively steep linear trend. ppm also

has a significant impact on RI and UP but the impact of bandwidth is insignificant, with a slight linear fluctuation in both RI and UP. When the bandwidth value decreases, this leads to a slight increase in RI and a decrease in UP. From this profile, the optimized conditions of each XCMS parameter to obtain the highest reliability were determined by maximizing the desirability: ppm = 10 ppm, binsize = 0.002 m/z and bandwidth = 15 s. The optimized desirability was excellent at 0.934, meaning that the goal had been achieved. With this condition, the RI is expected to range between 2402 and 3023 with an expected value of 2713. The UP is expected to fall in the range of 133 - 200 with an expected value of 167. Compared with the actual values obtained from the experimental results reported in table 1, the actual value of RI and UP obtained in this condition was 2650 and 175 respectively with a low CV% (coefficient of variation) of 1.66% and 3.3%.

Optimization of threshold for peak elimination from blank

The same optimization protocol with JMP software was used to identify the optimized conditions for eliminating the interfering peaks by comparing with the blank sample. By maximizing the desirability, the optimized condition for a true peak was found to be B/S < 0.1 and peak intensity > 1000 (details of the model are given in **Annexe 2, Figure A.3**).

Repeatability of the method

In a non-targeted approach, it is crucial to minimize variations due to instrumental bias and sample preparation in order to extract only real variables from the biological samples [14]. We therefore investigated the repeatability of the methodology and then defined a criterion for the reliable features.

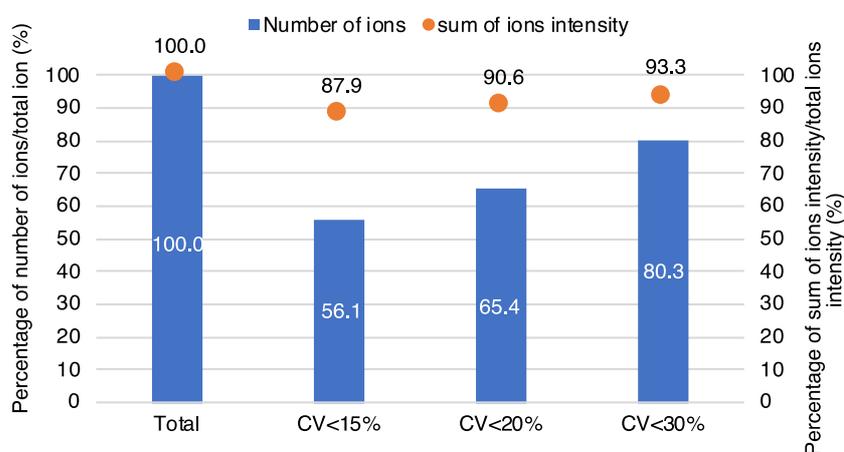


Fig. 3. Repeatability of the method. CV: coefficient of variation

In **Fig. 3**, the CV%<30% can retain 80.3% of total ions while with the stricter CV% <20% and CV% <15%, we lost about 35-45% of total ions. Thus, in this case, CV%<30% allowed us to keep the majority of ions with acceptable confidence. This threshold has also been considered in some non-targeted metabolomics studies by LC-MS [14], [40]. In addition, the cumulative percentages of ion intensity are higher than 87% for all CV% thresholds, and reach 93.3% total ion intensity with CV% <30%, indicating that our method after elimination of non-repeatable ions is able to keep most of the abundant peaks with an acceptable variability. A list of ions with CV%_{repeatability} >30% was established and used to eliminate non-repeatable ions from the matrix.

To assess the stability during analysis, a QC sample was used to eliminate the non-stable ions induced by intra-analysis stability [14]. All the ions with CV%_{stability} <30% in QC were kept for data analysis.

Application to the venom profile comparison of collection period variation (summer vs winter)

The methodology developed above was applied to the comparative study of peptide venom profiles in different collection periods (summer and winter) during two successive years, 2017 and 2018. The matrix was obtained with optimized XCMS parameters, followed by suppressing the interfering ions from blank and eliminating isotopes, adducts, non-repeatable ions using CV%_{repeatability} <30% and non-stable ions evaluated by QC using CV%_{stability} <30%. The matrix obtained comprised 238 ions for 2017 and 156 ions for 2018. The ion matrix was then imported to the MetaboAnalyst 4.0 platform. After normalization with total intensity sum and Pareto scaling, a normal linear distribution (Gaussian) was obtained (see **Annexe 2 Figure A.4**). Compared with the original data, the variances of each feature were larger and comparable. Thus, the data after normalization and scaling were suitable for statistical analysis.

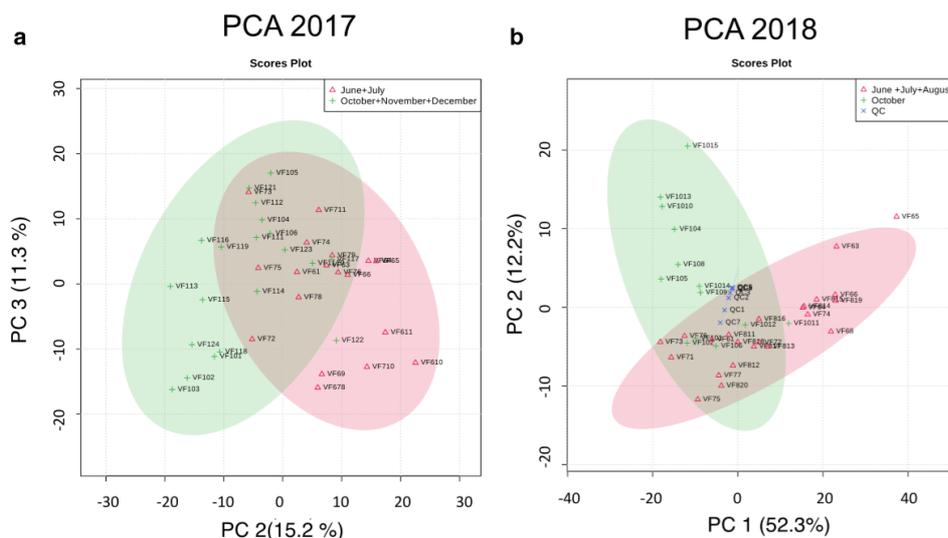


Fig. 4. PCA representation of collection period variation. (a) 2017, (b) 2018. Each dot corresponds to a replicate, PC: principal component

The data matrix was submitted to PCA multivariable analysis. As can be seen from **Fig. 4**, the first three principal components (PC) significantly explain 69.8% and 73.9% of data variances in 2017 and 2018, respectively. The QC samples cluster in the center of the plot, giving good confidence in this analysis. In both years, a slight discrimination is observed by the drift of the two blocks between venom collected in winter and summer.

To verify the existence of discrimination between summer and winter populations and reveal the biomarkers, the PLS-DA model which favors the separation of each group by defining the supervised classification was used. In **Fig. 5**, the PLS-DA model also discriminated slightly between the two periods, giving a total for the first three components of 62.4 in 2017 (**Fig. 5a**) and 70.3% in 2018 (**Fig. 5b**). Because the PLS-DA model tends to be overfitted, model validation is essential. In the cross-validation method, the PLS-DA model had an accuracy of 0.84, $R^2=0.55$, and $Q^2=0.42$ in 2017 and an accuracy of 0.82, $R^2=0.64$, and $Q^2=0.52$ in 2018. Although the Q^2 of both years are not excellent (there is no threshold value for Q^2 but the closer to 1 it is, the better the prediction capacity the model shows, for the biological samples, $Q^2>0.4$ is experientially acceptable[41]), it is moderately acceptable.

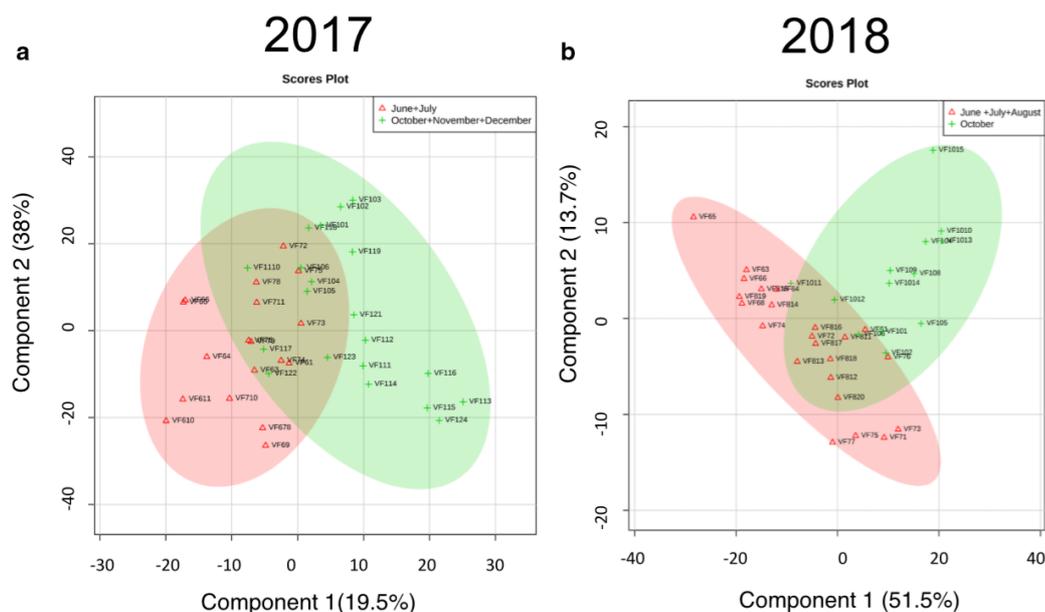


Fig. 5. PLS-DA representation of collection period variation. (a) 2017, (b) 2018. Each dot corresponds to a replicate

We therefore conducted a second validation test to verify if the model is statistically significant or if the results are created by random noise. The permutation with 100 tests (see **Annexe 2 Figure A.5**) showed the separation of the original sample (red bar) from the distribution of the permuted class assignment with $p=0.03 < (\alpha=0.05)$ in both 2017 and 2018,

demonstrating that the classification of the two groups in our PLS-DA model was statistically significant [36]. Therefore, this model could be used to investigate the collection period variation of venom peptide-LMWC profiles.

As can be seen from **Fig. 5**, a mild discrimination in the venom peptide profile was observed between the summer and winter groups in the PLS-DA model over two experimental years. Although the intra-variations in each block were relatively large, this is inevitable because insect samples were collected from nature. Importantly, the study was done by pooling samples from different hornet colonies for each period, thus excluding the possibility that the collection period difference was due to inter-colony variations. Also, the geographical effect is assumed to be negligible by the fact that all the replicates were collected in the same area (Indre-et-Loire).

Based on the multivariate statistical comparison between summer and winter venom in 2017 and 2018, the discriminating compounds found to be common in both years were expected to be the potential biomarkers for the collection period variation. Consequently, the common ions with $VIP > 1$ in both years were extracted from the PLS-DA model. Table 2 gives the VIP score of these

features, their fold change value in summer/winter ($FC_{S/W}$) and p-value from the t-test and variances of these ions by box plot in the normalized values. Among them, three compounds (numbers 1, 2, 9) had a different variance tendency of $FC_{S/W}$ over the two years. They are assumed to be the compounds impacted by factors other than the collection period. The variation of the other seven compounds over the two years was homogeneous.

Table 2. Common discriminative compounds with the VIP score >1 in two years 2017 and 2018. *: p-value <0.05 : statistically significant discrimination. FC (S/W): fold change of Summer/Winter. Color in row show the overproduced group between two participated groups in which: Summer, Winter. In the plot box column: ■ Summer, ■ Winter.

N°	Molecular mass (Da)	[M+nH] ⁿ⁺ (m/z)	RT (s)	2017			2018			Box plot	
				VIP score	FC (S/W)	P-value (t-test)	VIP score	FC (S/W)	P-value (t-test)	2017	2018
1	470.3197	471.3272	212	2.36	1.22	0.143	1.54	0.89	0.089		
2	1201.6580	401.5615	230	3.25	1.71	0.008*	2.10	0.70	<0.001*		
3	800.5142	401.2645	231	3.36	0.55	0.194	2.16	0.52	<0.001*		
4	714.3418	358.1794	246	1.12	3.19	0.001*	1.04	2.33	0.003*		
5	1344.7228	449.2485	246	3.12	11.10	0.004*	2.47	2.40	0.001*		
6	1002.5267	502.2712	248	1.14	0.75	0.405	3.77	0.31	<0.001*		
7	1384.8151	462.6129	284	2.06	1.97	0.01*	2.01	2.46	<0.001*		
8	740.4194	371.2173	284	1.13	1.66	0.034*	1.25	2.69	0.001*		
9	913.5955	457.8068	298	1.06	1.14	0.301	2.69	0.87	0.011		
10	653.4451	654.4508	298	1.38	0.77	0.187	1.33	0.83	0.002*		

As can be seen in Table 2, the ratio of compounds 3, 6, 10 increased in winter whereas the intensities of compounds 4, 5, 7, 8 increased in summer. For more detail, the **Figure A.6 in the Annexe 2** indicates their position in the LC-MS base peak chromatogram and the extracted ion chromatograms of discriminant compounds in summer and winter collection period in 2018. Although the functions of peptides in Asian hornet venom have not been fully identified, we suggest here some hypotheses about this discrimination based on previous studies. In 2017 and 2018, the temperatures in summer (June to August) were higher than in winter (October to December) (data from www.linternaute.com). As hornets' nests are generally located outdoors, the seasonal impact can alter the generation of venom [42]. Besides, it is crucial to take the impact of the hornet life cycle into account in order to explain this collection period discrimination. Summer (June to August) in France is the active period of growth of the hornet colony and nest expansion [22] while in winter (September to December), the activity of hornets is focused on reproduction by the queen and hornets die at the end of the year [22]. The observation of hornet workers in terms of their body size (**Figure A.6, Annexe 7**) demonstrated that insects collected in summer are often significantly smaller than those collected in winter. Thus, the compounds overproduced in winter may also correspond to the physical growth of these insects. In summer, hornets prey on the domestic honeybee and also have more frequent contact with vertebrate predators, thus the increased intensity of compounds 4, 5, 7, and 8 may be related to defense or hunting behavior [43]. The influence of age and the season on quantitative changes in venom composition have also been reported in certain studies on honey bee venom [44] and social wasps [27]. The peptides present in wasp venom have been reported to belong to antimicrobial peptides or inflammatory peptides such as mastoparans, chemotactic peptides, and wasp kinins [27]. It has also been suggested that wasps use their venom to prevent infection by microorganisms in their nest or by their prey [43]. Understanding peptide variation therefore can help to predict the biological properties of venom.

The discrimination between venom collected in summer and winter was observed over two successive years and the ratio of fold change $FC_{S/M}$ of common discriminating compounds was mostly repeatable. Thus, it is suggested that the use of LC coupled with mass spectrometry enabled the impact of variation in the Asian hornet venom peptidic-LMWC profile to be evaluated with confidence.

Conclusions

To our knowledge, this is the first study to reveal the peptide-LMWC profile of Asian hornet venom (*Vespa velutina nigrithorax*). The study has presented the development of an analytical methodology based on UHPLC-ESI-QTOF-HRMS combined with multivariate statistical analysis to investigate the variation in the peptidic-LMWC profile of *Vespa velutina* venom in different conditions. The reliability of the method was improved by optimizing three data processing parameters of the XCMS package and determining a threshold for interfering peaks from blank to improve the reliability of matrix construction. The methodology also showed a significant repeatability in terms of ion number and intensity. The application of this method to the investigation of the peptide-LMWC venom profile with regard to two different venom collection periods (summer-winter) revealed a mild discrimination in the overall venom profile over two continuous years (2017-2018). Nevertheless, this period effect should be considered when investigating the biological properties of the peptide-LMWC fraction of Asian hornet venom. 10 compounds were found to be responsible for this discrimination, providing initial information about the collection period. These compounds will be further identified by MS/MS to confirm their variation in the targeted method and screen their bioactivity potentials. Ultimately, the methodology developed here demonstrated the global variation of Asian hornet venom with the collection period. The results of this investigation are a proof of concept and can be applied to reveal other variations in caste and hunting behaviors.

Acknowledgements

We express our acknowledgement to Eric DARROUZET of the Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI, UMR 7261) for providing the Asian hornets.

Funding information

We are grateful to the Centre-Val-de-Loire Region (France) and the program ARD 2020 Cosmétosciences for financial support.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving animals

Asian hornets in France are not currently covered by legislation on the protection of animals used for scientific purposes

En tant qu'animal vivant organisé dans une société, les frelons asiatiques peuvent faire face à potentiellement des comportements et des types de stress variés selon leurs rôles dans la société et les conditions environnementales. Dans le cadre du « sourcing », nous avons donc eu l'opportunité d'accéder aux individus collectés devant des ruches d'abeilles et différentes castes (reine, fondatrice, ouvrière), fournies par notre partenaire Eric DARROUZET de l'IRBI (Tours). La méthodologie développée précédemment a été appliquée sur ces différentes catégories de venin afin d'évaluer s'il existe d'autres marqueurs discriminants.

2 Influence des comportements (ouvrière prédatrice) sur la composition du venin de frelon asiatique

Dans son milieu naturel, l'animal peut selon certaines conditions (prédations, défenses) devoir utiliser son venin. Dans le cadre de certaines espèces, telles que les cônes marins *Conus geographus*, il a été observé une large variation lorsque ces derniers sont dans un état de défense (ou prédation) par rapport à leur venin récupéré après dissection [45]. Au niveau des frelons asiatiques, la proie principale de cet insecte en France comme en Asie est l'abeille domestique. Les frelons asiatiques sont souvent trouvés à voler devant l'entrée des ruches d'abeilles pour les chasser (**Figure IV.1**).



Figure IV.1 : Frelon asiatique volant devant la ruche pour la prédation (par Fabrice REQUIER [46])

Dans le cadre d'une attaque de frelons asiatique autour d'une ruche, ces derniers prédateurs pénètrent dans la ruche pour attraper les couvains qui servent à nourrir leur larve. D'après la littérature, la prédation des frelons (de caste ouvrière) commence en juillet et devient plus intensive à partir de mi-septembre jusqu'à leur mortalité en décembre [47]. En Europe, l'intensité de prédation de *V. velutina* sur les abeilles *A. mellifera* atteint son maximum en octobre [48]. Le rôle de ces ouvrières est essentiel pour la recherche de nourriture pour la colonie [49]. Dans le cadre de cette prédation, les insectes hyménoptères sont amenés à utiliser leur venin pour défendre ou attraper leurs proies [50]. Dans ce contexte, l'étude de comparaison des profils de venin d'ouvrières en tant que prédateur versus « au sein du nid » permettrait d'évaluer s'il existe un lien «comportement-physiologie» chez le frelon asiatique et de mettre en évidence d'éventuelles molécules différenciantes.

2.1 Échantillonnage des venins : ouvrières prédatrices et ouvrières au sein du nid

Afin d'investiguer l'impact de cet effet sur le profil du venin, des ouvrières ont été collectées devant des ruches d'abeilles (prédation) et les autres dans des nids de frelons dans le département d'Indre-et-Loire, en région Centre-Val-de-Loire, en France.



Figure IV.2 : Le frelon *V. velutina* collecté devant ruche et dans le nid [51]

Dans le cadre de cette étude, les frelons ont été échantillonnés sur un même mois (octobre) sur les deux années consécutives. En 2017, 6 répliques de frelons ont été collectés dans un nid à Nouzilly et 7 répliques des frelons ont été collectés devant un rucher d'abeille à Saint-Cyr-sur-Loire et à Tours. En 2018, 13 répliques de frelons ont été collectés dans un nid à Saint-Paterne-Racan et 4 répliques ont été échantillonnés devant ruche dans la région Indre-et-Loire, localisation inconnue. Chaque réplique est composée à partir de 3 à 5 frelons.

2.2 Comparaisons des profils

La méthodologie de préparation des échantillons, LC-MS et le traitement des données développé dans la **section 1 de ce chapitre** ont été appliqués à ce nouvel échantillonnage afin d'obtenir la matrice. Dans le cadre de cette étude, la normalisation a été faite avec la totalité des intensités de pics et le scaling est fait par «auto-scaling» (moyenne des données centrées et divisées par l'écartype de chaque variable) afin d'obtenir des matrices plus comparables et possédant une forme de gaussienne.

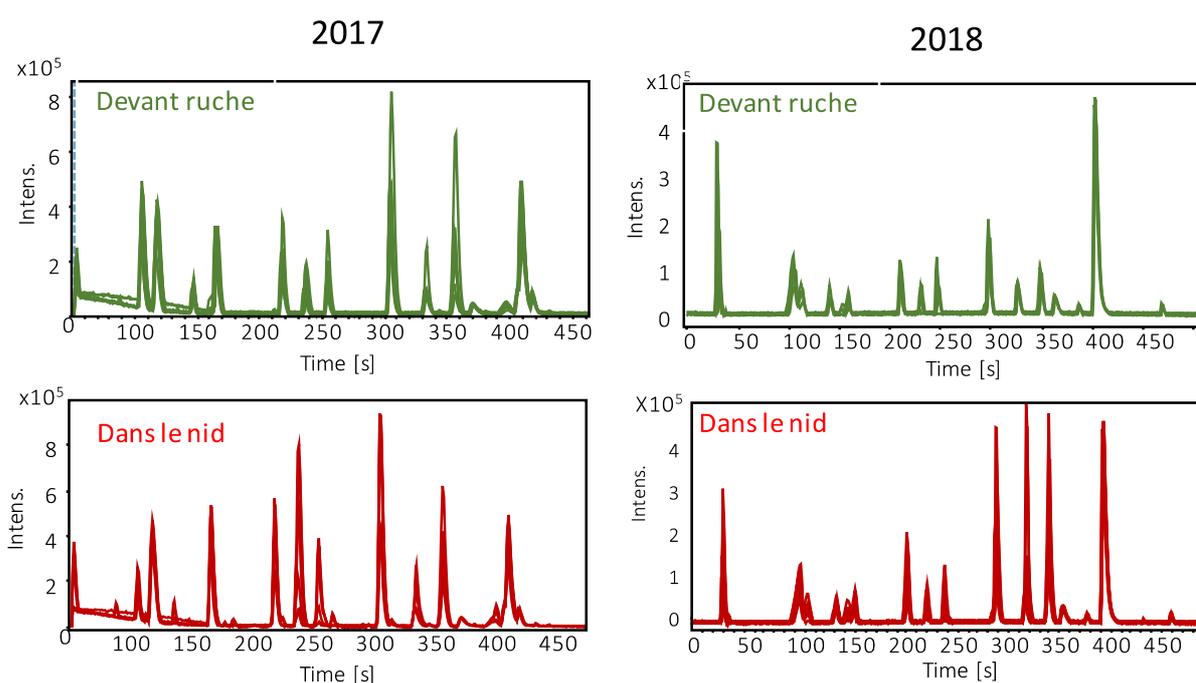


Figure IV.3 : Chromatogramme de l'ensemble des venins collectés pour la comparaison du venin de frelon devant le rucher et dans le nid en 2017 et 2018

Remarque : le pic à RT= 335 s'expose une variation avec un CV>30% lors de l'investigation de répétabilité de méthodologie, dans ce contexte, ce dernier sera éliminé de la matrice. Étant donné que les QCs sont réalisés à partir des échantillons du mois août et octobre, ces derniers ne sont pas présentés dans le modèle PCA et PLS-DA ci-dessous. Néanmoins, ils sont tous concentrés dans un même cluster validant la qualité de la matrice.

Le modèle PCA et PLS-DA ont été exporté avec le même protocole dans la comparaison de l'influence de la période de collecte (**section 1**).

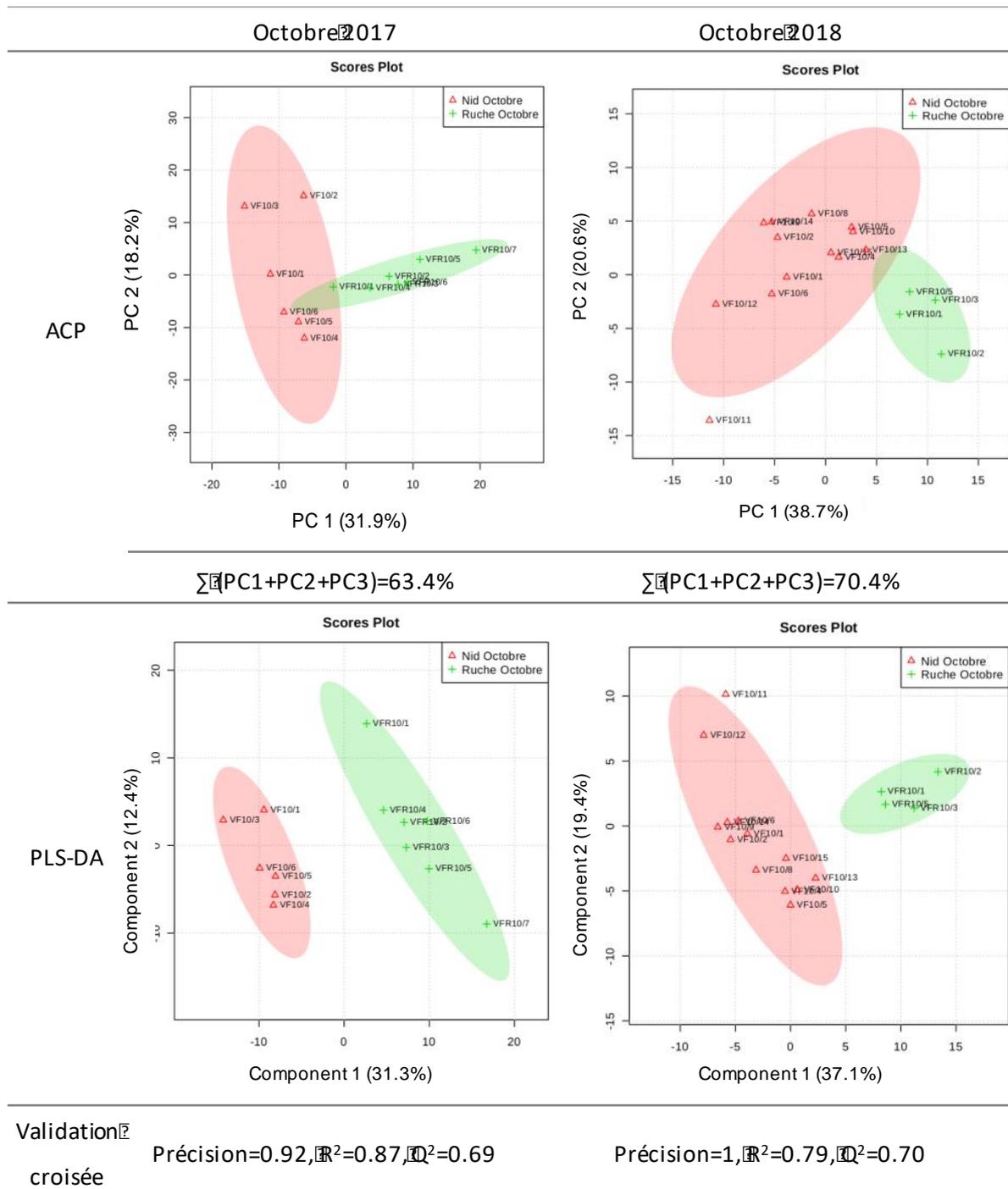


Figure IV.4: Représentation de PCA et PLS-DA dans la comparaison du profil peptidomique du venin de frelon d’ouvrières collectées devant rucher et dans le nid de frelons sur deux années consécutives 2017-2018

Bien que la variation de l’intraéchantillon soit relativement grande pour les échantillons collectés dans le nid de frelons, l’analyse PCA a permis d’observer sans classification préalable deux groupes de venin présenté en **Figure IV.4**. De plus, cette séparation s’est avérée reproductible sur

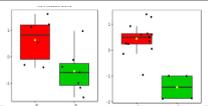
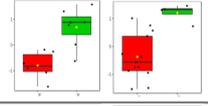
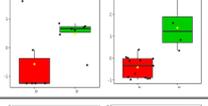
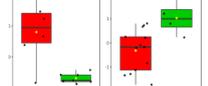
les deux années consécutives avec un pourcentage des trois premières composantes principales élevé de l'ordre de **63.4% (2017)** et **70.4% (2018)** respectivement.

La discrimination entre les deux populations est quant à elle obtenue à partir de la première composante principale avec une variance de **31.9% en 2017** et de **38.7% en 2018**. Le modèle PLS-DA quant à lui permet, pour les deux années consécutives, de montrer une discrimination significative entre les frelons collectés dans le nid et ceux devant les ruches d'abeille avec une bonne capacité de prédiction au vu des valeurs élevées de validation croisée. Celle-ci étant de l'ordre de $Q^2_{(2017)}=0.69$, $Q^2_{(2018)}=0.70$ (**Figure IV.4**) De plus, il permet d'identifier les marqueurs responsables de cette discrimination.

2.3 Effet prédateur ou non : molécules discriminantes et communes entre 2017-2018

Comme pour l'étude sur l'influence de l'effet période de la collecte des frelons, les molécules discriminantes ont été sélectionnées en tenant en compte à la fois de leur valeur de $VIP > 1$ dans la composante 1 et de leurs coïncidentes entre les deux années comparées (octobre 2017 et octobre 2018). Les composés avec le score de VIP plus élevé font partie plus importante à la différenciation des groupes comparés. Les valeurs de VIP, leurs « fold changes » (FC de nid/ruche – $FC_{N/R}$) ainsi que leurs validations t-test sont présentés dans le **Tableau IV-1**.

Tableau IV-1 : Les couleurs dans chaque ligne représentent le groupe ayant la valeur surexprimée par rapport à l'autre groupe. Pour les conditions « Dans le nid » en orange et en vert « Devant rucher ». Pour les boîtes à moustache, les couleurs seront : ■ Dans le nid, ■ Devant rucher.

N°	Masse moléculaire (Da)	[M+H] ⁺ (m/z)	RT (s)	Octobre 2017			Octobre 2018			Boîte à moustache (2017 vs 2018)
				VIP score	FC (N/R)	P-value (t-test)	VIP score	FC (N/R)	P-value (t-test)	
1	1088.5912	545.2964	230	1.18	2.13	0.027*	1.55	3.66	<0.001*	
2	1018.5410	510.2713	248	1.50	0.40	0.002*	1.30	0.49	0.002*	
3	766.5294	384.2726	252	1.07	0.39	0.051	1.49	0.33	<0.001*	
4	672.4270	673.4278	289	1.51	6.09	0.002*	1.11	0.60	0.013*	

Dans le cadre de cette étude, parmi les molécules discriminantes, **quatre d'entre elles** ont été trouvées en **commun sur les deux années consécutives** (2017 et 2018). Cependant, seuls trois composés présentent la même tendance (« sur ou sous expression » entre les conditions, étudiées nid et ruche. Il s'agit d'apporter un seuil de confiance supplémentaire aux molécules discriminantes et d'éliminer au maximum les faux positifs. Dans ce contexte, la variation du composé **4** (m/z 673.4278) n'étant pas la même sur les deux années, nous avons fait le choix de ne pas le prendre en considération comme molécules discriminantes du facteur « rôle de prédateur ».

Parmi les composés évoluant avec la même tendance sur les deux années, le composé **1** (m/z 545.2964) est plus intense pour les frelons collectés dans le nid. En revanche, deux composés **2** (m/z 510.2713) et **3** (m/z 384.2726) sont quant à eux plus abondants dans le venin des frelons collectés devant la ruche. Ces résultats sont confirmés par le test statistique « t-test ». Les tendances de changement ($FC_{N/R}$) de ces molécules sont relativement identiques dans les deux années consécutives. Dans ce contexte, ces molécules peuvent être considérées comme de potentiels biomarqueurs de l'effet « rôle de prédateur des ouvrières ». Leurs boîtes à moustache présentées au sein du **Tableau IV-1** illustrent en détail les variances de ces masses avec les valeurs normalisées.

Ce résultat a permis de mettre en avant pour la première fois un profil peptidique du venin de frelon différenciant selon la nature de la fonction des ouvrières au sein de la colonie (en particulier prédatrice). Cette particularité participe à une meilleure connaissance du « sourcing » du venin et s'intègre dans la mise en avant de molécules potentiellement bioactives après une phase de prédation.

3 Influence de la nature de la caste du frelon asiatique sur la composition du venin de frelon asiatique

Les frelons sont des insectes sociaux qui vivent dans une communauté classifiée par les castes avec une seule reine (femelles reproductrices), des milliers d'ouvrières (femelles vierges) et les mâles par nid. Le cycle d'un nid de frelons dure un an avec la construction initiale du nid par une femelle reproductrice fondatrice lors de début du printemps (de mi-février à mai). Elle passe principalement son temps à l'extérieur du nid afin de chercher de la nourriture et des fibres de bois pour la construction du nid. Quand la première série d'ouvrières apparaît, la fondatrice reste dans le nid et devient la reine. Contrairement aux fondatrices, la reine ne sort plus du nid et ne s'occupe que de la fécondation. Les ouvrières ensuite deviennent la force principale pour chercher les

nourritures. Dans ce contexte, une question est posée : est-ce que le rôle différent de chaque insecte est capable d'alter le profil de venin ? Dans ce contexte, la comparaison de venin des différentes castes est présente dans l'étude suivante.

3.1 Echantillonnage des venins : castes (reines, fondatrices et ouvrières) au sein du nid

L'investigation de l'impact des castes sur les profils peptidiques de venin a été réalisée sur les frelons collectés en 2017: les fondatrices (6 répliques avec 1-2 frelons/réplique collectés à quatre endroits en avril et en mai: La-Ville-aux-dames, Poirier, Saint-Cyr-sur-Loire et Savonnières), les ouvrières (7 répliques avec 3 frelons/réplique collectés en juin et en mai aux communes : Tours, Charentilly, Bléré), les reines (2 répliques avec 1 frelon/réplique collectés à Montlouis-sur-Loire en juillet et à Poitiers en juin).

Remarques : D'après nos observations empiriques, les tailles des trois castes étudiées (fin mai- début juin) ont pu mettre en avant que les reines et fondatrices présentaient une taille plus grosse que celles des ouvrières. Ces différences sont également proportionnelles avec la taille du sac à venin. En raison de la rareté des reines, nous n'avons été en mesure que de travailler sur deux individus de cette caste. Malgré ce faible nombre d'échantillons de reine, l'opportunité d'initier une comparaison préliminaire de ces castes par une analyse statistique participe à une meilleure connaissance de l'effet « sourcing ».

3.2 Comparaisons des profils

En observant les chromatogrammes des échantillons dans la **Figure IV.5**, une discrimination entre les fondatrices et les deux autres castes (reine et ouvrières) semble notable. En effet, le profil peptidique des fondatrices semble significativement moins intense entre 200 et 300 secondes.

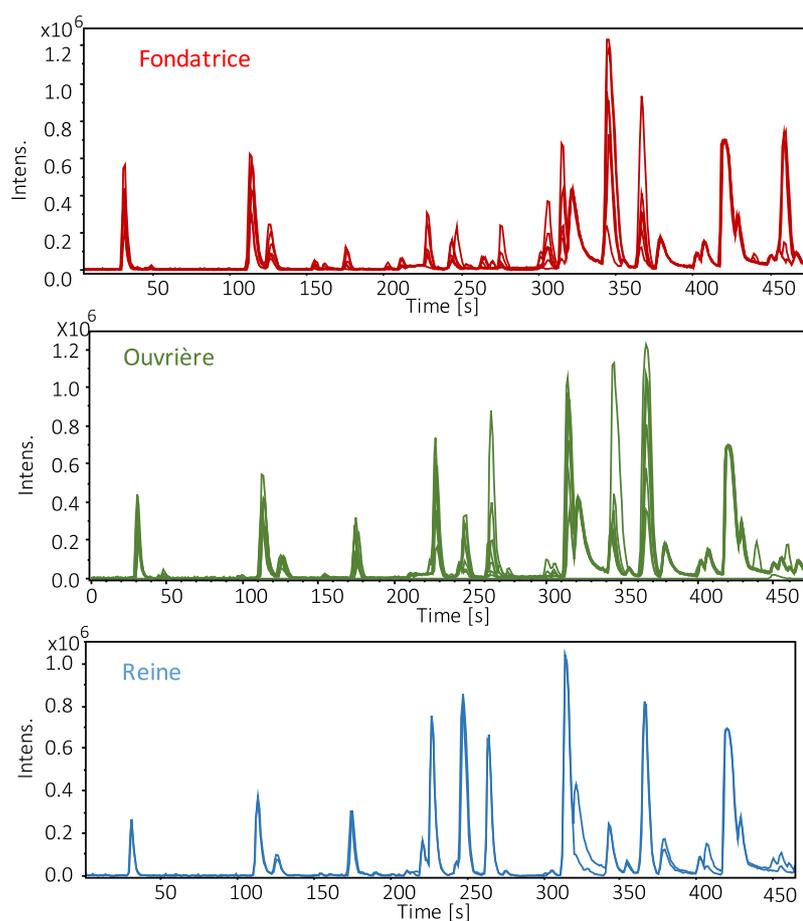


Figure IV.5 : BPC Chromatogrammes de reines, ouvrières, fondatrices pour les ions compris entre 49 et 2250 Da

Les démarches analytiques pour la création de la matrice ont été faites comme les études précédentes. La normalisation est faite avec la totalité des intensités et «pareto scaling » (moyenne des données centrées et divisées par racine carrée de l'écart type de chaque variable).

D'après de la **Figure IV.6**, les échantillons QCs se focalisent au cluster au centre du graphique, montrant une fiabilité de cette analyse. La présentation en PCA permet de séparer la reine de deux autres groupes (fondatrices et ouvrières) sur l'axe de PC1 avec une explication de 54.2% des données. En outre, le cluster des fondatrices est légèrement séparé de celui des ouvrières. Ce modèle peut expliquer la majorité des données avec la totalité de trois premières composantes principales jusqu'à 84.8%.

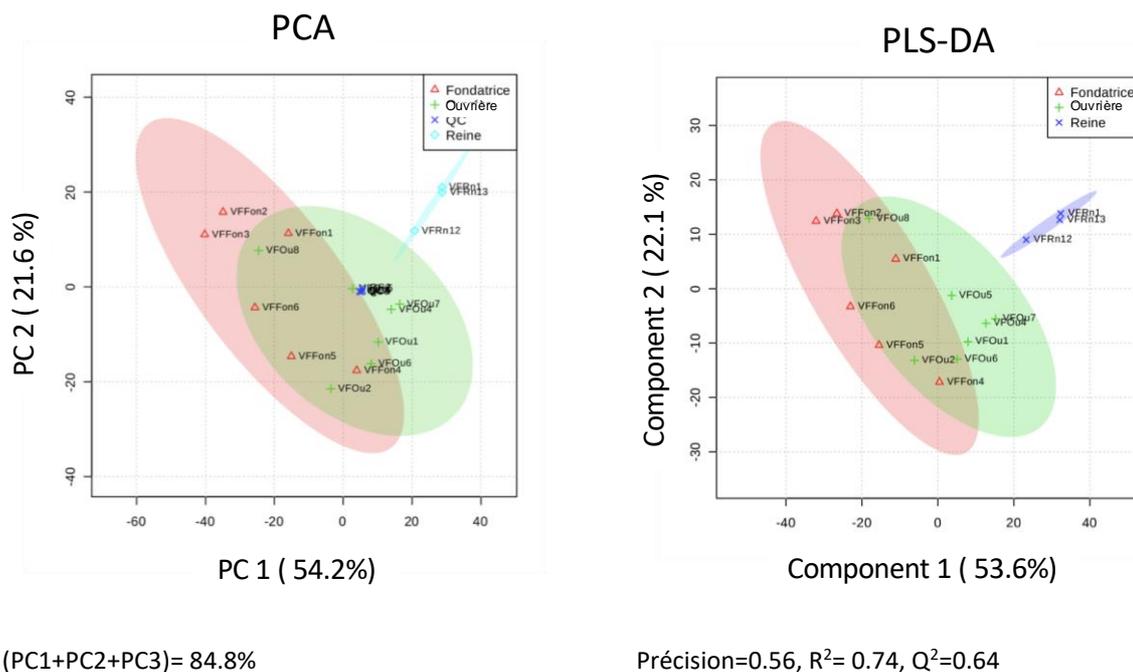


Figure IV.6 : Représentation des PCA et PLS-DA des venins des différences castes : fondatrice, ouvrier et reine.

Le modèle de PLS-DA de trois groupes des castes montre une tendance similaire que le modèle PCA. Dans ce modèle, la capacité de prédiction de composante est prometteuse avec le $Q^2=0.64$, mais la précision n'est pas très élevée pour le composant 1 (précision = 0.56). Dans ce cas, l'augmentation des échantillons peut aider à améliorer l'efficacité de modèle. Néanmoins, cette première étude sur les castes nous permet d'avoir une idée sur la variation des profils peptidiques de venin en fonction des castes. En effet, nous observons sur nos deux modèles statistiques une distinction entre le venin de reine et celui des ouvrières et fondatrices. Cette distinction entre le venin de reine et d'ouvrière a déjà été rapportée dans d'autres espèces hyménoptères. C'est le cas d'une étude sur les castes des abeilles qui montre que les ouvrières possèdent une quantité d'hyaluronidase, sécapine, phospholipase A2 plus élevée que les reines [52]. L'investigation des molécules discriminantes a été également réalisée en utilisant le score de $VIP>1$ dans le modèle de PLS-DA et est discutée ci-dessous.

3.3 Molécules discriminantes en 2017

Contrairement aux deux études précédentes, l'échantillonnage des castes n'a pu être réalisé que sur une seule année. Dans ce contexte, la liste des composés discriminants potentiels avec

VIP>1 et possédant le p-value de ANOVA < 0.05 n'a pas été confirmé sur deux années consécutives. Les résultats de cette première étude sont extraits et présentés dans le **Tableau IV-2**.

Remarques : il est à noter que pour cette analyse, l'injecteur a été changé, dans ce contexte nous avons observé un décalage sur nos temps de rétention (RT) de 16 secondes de plus par rapport aux analyses précédentes. La RT présentée dans le tableau est donc recalculée avec une diminution de 16 (s)

Tableau IV-2 : Liste des ions discriminants ($VIP > 1$, p -value < 0.05) de la comparaison des venins des différentes castes. F : fondatrice, O : Ouvrière, R : Reine. Le symbole « = » décrit l'expression égale de deux valeurs normalisées. Les couleurs dans chaque ligne montrent la caste ayant la valeur la plus intense par rapport à deux autres castes. Avec les couleurs respectives pour chaque caste Fondatrice, Ouvrière, Reine. Pour les boîtes à moustache, les couleurs sont : ■ Fondatrice, ■ Ouvrière, ■ Reine.

N°	Masse moléculaire (Da)	[M+nH] ⁿ⁺	RT-16 (RT) (s)	VIP score	Basse < Moyenne < Elevée (valeur normalisée)	Boîte à moustache
1	357.2369	358.2448	160 (176)	2.52	F < O < R	
2	775.4048	388.7103	206 (222)	2.17	F = O < R	
3	272.1592	273.1671	209 (225)	1.17	R < O = F	
4	470.3208	471.3287	212 (228)	4.19	F < O < R	
5	871.4912	436.7535	215 (231)	2.31	F = O < R	
6	1201.665	401.5629	231 (247)	2.5	F < O < R	
7	800.5156	401.2657	232 (248)	5.47	F = O < R	

N°	Masse moléculaire (Da)	[M+nH] ⁿ⁺	RT ₁₆ (RT) (s)	VIP score	Basse < Moyenne < Elevée (valeur normalisée)	Boîte à moustache
8	1002.5318	502.2738	249 (265)	4.42	F=O<R	
9	1570.938	524.6539	290 (306)	1.17	R<O<F	
10	913.6	457.8079	300 (316)	4.76	F<O=R	
11	208.1455	209.1534	322 (338)	1.86	R<F=O	
12	1612.9508	404.2456	326 (342)	1.28	R<O<F	
13	1602.9279	535.3172	329 (345)	2.38	R<O<F	
14	236.1382	237.1461	342 (358)	1.17	R<O=F	
15	1026.6838	514.3498	351 (367)	2.6	O<R=F	

15 ions discriminants ont été extraits à partir de cette comparaison. **7 composés** (1-2, 4-8) semblent être **surexprimés chez la reine** par rapport aux ouvrières et fondatrices. Parmi eux, les composés **7** et **8** font partie des molécules abondantes dans le venin **Figure IV.5**. Outre cette observation sur les reines, **6 composés** (3, 9, 11-14) sont **plus intenses** au sein **des fondatrices** par

rapport aux reines et ouvrières. **Seule** une molécule discriminante **N°15** (m/z 514.3498) est présente de manière plus **abondante** au sein de la caste **ouvrière** en comparaison avec les deux castes.

Parallèlement la molécule **10** (m/z 457.8079) a été identifiée comme étant plus faible chez les fondatrices par rapport à celles des reines et ouvrières.

Ce travail s'intègre dans notre approche statistique multivariée (peptidomique) permettant :

- de mettre en évidence l'influence du « sourcing » (période de collecte des frelons, l'appartenance à une caste et fonction au sein de la colonie) sur les profils peptidiques et petites molécules des venins de frelons.
- d'identifier les molécules discriminantes (potentiels biomarqueurs) responsables de ces différenciations de populations.

Bien que le rôle de ces trois castes soit clairement différent au sein d'une colonie (allant de la fondation du nid suivi de la fondation d'une colonie pour la reine puis de la colonie elle-même avec les ouvrières), il est difficile à ce niveau d'émettre des hypothèses permettant d'expliquer la surexpression de certains peptides en fonction des castes. Néanmoins, ces résultats participent à une meilleure compréhension de la variabilité du patrimoine moléculaire du venin des frelons asiatiques selon son environnement et son organisation. De ce fait, ces observations semblent suggérer que lors d'une recherche d'actifs au sein du venin de frelon, ces derniers devront être envisagés **sans assemblage des venins**.

C'est dans ce contexte que nous avons envisagé d'appliquer une approche de criblage préliminaire développée au sein de notre laboratoire et basée sur le suivi de molécules, afin d'identifier une interaction Ligand /enzymes. Cette approche présente l'avantage d'être compatible avec de faibles concentrations de produit en milieu complexe ainsi qu'une détection spécifique et sensible par spectrométrie de masse (sans marquage de fluorescence). Elle offrira la possibilité d'identifier des molécules présentant une interaction avec les enzymes cibles pour une évaluation guidée de leurs activités in-tubo ou in-cellulo.

Partie II : Mise en place d'une méthode de criblage d'interaction Ligand/enzymes immobilisée basée sur la spectrométrie de masse : Apport de l'approche Ion-Fading/Ion-Hunting couplée à l'ESI-MS sur le criblage de venin de frelon

Dans le cadre de cette seconde partie, les cibles enzymatiques sélectionnées ont été la tyrosinase et l'élastase. Ces dernières ont été immobilisées selon le principe décrit dans la **partie 4.2** du **chapitre II**. Dans un premier temps, des sous-fractions de notre fraction peptidique < 10 kDa ont été réalisées et testées selon l'approche de criblage IF/IH basée sur une détection par spectrométrie de masse. Pour rappel, le principe de cette approche de criblage sera rappelé avant la présentation des résultats.

4 Criblage de candidat possédant une interaction ligand/enzyme au sein des fractions peptidiques de venin de frelon

4.1 Préparation des fractions peptidiques

*Avant de présenter la mise en place de l'approche de criblage Ion-Fading et Ion-Hunting dans le cadre de cette étude, il a été nécessaire de réaliser une préparation d'échantillon du **venin inférieur de 10 kDa**.*

4.1.1 Séparation et collecte des fractions par HPLC-UV

Dans le cadre de cette approche, nous avons choisi de travailler avec des sous-fractions peptidiques permettant de réduire les effets de matrice ou la suppression d'ions lors du criblage enzymatique par l'approche Ion-Fading (IF) et Ion-Hunting (IH). Dans ce contexte, les fractions ont été obtenues après l'injection de 100 µL de venin Vv < 10 kDa (6.5mg/mL) dans le système HPLC (Hitachi Chromaster, VWR, France) équipé d'une colonne LiChroCART Purosphere Star RP-18 endcapped 5 µm, 2x125 mm (Merck, Allemagne), thermostaté à 40°C, avec un débit fixé à 210 µL/min et des conditions de gradient des solvants présentés dans le **Tableau IV-3**.

Tableau IV-3 : Gradient HPLC utilisé pour la collecte des sous-fractions du venin < 10 kDa

Gradient	Temps (min)						
	0	2	25	30	35	35.1	45
0.1% TFA/ACN (%)	10	15	40	90	90	10	10
0.1% TFA/Eau (%)	90	85	60	10	10	90	90

Le chromatogramme a été enregistré à la longueur d'onde λ à 214 nm (**Figure IV.7**), longueur d'onde adaptée à la détection de peptides [53]. Les fractions ont été collectées manuellement à la sortie du détecteur UV.

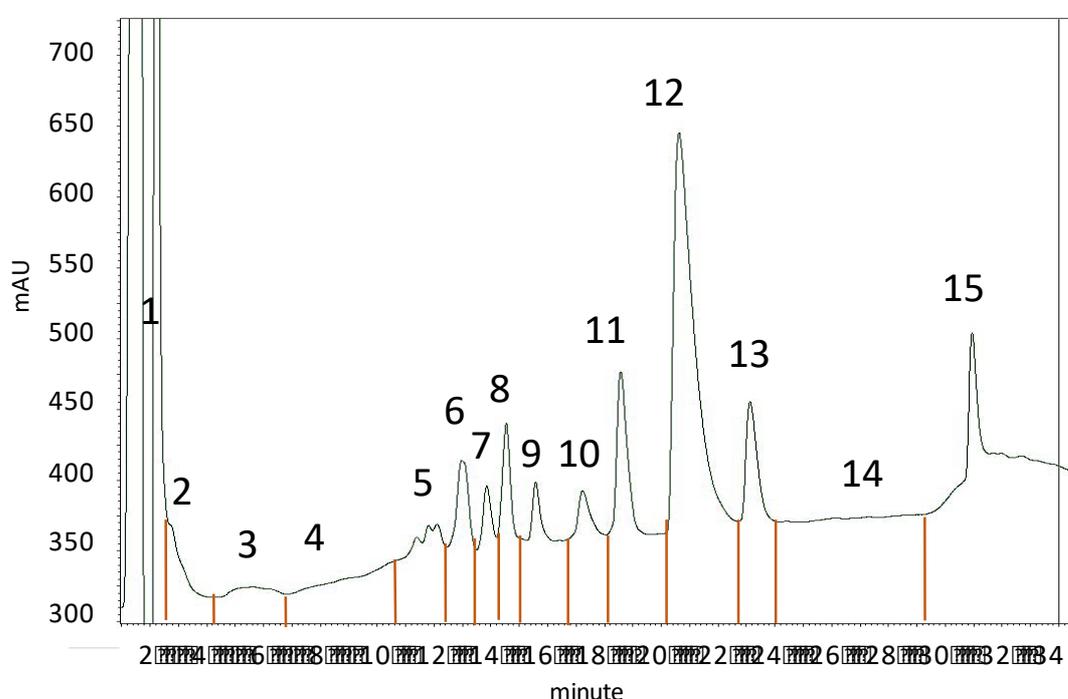


Figure IV.7 : Profil chromatographique du venin Vv < 10 kDa par HPLC-UV et les 15 sous-fractions collectées à l'absorbance 214 nm.

15 sous-fractions ont ainsi été collectées à partir de venin Vv < 10 kDa par HPLC-UV avec une résolution acceptable. Ces dernières ont par la suite été évaporées dans un concentrateur sous vide Speedvac SPD2010 Savant (ThermoFisher, France) pendant 2h, à température ambiante et sous une pression de 5.1 bars. À l'issue de cette évaporation, les sous-fractions ont été conservées à -20°C. Bien que les sous-fractions 2-4 et 14 ne présentent pas de pics significatifs à la longueur d'onde λ à

214 nm, la **composition de chacune de ces dernières et leur richesse moléculaires** ont été évaluées par **ESI-MS** avant l'étape de criblage enzymatique par spectrométrie de masse.

4.1.2 Analyse des profils des sous-fractions HPLC-UV par spectrométrie de masse (MS)

Les profils de chaque sous-fraction ont été analysés par ESI-QTOF-HRMS par des injections en flux continu (FIA). Pour ce faire, les fractions ont été solubilisées dans 100 µL d'eau ultra-pure. La **solubilisation dans un milieu aqueux** est essentielle pour la **compatibilité avec le test de criblage enzymatique (IF/IH)** et la non-dénaturation des cibles biologiques. C'est pourquoi, l'ionisation des fractions a été évaluée dans les mêmes conditions et présentée dans le **Tableau IV-4 ci-dessous**.

Tableau IV-4 : Méthode d'analyse des sous-fractions du venin Vv < 10 kDa -Paramètres de ESI-QTOF-MS

Paramètres	Valeurs	Paramètres	Valeurs
Ionization mode	Positif	Dry temp (°C)	200
End Plate offset (V)	-500	Nebulizer (bar)	0.6
Capillary (V)	4500	m/z range	50-1650 m/z
Dry Gas (l/min)	7.0	Mobile phase	ACN:H ₂ O/0.1AF (65 :35)

1 µL de chaque sous-fraction (diluée) a été injecté dans le système à un débit fixé à 0.2 mL/min. Parmi ces 15 sous-fractions obtenues à partir de la séparation HPLC-UV, **6 d'entre elles** (F3, F6, F11 - F13 et F15) possèdent un profil massique avec **un rapport signal/bruit suffisamment significatif** en vue de l'application de l'approche de criblage (IF-IH) par spectrométrie de masse. Les empreintes massiques obtenues en présence de la bradykinine (fragment 1-7) comme étalon interne sont présentées dans la **figure A.8, annexe 2**.

À travers cette première analyse, nous retrouvons parmi nos sous-fractions un certain nombre de **molécules discriminantes (VIP>1) de la partie I** de ce chapitre.

Remarque : La dilution de chaque sous-fraction a été testée afin d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit en vue de l'approche de criblage.

Afin de simplifier la lecture des masses potentiellement d'intérêts, ces dernières ont été rassemblées dans le **Tableau IV-5** ci-dessous. Il s'agit des ions protonés les plus intenses trouvés dans chaque sous-fraction.

Tableau IV-5 : Listes des masses observées dans chaque sous-fraction de HPLC-UV et décrites ou non comme des molécules potentiellement discriminantes dans la partie 1 de ce chapitre (écrite en rouge dans le tableau).

Fraction	F3	F6		F11
Masses observées	358.2459 [M+H] ⁺	471.3292 [M+H] ⁺	401.2665 [M+2H] ²⁺	457.8084 [M+2H] ²⁺
Dilution (fois)	24	15	15	24
Fraction	F12	F13	F15	
Masses observées	519.3229 [M+3H] ³⁺	514.3508 [M+2H] ²⁺	683.9656 [M+2H] ²⁺	
Dilution (fois)	24	24	24	

Par la suite, l'ensemble de ces **6 sous-fractions** ont été **criblées** sur **deux cibles dermacosmétiques** (tyrosinase et élastase) **immobilisés** sur un support solide et dont le principe Ion-Fading (IF) et Ion-Hunting (IH) et les résultats de cette étude sont présentés ci-dessous.

4.2 Mise en place de l'approche d'immobilisation des enzymes sur un support solide de billes magnétiques

Comme présentées dans le chapitre matériel et méthode (**chapitre II, section 4.3**), les expériences « Ion-Fading » et « Ion -Hunting » sont basées sur l'utilisation d'une enzyme immobilisée sur support de billes magnétique (MPs). Les potentiels inhibiteurs ou substrats de l'enzyme présents dans les sous-fractions peptidiques vont interagir via des interactions spécifiques avec l'enzyme et donc se lier à elle. Contrairement, à l'utilisation d'enzyme sous leur forme libre, grâce aux propriétés magnétiques des billes, celle-ci peut être isolée par aimantation des billes du reste de l'échantillon. Afin de prendre en main cette méthodologie, l'enzyme tyrosinase a été immobilisée de manière covalente sur des nanoparticules magnétiques comme preuve de concept avant l'immobilisation pour la première fois de l'élastase. Ces billes, d'environ 12 nm de diamètre, constituées d'un noyau core-shell d'oxyde de fer recouvert d'une couche de silice, ont été synthétisées et fonctionnalisées au laboratoire (Chapitre II:4.2). Le protocole de synthèse et de la fonctionnalisation des nanoparticules est basé sur l'étude précédente réalisée par Salwinski A. *et al* [54] au sein de notre laboratoire.

Remarque : Bien que **l'immobilisation de la tyrosinase ait été réalisée avec succès**, l'approche IF et IH avec la sous-fraction peptidique du venin de frelon asiatique **n'a présenté aucune interaction spécifique**. Malgré que ce résultat semble confirmer l'absence de ligand de la tyrosinase dans le venin de frelon, nous avons choisi de ne pas présenter les résultats de cette étude afin de nous focaliser sur **ceux obtenus avec l'élastase** comme illustration de notre **méthodologie de criblage**.

4.2.1 Immobilisation de l'enzyme élastase sur billes magnétiques

500 μ L de la solution d'élastase à 15U/mL (lot 2098872, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) dans un tampon phosphate (PHB, 50mM, pH=6.8) a été mélangé avec 500 μ L de la solution de billes magnétiques fonctionnalisées MPs-APTES-GLA (8 mg/mL) dans le même tampon. L'agitation s'est faite dans un bain de glace à l'aide d'un barreau magnétique pendant 6h. L'objectif étant de limiter la dégradation de l'activité de l'enzyme pendant l'immobilisation. Les billes magnétiques ont été lavées avec 1 mL de tampon cinq fois afin d'enlever l'enzyme non immobilisée sur les billes. 1 mL d'une solution de glycine (2 mM dans PHB 50mM, pH=6.8) a été ajouté et le vial a été placé à 4°C pendant 16h afin de protéger les fonctions glutaraldéhydes non fonctionnalisées par l'enzyme et limiter les interactions non spécifiques. Le lot de billes immobilisées a été lavé trois fois avec le tampon formiate d'ammonium (50mM, pH=8) afin d'enlever l'excès de glycine. Finalement, 1 mL du même tampon a été ajouté.

4.2.2 Description de l'approche Ion - Fading et ion - Hunting

4.2.2.1 Préparation des deux lots de billes pour l'étude différentielle

Pour cette approche, le lot MPs-Elastase a été séparé en deux (aliquots), **un lot étant dénaturé et l'autre actif** afin d'évaluer par une **étude différentielle** la présence d'**interaction spécifique avec l'enzyme cible et les sous-fractions criblées**. La dénaturation de l'enzyme immobilisée a été réalisée par l'ajout de 1 mL de MeOH pendant 30 min et ensuite chauffé à 60°C pendant 30 min. Le solvant a été par la suite enlevé et remplacé par 500 μ L de même tampon de formiate d'ammonium pour ne pas modifier l'ionisation par spectrométrie de masse et être comparable avec le lot actif.

4.2.2.2 Description des conditions et du principe appliqué lors de l'approche IF et IH

i) Expériences « Ion-Fading »

Afin de réaliser cette manipulation, une solution de 10 μL de chaque lot (dénaturé et actif) immobilisés a été mise en contact avec 5 μL de tampon formiate d'ammonium (50 mM, pH 8) et 15 μL d'échantillons (sous-fractions peptidiques) pendant une heure à la température ambiante. 25 μL de surnageant, **nommé IF**, a été isolé des billes magnétiques par l'attraction magnétique combinée avec une centrifugation rapide. 15 μL d'une solution de bradykinine (fragment 1-7) de 10 pmol/ μL a été ajoutée au surnageant, comme étalon interne ou standard interne (SI). Ce surnageant réactionnel en présence de l'étalon interne sera utilisé pour **l'expérience IF**.

ii) Expériences « Ion -Hunting »

Parallèlement, avant l'étape de dénaturation **des billes magnétiques isolées** (des lots dénaturés et actifs) lors de l'approche IF, celles-ci sont **lavées avec 50 μL d'une solution de tampon** afin d'éliminer toute molécule en excès. Les billes magnétiques ont ensuite été **dénaturées** par incubation avec une solution de MeOH (25 μL), **nommé IH**, pendant 30 min et à température ambiante. Comme pour la solution IF, 25 μL de surnageant a été prélevé et mélangé avec 15 μL de bradykinine 1-7 (10 pmol/ μL) pour **l'expérience d'Ion-Hunting**.

4.2.2.3 Principe du criblage IF/IH basé par une détection par spectrométrie de masse

Chaque criblage a été réalisé en triplicat sur les lots actifs et dénaturés dans les mêmes conditions. **1 μL de chaque solution IF et IH a été injectée en ESI-QTOF-MS**. Le protocole de cette expérience est présenté à la **Figure IV.8**.

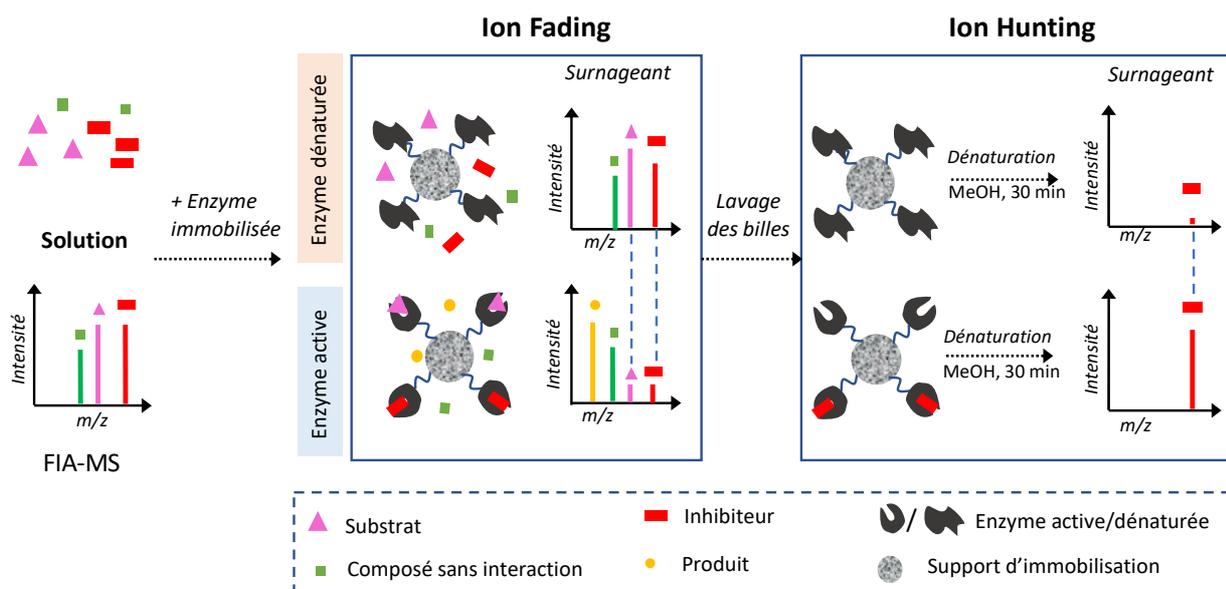


Figure IV.8 : Principe de l'approche de criblage de ligand / enzyme immobilisée par "Ion Fading" et "Ion Hunting"

D'après l'illustration dans la **Figure IV.8**, nous observons l'apport des méthodes IF et IH associées à une détection par spectrométrie de masse pour le suivi de la présence d'interaction spécifique entre notre échantillon et une enzyme immobilisée. En effet, à travers **cette approche différentielle entre notre lot contrôle (enzyme dénaturée) et notre lot enzyme active**,

✓ nous sommes en mesure lors de l'analyse du surnageant IF de suivre:

La présence d'une extinction d'ion (diminution de l'intensité) sur notre lot actif. **Cette extinction d'ion** pourrait alors être expliquée par **une interaction d'une molécule** restée liée à l'enzyme et synonyme à la présence d'un **potentiel candidat inhibiteur (■)**.

Cependant, dans le cas de figure où **une extinction d'ion associé à l'apparition d'un nouvel ion** sur l'empreinte spectrale du lot actif versus dénaturé (**IF**) est observé, alors nous pouvons conclure à la présence d'un **potentiel candidat substrat (ion diminué ▲) et son produit (ion apparu ●)** dans notre mélange complexe.

✓ nous sommes en mesure lors de l'analyse du surnageant IH de confirmer :

Nos observations d'extinction d'ion (**IF**) et hypothèses d'interaction Ligand / enzyme en **dénaturant nos lots d'enzymes utilisés précédemment**. Il pourra ainsi être estimé si nous sommes en présence **d'un vrai positif, négatif ou bien d'un faux positif**. Dans le cadre d'une interaction de

type inhibiteur (■), la **dénaturation des lots de bille (IF)** devrait induire le **relargage spécifique de l'inhibiteur** du lot actif et observer une **augmentation** significative de l'intensité, lors de l'expérience **IH**, de cette molécule (**vrai positif**).

La présence de **faux positif** quant à lui pourrait être observée dans le cadre d'une **interaction non spécifique sur l'enzyme** ou le support. Dans ce contexte, l'analyse du surnageant **IF** des lots dénaturés et actifs présenteront à la fois une **extinction du même ion associé au relargage de cet ion** lors de l'analyse du surnageant **IH**.

4.2.3 Criblage des sous-fractions avec le lot de billes élastase immobilisé

Dans ce contexte, les **6 sous-fractions peptidiques** précédentes (**Tableau IV-5**) ont été testées sur notre lot de billes-élastase actives. Lors de ce criblage, l'ensemble des cas de figure discuté ci-dessus a été observé. En effet, les fractions (**F3 et F6**) n'ont présenté **aucune interaction**. Les **fractions 11 et 12** quant à elles ont présenté **une interaction spécifique**. Finalement, les **fractions 11, 13 et 15** ont présenté des interactions de types **non spécifiques** plus ou moins significatives.

4.2.3.1 Criblage des fractions F3 et F6 : Absence d'interaction spécifique lors du criblage

Lors de l'étude différentielle des empreintes spectrales obtenues lors de l'expérience IF et IH des sous-fractions (**F3 et F6**) avec les lots de billes dénaturés et actifs d'élastase (n=3), **aucune variation d'intensité des ions d'intérêts n'a été observée**. Pour illustrer ce résultat, seule la **sous-fraction F6** a été présentée comme exemple. Les résultats (IF/IH) ont été normalisés selon le rapport d'aire de l'ion d'intérêt sur l'aire de l'ion de l'étalon interne (**Figure IV.9**). Ces résultats ont été représentés sous forme d'histogramme afin de simplifier l'interprétation.

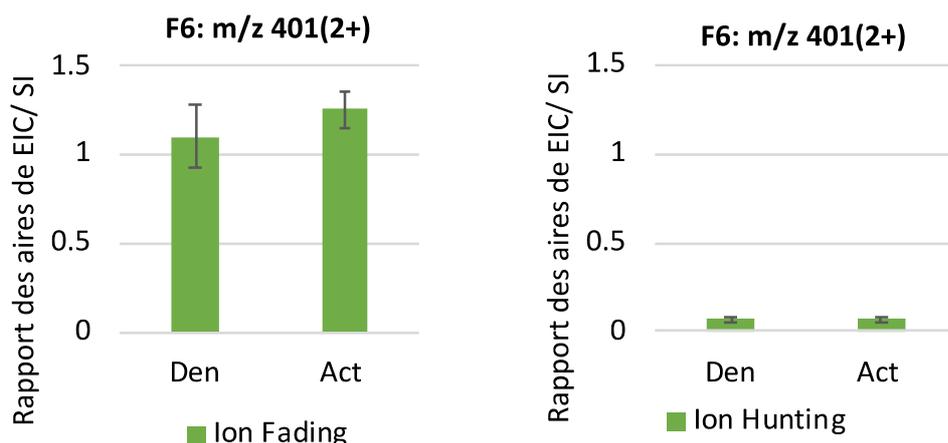


Figure IV.9 : Résultat de l'approche IF-IH d'un composé en absence d'interaction avec l'élastase dans la sous-fraction F6 du venin *V. velutina*. Den : MPs-enzyme dénaturée. Act : MPs-enzyme active

En effet, comme nous pouvons le voir sur la **Figure IV.9**, l'absence d'une extinction d'ion (diminution de l'intensité de l'ion m/z 401.2665, $[M+2H]^{2+}$) sur notre lot **actif** par rapport au lot **dénaturé** lors de l'expérience Ion Fading semble ne présenter **aucune interaction spécifique** (de type inhibiteur ou substrat) ou non spécifique (faux positif) avec l'élastase.

Afin de confirmer cette observation, à l'issue de cette analyse, le surnageant de l'expérience **IF** a été supprimée. Les billes magnétiques (des deux lots) ont été **lavées** afin d'éliminer l'excès de molécules libres avant une **dénaturation** de l'enzyme avec méthanol. L'empreinte spectrale dépourvue d'ions du surnageant méthanolique de cette expérience **IH** a permis de confirmer **l'absence d'interaction non spécifique ou spécifique de la sous-fraction peptidique F6** en particulier de l'ion m/z 401.2665, $[M+2H]^{2+}$.

Ce résultat prouve que notre approche de criblage est capable d'évaluer les sous-fractions présentant une réponse de type **vrai négatif**.

4.2.3.2 Criblage des fractions F11 et F12 : interactions spécifiques lors du criblage

Les **Figure IV.10** montrent les empreintes spectrales obtenues lors des expériences IF et IH avec le lot de billes-élastase dénaturé et actif lors de l'évaluation des fractions **F11** (n=3).

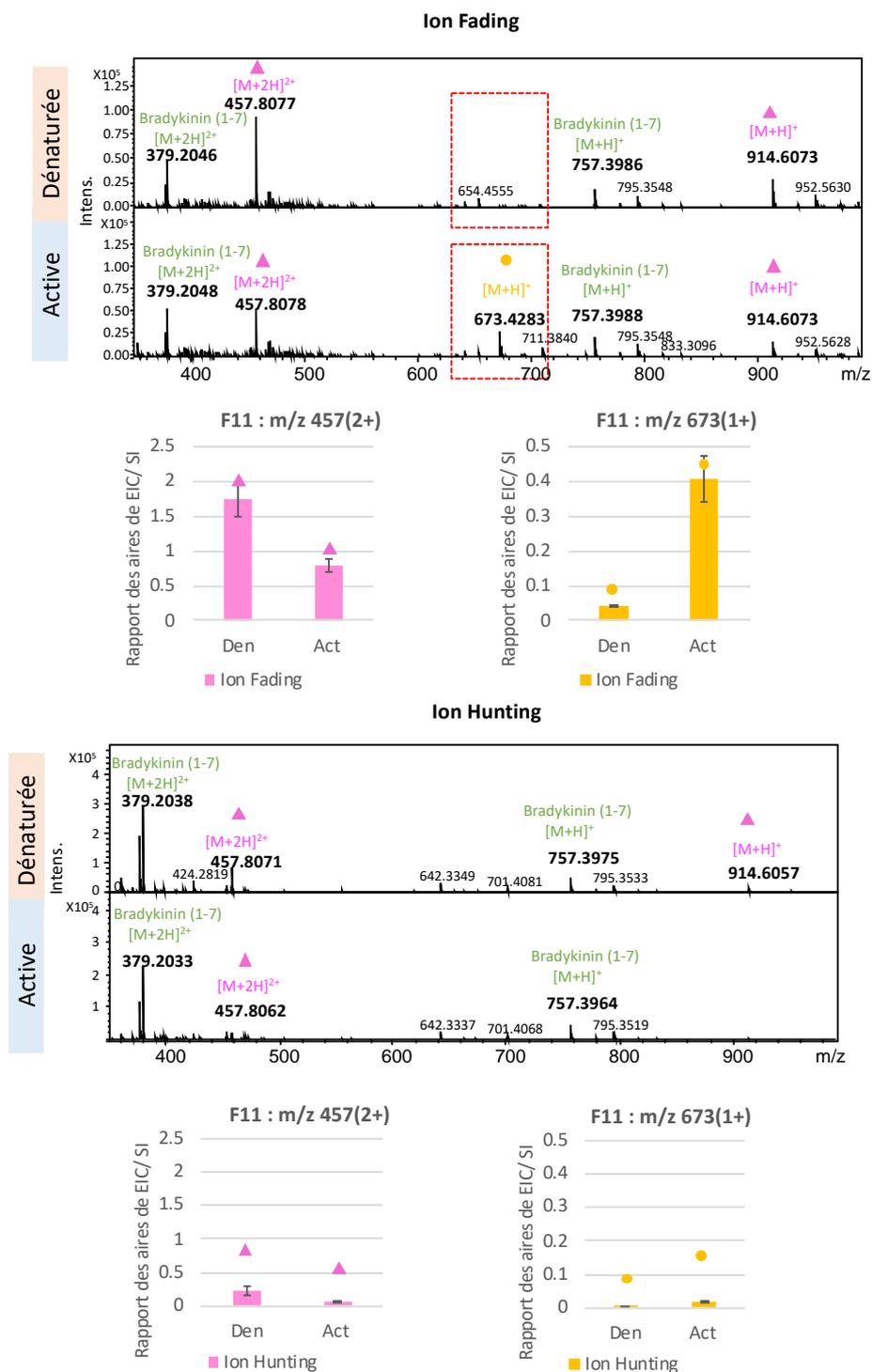


Figure IV.10 : Empreinte de ESI-QTOF-MS de la sous-fraction **F11** dans l'approche IF-IH avec l'enzyme élastase active et dénaturée ($n=3$). Le symbole cercle ● indique le candidat de produit du substrat. Le symbole triangle ▲ indique le candidat de substrat. Les masses en verte sont l'étalon interne (bradykinine fragment de 1-7). **Den** : MPs-enzyme dénaturée. **Act** : MPs-enzyme active. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est fixée à ± 0.01 m/z.

En comparant les empreintes spectrales obtenues avec le lot de billes dénaturées par rapport au lot de billes actives, la présence d'**une extinction (F11 (m/z 457.8078, $[M+2H]^{2+}$) d'ion associé à l'apparition d'un nouvel ion (m/z 673.4283, $[M+H]^+$)** sur l'empreinte spectrale du lot actif versus dénaturé (**IF**) est observée, alors nous pouvons conclure à la présence d'un **potentiel candidat substrat (ion diminué ▲) et son produit (ion apparu ●)** dans notre mélange sous-fraction F11.

Ce résultat est confirmé par **l'expérience IH** de dénaturation méthanolique réalisée sur les deux lots (dénaturé et actif). En effet, l'empreinte spectrale du surnageant méthanolique de cette expérience **IH** confirme **l'absence du produit (● m/z 673.4283, $[M+H]^+$)** lié à la conversion du **substrat (▲ m/z 457.8078, $[M+2H]^{2+}$)** et une faible présence de cet ion substrat.

Néanmoins, malgré un rapport d'aire plus faible pour l'ion substrat (▲ m/z 457.8078, $[M+2H]^{2+}$) après dénaturation du lot actif et dénaturé (expérience IF), **le relargage de celui-ci semble participer également à une interaction non spécifique**. Cette observation ne remet pas en cause le rôle de substrat de cet ion, mais nécessite d'être vérifié afin d'augmenter la robustesse de nos résultats.

À travers ce résultat, **notre approche de criblage prouve** qu'elle est capable de mettre en avant la présence d'une molécule au sein du **venin de frelon asiatique** comme ayant une interaction **de type substrat sur l'élastase**. Par la même occasion, elle prouve l'efficacité de notre approche d'immobilisation de l'élastase ainsi que la préparation des lots actifs et dénaturés pour **la première fois**. De plus ce **vrai positif** n'est pas le seul car la sous-fraction **F12 présente les mêmes conclusions (Figure IV.11)**

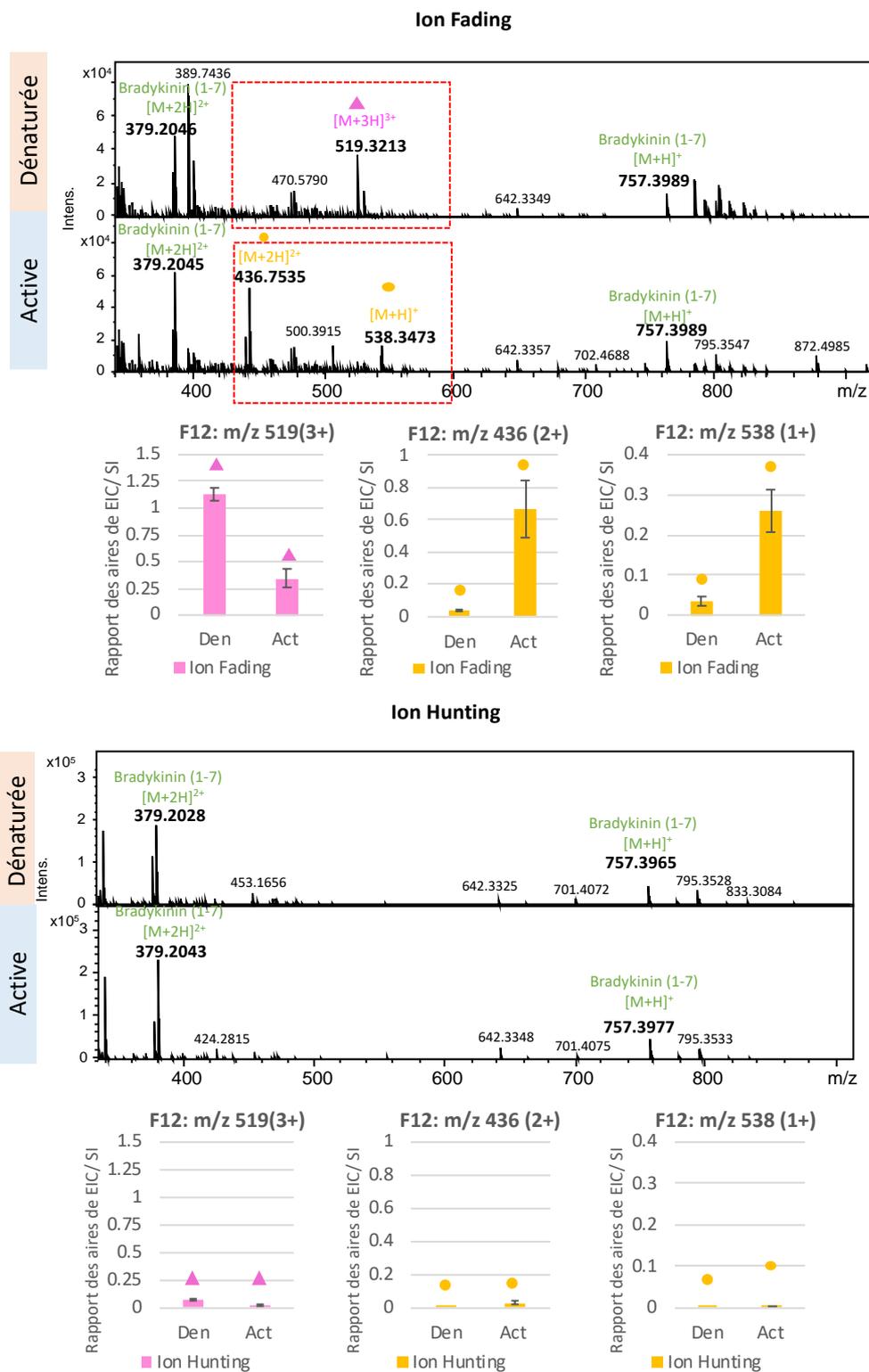


Figure IV.11 : Empreinte de ESI-QTOF-MS de la sous-fraction **F12** dans l'approche IF-IH avec l'enzyme élastase active et dénaturée ($n=3$). Le symbole cercle ● indique le candidat de produit du substrat. Le symbole triangle ▲ indique le candidat de substrat. Les masses en verte sont l'étalon interne (bradykinine fragment de 1-7). **Den** : MPs-enzyme dénaturée. **Act** : MPs-enzyme active. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est fixée à ± 0.01 m/z

Comme pour la sous-fraction F11, nous observons la présence d'une **extinction F12** (m/z 519.3213, $[M+3H]^{3+}$) d'ion associé à l'apparition cette fois de deux nouveaux ions (m/z 436.7535, $[M+2H]^{2+}$ et m/z 538.4283, $[M+H]^+$) sur l'empreinte spectrale du lot actif versus dénaturé (IF). Nous pouvons conclure à la présence d'un second **potentiel candidat substrat (ion diminué ▲)** et ses **produits (ion apparu ●)** dans notre mélange sous-fraction F12.

Ce résultat est confirmé par l'**expérience IH** avec l'**absence de l'ion substrat** (▲ m/z 519.3213, 3+) et ses deux produits (● m/z 436.7535, $[M+2H]^{2+}$ et m/z 538.4283, $[M+H]^+$). Contrairement au potentiel substrat de la sous-fraction **F11**, **aucun relargage spécifique n'a été observé**.

Dans ce contexte, nous pouvons penser que cette approche de criblage a permis de mettre en évidence **deux candidats** issus de venin de frelons et présentant des interactions de **type substrat** avec l'élastase pour les sous-fractions **F11** (m/z 457.8078, $[M+2H]^{2+}$) et **F12** (m/z 519.3229, $[M+3H]^{3+}$). Bien que l'identité de la séquence peptidique de nos substrats ne soit pas connue pour le moment, il semblerait que cette hydrolyse soit liée au mécanisme de l'élastase de pancréas porcine décrit dans la littérature comme étant capable de couper la liaison peptidique du côté de carboxyle des acides aminés hydrophobes tels que l'alanine, glycine, valine, leucine/isleucine... des substrats. [55].

4.2.3.3 Criblage des fractions F13 et F15 : interactions non spécifiques lors du criblage

Lors de l'étude différentielle des empreintes spectrales obtenues lors de l'expérience IF et IH des sous-fractions (**F13 et F15**) avec les lots de billes dénaturés et actifs d'élastase ($n=3$), l'extinction d'un ion sur le lot dénaturé de l'expérience Ion fading associée au **relargage de cet ion dans le lot dénaturé et actif lors de l'expérience Ion Hunting suggère la présence d'interaction non spécifique**. Pour illustrer ce résultat, seule la sous-fraction **F15** a été présentée comme exemple (**Figure IV.12**).

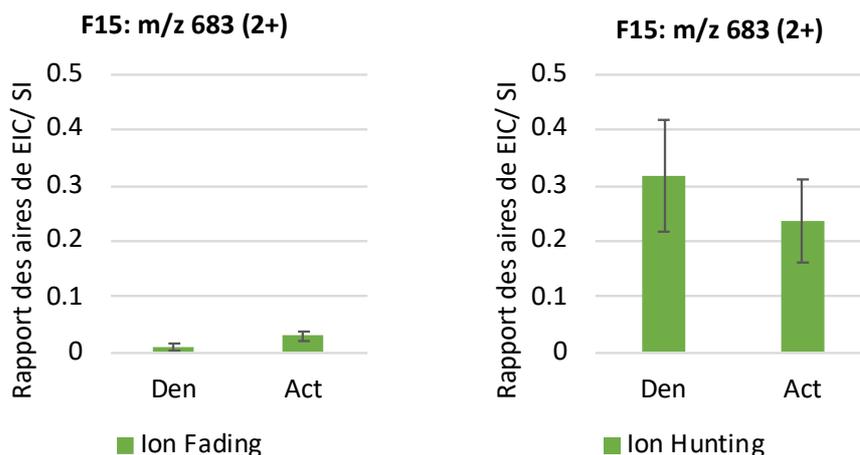


Figure IV.12 : Résultat de l'approche IF-IH d'un composé présentant une interaction non spécifique avec l'élastase dans la sous-fraction F15 du venin *V. velutina*. Den : MPs-enzyme dénaturée. Act : MPs-enzyme active

Bien que ce résultat **montre la limite** de notre approche de criblage avec l'expression de **faux positif** significatif, il **démontre l'intérêt de l'approche différentielle** et le rôle joué par le lot contrôle (enzyme dénaturée). En effet, sans ce dernier et en absence de nouveaux pics détectés sur l'empreinte spectrale du lot actif (expérience IF), nous aurions conclu à tort sur la présence d'une interaction spécifique de type inhibiteur.

Afin de valider nos interactions spécifiques et non spécifiques, nous avons réalisé les expériences IF/IH des sous-fractions sur un **lot des billes de contrôle MPs- APTES-Gla sans enzyme et protégé avec la glycine**.

4.2.4 Evaluation de l'interaction non spécifique des fractions peptidiques de venin sur les supports de MPs-APTES-GLA

Parmi les **6 fractions (F3, 6, 11, 12, 13 et F15) testées** sur notre lot de billes magnétiques MPs-APTES-GLA « encapping » **avec glycine et sans enzyme**, seuls les ions des sous-fractions **F11** (m/z 457.8084, $[M+2H]^{2+}$), **F13** (m/z 514.3508, $[M+2H]^{2+}$) et **F15** (m/z 683.9656, $[M+2H]^{2+}$) présentent à la fois une **faible ionisation** ou disparition des masses d'intérêts lors de **l'analyse du surnageant IF** et le **relargage de ces ions** lors de l'analyse du **surnageant IH** en milieu méthanolique (**Figure IV.13**).

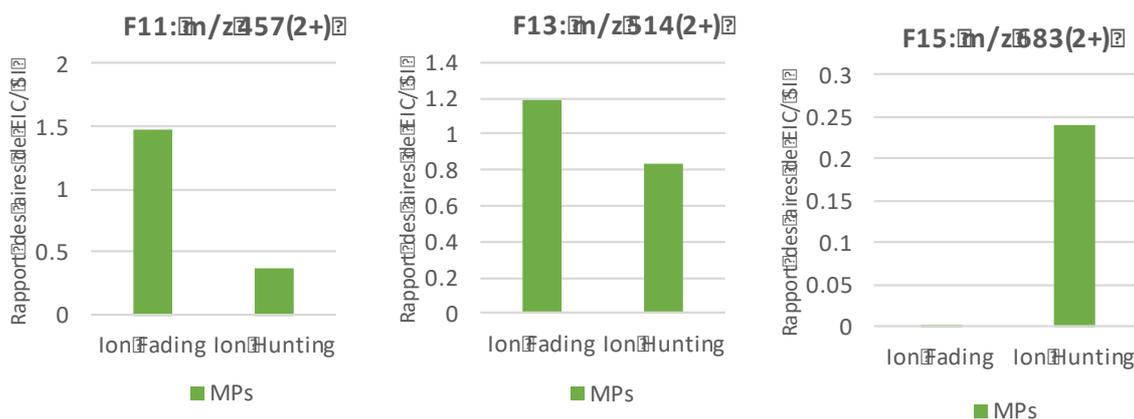


Figure IV.13 : Suivi de l'interaction non spécifique sur la bille magnétique MPs-APTES-GLA encapping avec glycine et sans enzyme par l'approche de IF-IH combinée avec ESI-QTOF-HRMS. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est fixée à ± 0.01 m/z, sauf pour l'ion m/z 514.3508 ± 0.1

Le résultat présenté à la **Figure IV.13** suggère qu'une interaction non spécifique (d'affinité variable) entre ces trois ions avec les supports a été observée lors de l'incubation en IF. À l'issue du lavage des billes magnétiques de l'expérience IF et du mime de l'étape de dénaturation de l'enzyme par le méthanol, nous observons l'émergence, lors de l'analyse du surnageant IH, d'un pic intense des ions observés, surtout l'ion m/z 683.9656, $[M+2H]^{2+}$ qui interagit totalement avec le support MPs.

Une hypothèse serait la présence des groupements d'amines dérivés avec la glutaraldehyde (MPs-APTES-GLA) sur la surface de supports de billes magnétiques qui seraient responsables des interactions non spécifiques avec des composés hydrophobes chargés négativement [54], cas qui serait rencontré pour les sous-fractions **F11**, **13** et **15** de notre venin de frelon.

Malgré cette limitation, la **robustesse et fiabilité de l'approche de criblage IF/IH** basée sur une détection par spectrométrie de masse et l'immobilisation de **l'élastase a été démontrée**. En effet, les interactions de **type substrat** des sous-fractions **F11** et **F12** avec l'élastase comme cible enzymatique de la dermacosmétique, n'avaient pu être mises en avant précédemment avec les tests in-tubo en absence d'un marqueur de fluorescence. Ces résultats restent néanmoins un indicateur et devront être confirmés à travers des tests d'activité (in-tubo ou in-cellulo) afin de valider ces hypothèses. Pour cela, il devra être envisagé l'identification de ces molécules par séquençage *de novo* en vue de la synthèse peptidique et réalisation des tests d'activités.

Partie III : Séquençage *de novo*

5 Mise en place d'une approche de séquençage *de novo* pour une caractérisation préliminaire des peptides de venin de frelon asiatique

Dans le cadre de notre stratégie de sourcing (**partie I**) et de criblage d'interaction ligand/enzyme immobilisée (**partie II**) de ce **chapitre IV**, certains peptides ont été révélés comme discriminants et ayant un rôle de substrat. Afin de confirmer ces résultats, il est nécessaire de connaître la séquence peptidique en vue de la synthèse de ces derniers.

C'est dans ce contexte que nous avons évalué la mise en place d'une approche préliminaire de **séquençage *de novo*** au sein de notre laboratoire. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps appliqué cette **approche sur un digest d'albumine bovine** (8217498, Bruker) **comme modèle**. Bien que ce modèle soit éloigné des peptides potentiellement présents dans un venin (peptides cycliques, modifications post-traductionnelles), il a été ainsi possible d'évaluer les paramètres clés pour une soumission et interprétation de peptides (trypsiques) à l'aide de deux outils à notre disposition, soit PEAKS Studio (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, ON, Canada) et Biotools (Bruker, Allemagne).

Ces logiciels permettent de détecter le lien entre les rapports m/z obtenus lors de la fragmentation des peptides et la nature d'acides aminés. Des « tags de séquence » sont alors proposés avec une graduation de fiabilité ainsi que l'accès à la soumission de la séquence à des banques de données en ligne telle que Swissprot via un moteur de recherche Mascot™. Afin de sélectionner les paramètres appropriés à l'interprétation des spectres des fragmentations des peptides issus du venin de frelon, **les paramètres suivants ont été évalués sur des peptides trypsiques connus de la BSA :**

- ✓ Le choix de la tolérance de masse en ppm pour l'ion précurseur (MS) et les ions fragments (MS/MS).
- ✓ Ainsi que la détermination du seuil de fiabilité de l'algorithme de séquençage *de novo* dans chaque logiciel.

C'est dans ce contexte que la caractérisation des peptides standards par séquençage *de novo* de deux logiciels PEAKS Studio et Biotools en utilisant les peptides commerciaux obtenus par la digestion de trypsine de protéine BSA (8217498, Bruker) a été mise en place comme une preuve de concept.

5.1 Preuve de concept de l'approche séquençage *de novo* sur les peptides de BSA digérée par logiciel PEAKS Studio et Biotools

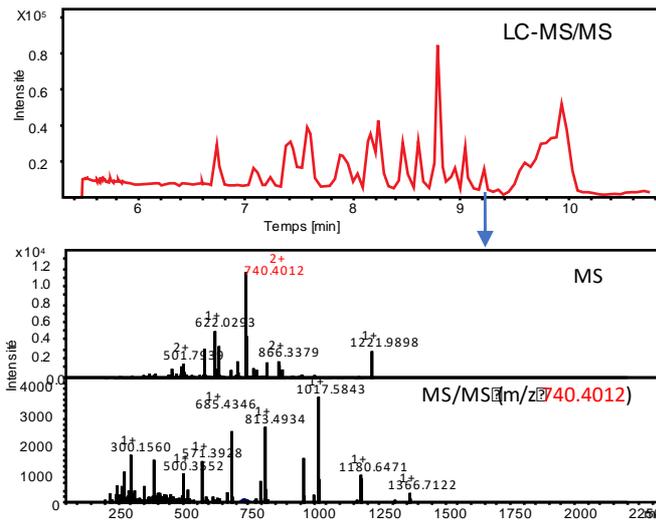
L'analyse des peptides de BSA digéré (10 fmol) ainsi que la fraction peptidique du venin de frelon a été effectuée par nano UHPLC-ESI-QTOF (Dionex Ultimate 3000-maXis II Bruker, Allemande) via une colonne capillaire de Acclaim Pepmap RSLC 75umx250 mm et un débit de 575 nL/min. Les spectres MS/MS (gamme de 50-2200 m/z) ont été obtenus en mode positive et autoMS/MS (par CID) dans lequel les ions précurseurs sont sélectionnés en se basant sur des critères établis tels que : l'état de charge, le nombre maximal des ions précurseurs lors de chaque cycle, le seuil d'intensité, la sélection parmi les ions plus abondants... [56]. La méthode d'analyse a été calibrée avec la solution « ESI tuning mix low concentration » (Agilent) en calibration externe et deux « lock-masses » (à m/z 622.0293 et à m/z 1221.9898) sont ajoutées continuellement.

Remarque : Il est à noter que pour l'analyse des produits obtenus lors de la conversion des peptides (substrats) de l'élastase, celui-ci a été réalisé sur le surnageant par une infusion directe FIA-MS/MS dans laquelle les ions d'intérêt ont été isolés par la mode de Multiple Reaction Monitoring (MRM). Les ions précurseurs seront alors isolés manuellement avec une fenêtre d'isolement avec une valeur d'énergie de collision demandée. (20 - 30 eV)

Les spectres MS/MS ont été importés dans le logiciel Biotools 3.2 avec l'algorithme « *Rapid De novo sequencing* » et dans le logiciel PEAKS Studio avec l'algorithme « *De novo sequencing* ». Cependant, pour le logiciel PEAKS Studio, les fichiers contenant les spectres MS/MS doivent être convertis en fichiers .mzXML par le logiciel de Compassxport 4.4 (Bruker) pour être importés. Le mode de fragmentation est également à préciser sur les logiciels. Pour le logiciel PEAKS Studio X nous avons été en mesure de sélectionner l'option QTOF/CID et à Low CID pour le logiciel Biotools 3.2.

Le protocole d'interprétation des spectres MS/MS et de caractérisation des peptides impliqués dans cette thèse est présenté dans le schéma de **Figure IV.14** à l'aide d'une illustration d'un des peptides de la BSA à m/z 740.4012 $[M+2H]^{2+}$.

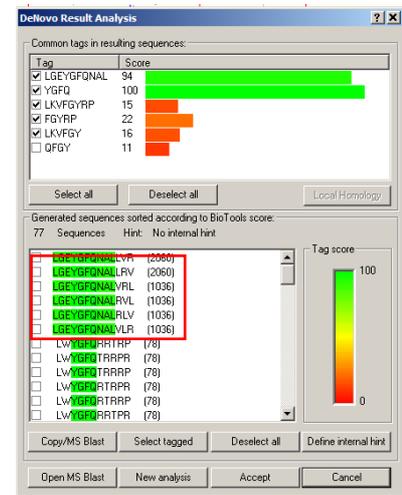
LC ou FIA avec Automs/ms ou MS/MS manuel



"De novo sequencing" par logiciel de PEAKSstudio ou Biotools

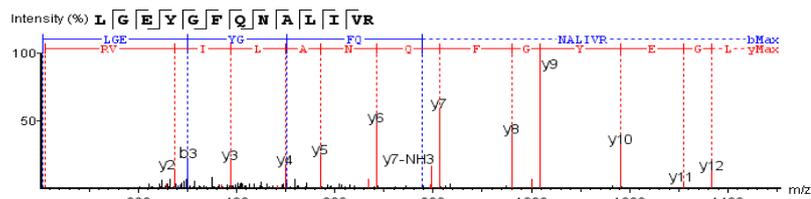
Summary	Peptide	z	m/z ↑	RT	ALC (%)
De novo	106 SLHTLFGDELCK	2	710.3518	8.62	64
	107 LYAATLLSSPPPP	2	720.4119	8.05	8
	108 LYGCDNQTLSSK	2	722.3255	7.13	65
	109 CASVADESHAGGCKE	2	732.3004	5.95	52
Feature	110 GSCGGCEK	1	740.2679	7.25	15
	111 LGEYGFQNALIVR	2	740.4025	8.96	83
	112 HHEGDLEEQYMP	2	742.8062	8.77	30
	113 PELLYAFYYAKN	2	746.3812	9.01	34
LC/MS	114 TYANAFNNDQMQRFGENNN	3	749.9879	7.80	4
	115 EYEATLESSDGTGNS	2	751.8129	7.54	50
	116 EEDEQIC	1	752.2429	7.54	32

PEAKSstudio (BSI)



Biotools (Bruker)

Séquence de peptide



Moteur de recherche (Mascot: Swissprot)

#	b	b-H2O	b-NH3	b (2+)	Seq	y	y-H2O	y-NH3	y (2+)	#
1	114.09	96.08	97.06	57.55	L					13
2	171.11	153.10	154.09	86.06	G	1366.71	1348.70	1349.68	683.86	12
3	300.16	282.14	283.13	150.58	E	1309.69	1291.68	1292.66	655.34	11
4	463.22	445.21	446.19	232.11	Y	1180.65	1162.64	1163.62	590.82	10
5	520.24	502.22	503.21	260.62	G	1017.59	999.57	1000.56	509.29	9
6	667.31	649.30	650.28	334.15	F	960.56	942.55	943.54	480.78	8
7	795.37	777.36	778.34	398.18	Q	813.49	795.48	796.47	407.25	7
8	909.41	891.40	892.38	455.21	N	685.44	667.42	668.41	343.22	6
9	980.45	962.44	963.42	490.72	A	571.39	553.38	554.37	286.20	5
10	1093.53	1075.52	1076.50	547.27	L	500.36	482.34	483.33	250.68	4
11	1206.62	1188.61	1189.59	603.81	L	387.27	369.26	370.24	194.14	3
12	1305.68	1287.67	1288.66	653.34	V	274.19	256.18	257.16	137.59	2
13					R	175.12	157.11	158.09	88.06	1

```

1 MKVTFISLL LFFSSAYSRG VFRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCF DEHVLVNL
71 TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLEGDLECK VASLRETYGD MADCCCKQEP ERNECFLSHR DSDPDLK
141 PDNLTCLDFE KADERKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPELLEY ANKYNVGFQE CCQAEKDGAC LLKIKETMRE
211 KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFKAE FVEVTKLTVTD LTKVHKRCCD GDLLCEADDR
281 ADLAKYICDN QDTISSKLEK CDDPILLEKS HCIAEVEKDA IPENLPLTA DPAEDKDKVC NYGEAKDAFL
351 GSELYEYSRR HPEYAVSVLL R LAFEYEATL EECCKADDPH ACYSTVFDKL RHLVDEPQNL IKQCNDQFKE
421 LGEYGFQNAL IVRYTRKVEQ VSETTLVEVS ESLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRIQVLHEKT
491 PVSEKVTCKC TESLVNRPC FSALTPDETY VRAFDKLF THADICTLP DTEKQIKRQT ALVELLKHDP
561 KATEEQLKTV MENEVAFVDK CCAADDREAC FAVEGPKLVV STQTALA
    
```

Figure IV.14 : Stratégie de séquençage de novo des peptides impliqués dans la thèse

L'interprétation des spectres MS/MS va permettre d'obtenir les acides aminés qui constituent la séquence primaire du peptide. Cependant, bien que nous ayons accès à la haute résolution et exactitude (QTOF) permettant de limiter les erreurs d'interprétation, la séquence du peptide est rarement complète. En effet, la qualité du spectre de fragmentation en particulier le rapport signal sur bruit est un point clé qui permet d'expliquer la perte d'information (fragments trop faibles, voire non détectés). Ainsi les logiciels tels que Peak studio et Biotoools proposent des « tags » de séquence et non la séquence complète.

Lors de l'interprétation des spectres de MS/MS par les logiciels PEAKS et Biotoools, il a été nécessaire d'évaluer la tolérance de masse pour les ions parents ainsi que les fragments. Pour ce faire, la valeur d'incertitude a été déterminée en se basant sur la résolution et exactitude de l'instrument. Cette évaluation a permis de sélectionner la valeur 2 ppm et 5 ppm pour les logiciels PEAKS et Biotoools respectivement. L'incertitude des ions MS/MS quant à elle est impliquée à 0.02 Da pour les deux logiciels.

À titre d'exemples, dans la **Figure IV.14**, la séquence de peptide m/z à 740.4012 $[M+2H]^{2+}$ a été trouvée avec $ALC\% = 83\%$. Le spectre MS/MS possède majoritairement des ions abondants de **type y** ainsi que la présence de perte d'eau (-18 Da) ou d'ammoniac (-17 Da) qui apparaissent fréquemment pour les **ions y**. À la fin de la séquence du côté N-terminale, la non-détection de l'ion fragment (y_1) **ne permet pas de trouver la séquence entière**. Dans ce cas, le **calcul se base** sur la **précision de masses** qui permet de **déduire les acides aminés de « muets »**. Cependant, il est à noter que cette méthode ne permet pas de trouver l'ordre exact des acides aminés de composition dans la partie manquante de la séquence.

En effet, dans ce cas, nous ne pouvons pas déterminer l'enchaînement de l'ion **y2 à RV ou VR**. En plus, il est utile de préciser que la distinction entre Leucine (L) et Isoleucine (I) n'est pas prise en compte dans cette analyse de CID de basse énergie [57].

Remarque : Alors, nous considérons tous les acides aminés (isoleucine et leucine) dans notre étude comme la Leucine (L).

Enfin, les **tags de séquences peptidiques** trouvées à partir de ces logiciels vont être **comparés aux séquences protéiques** présentes dans des banques de données telles que **Swissprot** via un moteur de recherche (MASCOT™). L'objectif de cette étape est double : évaluer l'appartenance de ces séquences dans notre taxonomie d'intérêt ou une voisine.

Remarque : Les résultats devront être validés sur la base du score, de la longueur de la séquence et la longueur de la correspondance.

Afin d'évaluer les spectres MS/MS pouvant être interprétés par *de novo*, nous avons dans un premier temps réalisé **la soumission des peptides de la BSA** sur notre moteur de recherche **MASCOT™** via le logiciel Proteinscape (Bruker, Allemagne). Les spectres MS/MS expérimentaux sont comparés aux masses des peptides et des fragments théoriques grâce à un algorithme de recherche. Plus le peptide ou la protéine est identifié avec un grand nombre d'acides aminés ou de fragments, plus l'identification est robuste.

Dans notre cas, cette étape a permis d'établir une liste **de 47 peptides ayant été identifiés** comme appartenant à la **BSA** avec un score significatif. C'est à partir de cette liste que nous avons été **en mesure d'évaluer notre approche *de novo* et l'apport des logiciels PEAKS et Biotools (Tableau IV-6)** afin de trouver **nos seuils de fiabilité** pour le séquençage des **peptides inconnus du venin de frelon**.

Tableau IV-6 : Séquençage de novo de BSA digéré par logiciel de PEAKS et Biotoools. Dans la séquence de peptide, la lettre en couleur: **Noir et gras** - bonne séquence, **Orange** - bonne identification sans bon ordre, **Gris** - fausse identification. ALC : average local confidence. - : non-détection.

Proteinscape (comparaison de MS/MS spectrum)				Peaks studio		Biotoools	
N°	Masse	m/z	Séquence théorique	Séquence	ALC%	Séquence	Position dans la liste
1	1248.6139	417.2121	FKDLGEEHFK	FKDLGEEHFK	87	FKDYYGLSRT	1
2	926.4862	464.251	YLYEIR	YLYELAR	83	YLYELAR	3
3	1478.7882	740.4012	LGEYGFQNALIVR	LGEYGFQNALIVR	83	LGEYGFQNALIVR	1
4	788.4644	395.2399	LVTDLTK	LVTDLTK	81	LVTDLTK	1
5	1438.8045	480.6095	RHPEYAVSVLLR	RHPEYAVSVLLR	79	RHPEYAVSVLRL	1
6	688.3657	345.1904	AWSVAR	AWSVAR	77	AWSVAR	1
7	1162.6234	582.32	LVNELTEFAK	LVNELTEFAK	76	LENFTELVAK	2
8	648.3265	325.1704	IETMR	LETMR	74	LETMR	1
9	1531.7738	511.5989	LKECCDKP LLEK	LKECGCGDKP LLEK	73	LKECGCGDKP LLEK	3
10	1304.7089	435.9107	HLVDEPQNLIK	HLVDEPQNLLK	72	HLVDEPQNLLK	2
11	885.408	443.7125	DDSPDLPK	DDSPDLPK	71	DDPSDLPK	2
12	921.4807	461.7479	AEFVEVTK	AEFVEVTK	66	VFEAEVTK	1
13	1638.9305	820.4724	KVPQVSTPTLVEVSR	KVPQVSTPTLVEVSR	66	KVPQVSTPTLVEVSR	3
14	1141.7071	381.5758	KQTALVELLK	KQTALVELLK	65	NKVSLVALSVL	1
15	1442.6348	722.325	YICDNQDTISSK	YLCGDNQDTLSSK	65	YLGCDNQDTLSSK	5
16	973.4505	487.7336	DLGEEHFK	DLGEEHFK	64	LDGEEHFK	1
17	1418.6864	710.351	SLHTLFGDELCK	SLHTLFGDELCK	64	LHSTLFDGELGCK	1
18	664.3697	333.1926	KFWGK	KFWGK	62	KFWGK	1
19	897.4742	449.7446	LCVLHEK	LGCVLHEK	61	LGCVHEKL	2
20	711.3664	356.6909	SEIAHR	SELAHR	58	SELAHR	1
21	757.4156	379.7154	GACLLPK	GACGLLPK	54	GACGLLPK	3
22	817.4181	409.7173	ATEEQLK	ATEEQLK	53	ATEEQLK	1

23	1106.5066	554.261	EACFAVEGPK	EQFAVEGPK	52	GTLGEVAFPCN	1
24	1398.6853	467.2372	TVMENFVAFVDK	EMNVTFVAFVDK	50	EMVTNFVAFVFAASL	1
25	2044.0207	682.348	RHPYFYAPPELLYYANK	EPLDVFYAPPELLYYANK	50	PYVPPFYAPPELLYSFLE	1
26	1501.6065	751.8102	EYEATLECCAK	EYEATLESSDTGNS	50	EYEATLESSAYCH	1
28	1033.4651	517.7406	NECFLSHK	QDCGFLSHK	49	NEGCFLSHK	2
27	1879.9138	627.6457	RPCFSALTPDETYVPK	PDETYLLTSGGLASSCVPK	49	DEPTYLLGSTLLPSNNF	1
29	1723.8273	862.9213	MPCTEDYLSLILNR	MPGCTEDYLLSLLRN	48	PCGMTEYLLSLLRN	2
30	1748.6553	583.893	ECCHGDLLCADDR	ENCCHGDLLCEGADDR	47	ENCCHGVELEGADDR	1
31	1462.5817	488.5348	TCVADESHAGCEK	TCGVADESHASCANV	44	CRTDYADMFBVGGE	1
32	1553.6457	518.8895	DDPHACYSTVFDK	DDPHACGYSTVFKD	44	SFACGYDDSTVFSR	1
33	1906.9135	636.6453	LFTFHADICTLPDTEK	LFCGKPADLMFEGGKGTET	41	HFTFLADLMDALFHVM	1
34	1575.7603	526.2612	LKPDPNTLCDEFK	LKPDNPTLCGDEFK	39	PNTRVPTLGCNPNGH	1
35	846.4963	424.2562	LSQKFPK	LKNTFPK	38	LGTGKFPK	1
36	1900.8625	634.6279	NECFLSHKDDSPDLPK	GWCGFLSHKDDREKH	35	GSYLAKTWLCCVRLDAC	1
37	1566.7355	784.376	DAFLGSFLYEYSR	AFDLGSFQPAESGKN	35	LFGSWFLYYSVE	1
38	1282.7034	642.3586	HPEYAVSVLLR	HPFLRLRCNK	23	HPELRGGPKHR	1
45	1746.6978	583.2407	YNGVFQECQAEDK	NYGVCLTSGCCQAEDK	13	TMGTAAACNGCEKYKGV	1
39	1290.5948	431.2063	ECCDKPLEK	EKLCMSNEPQL	11	-	-
40	1887.9196	630.3151	HPYFYAPPELLYYANK	PNSFLNVCDKLYYAGGK	11	FLAYYAARFAGYYAEL	1
41	1414.6803	708.3467	TVMENFVAFVDK	EWKTYEFAGSVV	11	GFRAFEAFRW	1
42	2457.1734	820.0659	DAIPENLPLTADFAEDKDVCK	EPNLPTEETLLMQPDKDV GKC	11	EPGGLPLPWWRGMNGGMA PLNHA	1
43	2018.9619	673.994	LKPDPNTLCDEFKADEK	ASVVPDAAGDGGGSFAAA RSEK	2	PNTGPMWGGGWGGGLRYT R	1
44	1071.5019	536.7581	SHCIAEVEK	-	-	SHGCLAEVGS	1
46	1477.516	739.766	ETYGDMADCCEK	-	-	TEMGEMMMSGYPD	1
47	2491.257	831.4261	GLVLIAFSQYLQCPFDEHVK	-	-	LLGVGGCDRGCQQPLKRGKFS SW	1

Remarque : Du fait que nous n'avons pas recherché de modifications post-traductionnelles, la modification de carbamidométhylation sur l'acide aminé cystéine (+57.02146 Da) n'a pas été prise en compte lors de l'interprétation de séquençage de novo. Dans ce contexte, le décalage de masses causé par cette modification a été considéré comme étant un résidu de Glycine (g) dont la masse est égale à celle de la carbamidométhylation. C'est pourquoi, nous retrouvons dans les séquences proposées avec la cystéine (C), la présence de Glycine (G) mis en gris dans le tableau ci-dessus.

✓ Interprétation Peaks

Parmi les **47 peptides identifiés** par Proteinscape, seuls **22** peptides ont été séquencés correctement (bons acides aminés et bon enchaînement) par PEAKS (dans le cadre rouge) avec une valeur de ALC% supérieur ou égale de **53%**. Cette valeur de ALC% (confiance locale moyenne) est définie par la totalité des scores de confiance locale des résidus divisant par la longueur de peptide et elle est proportionnelle avec la fiabilité de la séquence proposée. En revanche, les **25** peptides possédant une ALC% inférieure de 53% n'ont pas été séquencé correctement et présente une trop faible identification d'acides aminés ou d'ordre correct de l'enchaînement de ces derniers dans les « tags » de séquence telle que les **4** peptides de numéros 24, 29, 32, 39. À l'issue-de ce résultat, nous avons constaté que les peptides ayant des séquences incorrectes étaient liés essentiellement à des spectres de mauvaise qualité avec des bouts d'acides aminés manquant dans les séquences et/ou de tailles de séquences longues ($m/z > 1700$).

✓ Interprétation Biotools

Concernant les résultats d'interprétation obtenue par Biotools, seuls **15** peptides parmi les **22** précédemment séquencés correctement par PEAKS ont été trouvés, **5** séquences dans un mauvais ordre et **2** erronés. En général, la prise en compte de trois premières suggestions dans la liste du résultat *de novo sequencing* de Biotools donne les bonnes séquences.-Cependant, ce critère n'est pas autant discriminant que le critère ALC% proposé par Peaks studio. En effet, la majorité de premières suggestions pour les peptides avec un ALC% <53 % sont erronées. Bien que-le logiciel PEAKS semble proposer des Tags plus fiables que Biotools, nous avons choisi de convoier les interprétations des deux logiciels afin d'augmenter la robustesse de nos résultats.

Ainsi, à travers cette étude d'évaluation de l'approche de séquençage *de novo*, nous avons été en mesure de définir, sur notre modèle de BSA digérée, les critères d'interprétations des spectres de MS/MS ainsi que les seuils d'acceptation (de confiance) de la séquence proposée avec un degré de fiabilité significatif par chaque logiciel.

Ces critères sont résumés ci-dessous dans le **Tableau IV-7** et seront appliqués à l'interprétation et identification des séquences peptidiques du venin de frelon asiatique (en particulier la fraction < 10 kDa).

Tableau IV-7 : Critères appliqués sur l'interprétation et identification des séquences peptidiques du venin de frelon asiatique

Paramètres d'interprétation des spectres MS/MS			Seuils de confiance de la séquence proposée (Tag)		
	PEAKS	Biotoools		PEAKS	Biotoools
Tolérance en masse de l'ion précurseur	5 ppm	2 ppm	critères de fiabilité	ALC ≥ 53%	3 premières position
Tolérance en masse des ions fragments	0.02 Da		rapport m/z	≤ 1700	

5.2 Séquençage de novo sur les peptides du venin de *V. velutina*

C'est dans ce contexte que nous avons réalisé l'interprétation des spectres MS/MS obtenus dans les mêmes conditions (**partie I chapitre IV**) pour la fraction peptidique < 10 kDa de venin de frelon. Bien qu'il s'agisse que d'une étude préliminaire, nous espérons obtenir une première information sur les séquences peptidiques potentiellement linéaires et ayant fournis des spectres MS/MS de qualité. L'objectif étant d'identifier le plus grand nombre de peptides ayant été décrits comme potentiellement discriminants dans **la partie I** ou jouant un rôle de substrat de l'enzyme élastase dans **la partie II de ce chapitre IV**.

Remarque : Il est à noter que certaines des masses discriminantes (partie I) présentant en faible intensité dans le venin ont produit des spectres trop peu intenses pour être exploitées. Par ailleurs, la présence des ponts disulfures formant des liaisons intra- et/ou inter- au niveau de la structure des peptides (tels que les conotoxines, peptides naturels des venins animaux) pourrait rendre la fragmentation en spectrométrie de masse plus difficile conduisant à une perte d'information.

Contrairement à l'étude réalisée sur la BSA, nous avons choisi d'appliquer certaines modifications post-traductionnelles couramment rencontrées dans les peptides de venin telles que l'oxydation (Méthionine) et l'amidation du C-terminal [58].

5.2.1 Résultat du séquençage de novo du venin de frelon asiatique

L'analyse de séquençage de novo a mené à caractériser, pour la première fois, les structures primaires de **16 peptides** à partir du venin de frelon *V. velutina* (**Tableau IV-8**).

Le **Tableau IV-8** montre les séquences des ions d'intérêt (classés par ordre croissant des temps de rétention) proposés par logiciels PEAKS et Biotoools afin d'augmenter la robustesse de la proposition. La fiabilité de la séquence a quant à elle été évaluée lors de la soumission aux banques de données Swissprot via MascotTM afin de corrélérer les séquences « Tags » avec les peptides/protéines de taxonomie homologue.

Tableau IV-8 : Séquençage des peptides discriminants et potentiels pour ligands enzymatiques dans le venin *V. velutina* par logiciel de **PEAKS** et **Biotoools**. **La masse grasse** : ligand des enzymes immobilisées. **Cellules grises** : peptides ne sont pas dans la liste de composés discriminants. **ALC%** : average local confidence. Dans la séquence de peptide, la lettre en couleur : **Noir et gras** - bonne séquence et **Gris** - acide aminé absents. Le score de confiance individuelle calculée par **PEAKS** et **Biotoools** pour chaque acide aminé définit les acides aminés en couleur : **Rouge** - niveau de fiabilité supérieur de 80%, **Bleu** - niveau de fiabilité entre 50-80%. **Noir** - niveau de fiabilité inférieur de 50% . - : non-détection.

N°	[M+nH] ^{nt} m/z	Masse moléculaire	RT (s)	PEAKS Studio		Biotools		Référence	
				Séquence	ALC%	Séquence	Nom	Séquence	
1	388.7103	775.4048	206	LGAKWAM	58	LGKAAWM, LGAKAWM VAKAAWM	POC1M4/P01515	INWKGIAAMAKKLL (?)	
2	471.3269	470.319	212	LGGLL	83	-	POC1M1/P17234	FLPIIAKLLGGLL	
3	401.5615	1201.658	231	LNWKGLAAMAK	94	-	POC1M4/P01515	INWKGIAAMAKKLL	
4	401.2645	800.5142	231	FLPLLAK	88	FLPLLAK, FLPLLKA, LFPLLAK	POC1M1/P17234	FLPIIAKLLGGLL	
5	449.2492	1344.7228	246	PVNLGM(+15.99)SPFAVAK(-.98)	59	-			
6	510.2713	1018.54102	248	LNWKGLAAM(+15.99)	92	LGGVAWKAAM, LGGWKGLAAM, WKGLNLAAM	POC1M4/P01515	INWKGIAAM(+15.99)AKKLL	
7	502.2714	1002.5267	248	LNWKALAM	83	LQAKDNLTT, LGAKWNALM, LGAAKWNLM	POC1M4/P01515	INWKGIAAMAKKLL	
8	384.2726	766.5294	252	LPLLAKL	88	LPLLAKL, LLPLAKL, PLLLAKL	POC1M1/P17234	FLPIIAKLLGGLL	
9	462.6129	1384.8151	284	KLPPGF ^B TLLPFR	69	FPGPLK ^B TPLFRL, FPGPLK ^B TPLRFL, FPGPLK ^B TLPFRL	Vespakinin-C	KLPPGF ^B TPFR ^I (?)	
10	457.8068	913.5955	298	FLPLLAKL	92	FLPLLAKL, FLLPLAKL, LFPLLAKL	POC1M1/P17234	FLPIIAKLLGGLL	
11	654.4508	653.4451	298	LPLAKL	66	PLLALK, PLLAKL, LPLLKA	POC1M1/P17234	FLPIIAKLLGGLL	
12	514.3498	1026.6838	351	FLPLLAKLL	94	FLPLLAKLL, LFPLLAKLL, PLFLLAKLL	POC1M1/P17234	FLPIIAKLLGGLL	
13	519.3228	1554.9447	312	LNWKAVAAMAKKLL(-.98)	95	-	POC1M4/P01515	INWKGIAAMAKKLL(-.98)	
14	683.9633	1365.9108	426	FLPLLAKLLGGLL(-.98)	83	FLPLLALKLGGLL, LFPLLALKLGGLL, FLLPLALLKGGLL	POC1M1/P17234	FLPIIAKLLGGLL(-.98)	
15	673.4284	672.4205	produit			FLPLLA, FLPLAL, LPLFLA	POC1M1/P17234	FLPIIAKLLGGLL	
16	436.7538	871.4918	produit	LNWKGALA	70	-	POC1M4/P01515	INWKGIAAMAKKLL	

POC1M4/P01515	Mastoparan-X/Mastoparan-like peptide 12a
---------------	--

P17234/POC1M1	Vespid chemotactic peptide X ou 5e
---------------	------------------------------------

Dans le cadre de cette étude, les **16 peptides séquencés par Peaks et Biotools** présentent une corrélation satisfaisante entre les deux logiciels augmentant ainsi la robustesse de la séquence proposée par Peaks. De plus, pour la plupart des peptides, les valeurs ALC sont comprises entre **58 <ALC % <95**, soit au-dessus du critère (>53%) défini lors de l'étude la BSA.

Afin d'augmenter la fiabilité de ces séquences, ces dernières ont été soumises sur Swissprot et ont permis d'identifier majoritairement **deux peptides et leurs fragments**, soit le peptide **Mastoparan X (14 acides aminés)** et le peptide **Vespid chemotatic X/5^e (13 acides aminés)**. De par la description de ces deux familles de peptides trouvés dans le venin de guêpe [59], espèce proche de celle de notre étude, **ce résultat conforte notre approche de séquençage de novo** et nous permet dans un second temps de procéder à la validation des identifications des fragments et séquences proposés. Bien que la fraction peptidique soit majoritairement composée de ces deux peptides et leurs fragments, l'analyse de séquençage a permis de mettre en avant deux séquences n'ayant pas été trouvées ou bien avec un score peu significatif dans les banques de donnée Swissprot. Il s'agit de l'ion **N° 5 de m/z 449.2492 [M+3H]³⁺ sans correspondance** et de l'ion **N°9 de m/z 462.6129 [M+3H]³⁺** pouvant être proche du peptide **Vespakinin-C**.

5.2.2 Observation du patrimoine peptidique du venin de frelon

Contrairement à ce que nous pensions, nous n'avons pas observé un cocktail complexe de peptide de nature différente, mais la présence de plusieurs fragments de deux peptides Mastoparan X et Vespid chemotatic X trouvés également dans notre venin de frelon.

Bien que le mécanisme de génération des fragments de ces deux peptides reste inconnu. Nous avons essayé de comprendre leurs origines. Deux hypothèses peuvent être émises, à savoir **une dégradation de la fraction peptidique** ou bien le **clivage interne des peptides** dans le venin par **des enzymes peptidases** [2].

De par les conditions de préparation d'échantillon (une extraction du venin dans la glace suivie d'un stockage après lyophilisation), l'hypothèse de la dégradation de la fraction peptidique semble ne pas être à l'origine de ces fragments. **L'hypothèse de la protéolyse** sur les peptides Mastoparan X et Vespid chemotatic peptide X, **reste la plus probable**. En effet, ce phénomène a été déjà décrit dans plusieurs études précédentes, par exemple le venin de scorpion *Tityus serrulatus* [60] ou de fourmi *Neoponera villosa* [2]. Il semblerait que les clivages enzymatiques se produisent aux différentes positions d'un peptide afin d'enrichir la diversité de patrimoine peptidique, en formant des fragments distingués qui sont actifs sur différentes cibles et modes d'action [61]. Il a également

été décrit que la variation de composition de venin dans une espèce pouvait être liée fortement avec le comportement de fragmentation de ces peptides [2]. Ces hypothèses restent à être étudiées et vérifiées dans le futur afin de mieux comprendre la composition de la fraction peptidique.

À travers cette première étude, nous avons été en mesure d'obtenir **des propositions de séquences pour les peptides intenses de notre venin de frelon asiatique**. Cette dernière reste néanmoins préliminaire et nécessite d'être confirmée par différentes techniques de spectrométrie de masse associée à des méthodes de préparation d'échantillon telle que la dégradation de Edman complémentaire [62] et permettant d'obtenir des informations structurales plus complètes.

Il est également envisagé de synthétiser certains peptides d'intérêts à notre étude (partie I et II de ce chapitre) afin de confirmer l'identité et l'activité de ces peptides. En effet, **la comparaison entre les deux séquences** proposées **par les logiciels** et celle proposée par la **banque de données** Swissprot montrent **certaines inversions ou absences d'acides aminés** dans l'agencement des séquences.

5.2.3 Approche de vérification des séquences peptidiques du venin de frelon

C'est dans ce contexte que nous avons exploité nos données MS/MS en réalisant une **vérification manuelle de la labélisation** des rapports m/z afin de **confirmer les séquences** des peptides d'intérêts. C'est pourquoi, dans la section suivante, nous détaillons l'interprétation de certains spectres représentatifs des peptides d'intérêts (N° 14 Vespide chemotatic X/5^e, N°13 Mastoparan X, N° 15 et 16 nommés « produit » ainsi que les deux peptides sans identification N° 5, N°9) dans le **Tableau IV-8** pour valider leurs séquences trouvées.

5.2.3.1 Séquençage de novo de l'ion N° 14 m/z 683.9633 $[M+2H]^{2+}$ - « Vespide chemotatic X/5^e (13 aa) »

L'ion m/z 683.9633 $[M+2H]^{2+}$ a été fragmenté à l'énergie de collision de 30 eV et séquencé par PEAKS dont leur profil est présent dans la **Figure IV.15**. Les lignes et lettres rouges indiquent les ions de type y ou leur perte d'eau ($y-H_2O$) ou leur perte d'ammoniac ($y-NH_3$). Les lignes et lettres bleues montrent des ions de types b et leurs ions satellites ($b-H_2O$, $b-NH_3$). Les spectres obtenus à partir de l'approche ESI-QTOF en mode CID offrent usuellement une présence plus abondante d'ions de type y.

Le spectre avec m/z 683.9633 $[M+2H]^{2+}$ indique la présence de nombreux fragments y avec l'intensité relativement intense et ses satellites en perte d'ammoniac ($y-NH_3$), de plus, certains

fragments b sont également présents. À l'extrémité C-terminale, il semble y avoir une modification d'amidation qui apporte une différence de masse de 0.98 Da à l'ion m/z 131.11 qui caractérise l'acide aminé leucine (L) ou isoleucine (I).

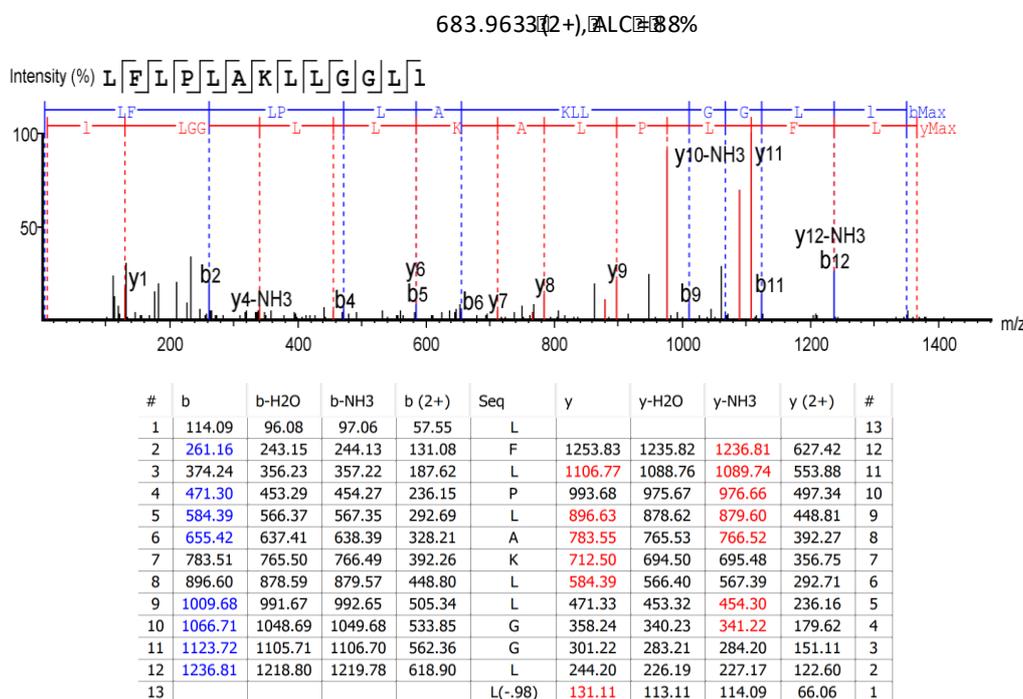


Figure IV.15 : Séquence obtenue de l'ion m/z 683.9633 $[M+2H]2+$ par l'analyse de séquençage de novo du logiciel PEAKS

Ce spectre est très informatif et permet de déduire la majorité de l'enchaînement de spectres avec des séries consécutives des ions fragmentés y ou b. La plupart des ions abondants dans ce spectre sont pris en considération. Bien qu'il y ait l'absence de certains ions y dans le bout de séquence LGG, l'ordre des acides aminés a pu être confirmé par la présence des ions b correspondants dans la zone de haute masse. La valeur ALC% élevé (88%) donne une fiabilité importante pour la séquence LFLPLAKLLGGLL(-0.98). Dans ce cas de figure, la labélisation des différents ions fragments ainsi que l'enchaînement des acides aminés ont été confirmés manuellement sur le logiciel Compass DataAnalysis 4.4 (Bruker) avec une erreur de masse inférieure à 0.02 Da.

Ainsi, ce peptide trouvé dans le venin de frelon pour la première fois semble proposer le même l'enchaînement que celui du peptide Vespidae chemotactic X/5^e (13 aa) décrit dans le venin de *Vespa xanthoptera* et *Vespa magnifica* [63] dans la banque de données Swissprot. La séquence **FLPIAKLLGGLL(-.98)** pourra donc être proposée en synthèse peptidique ainsi que son fragment

FLPIIAKL (décrit dans la partie II comme étant un substrat de l'élastase) pour validation expérimentale de son activité.

Nous avons poursuivi nos vérifications avec le peptide **N°13** d'ion m/z 519.3228 $[M+3H]^{3+}$ (Mastoparan X (14 aa) autre peptide d'intérêt et potentiellement actif sur l'élastase.

5.2.3.2 Séquençage de novo de l'ion N° 13 m/z 519.3228 $[M+3H]^{3+}$ - « Mastoparan X (14 aa) »

Dans le cadre de ce peptide, des observations similaires ont été menées sur le spectre de l'ion m/z 519.3228 $[M+3H]^{3+}$ fragmenté à 26.4 eV en MS/MS à la **Figure IV.16**.

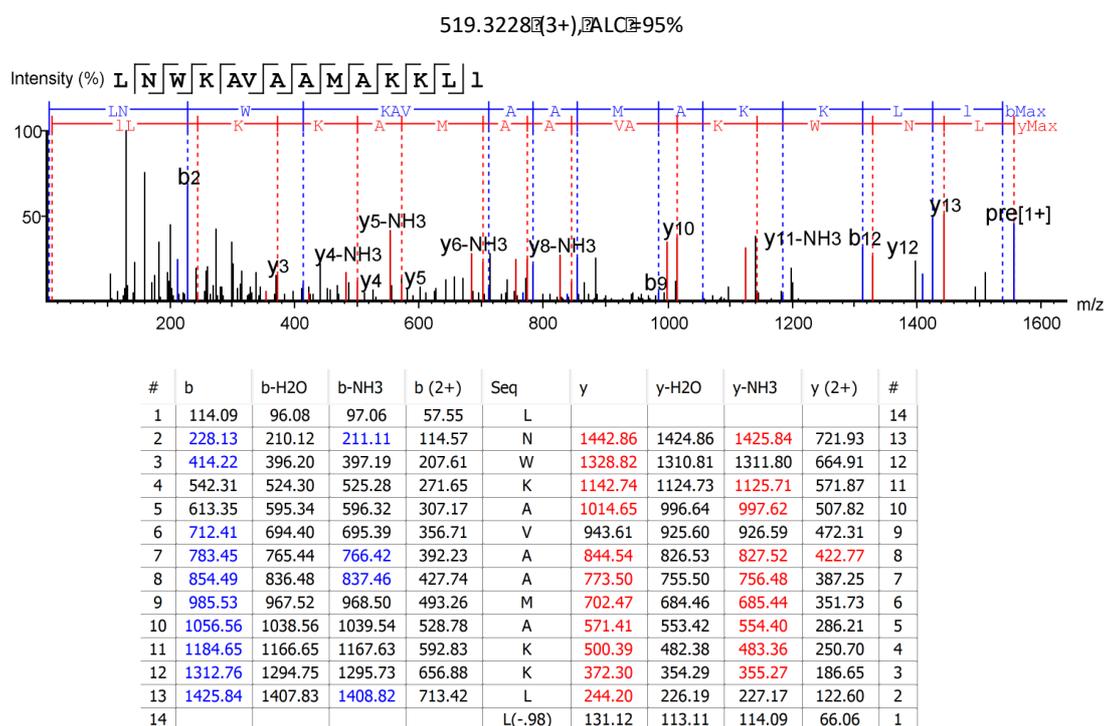


Figure IV.16 : Séquence obtenue de l'ion m/z 519.3228 $[M+3H]^{3+}$ par l'analyse de séquençage de novo du logiciel PEAKS

Comme précédemment, il est proposé à l'extrémité C-terminale, une modification d'amidation qui apporte une différence de masse de 0.98 Da. Cependant, ce spectre apporte des informations plus riches avec la présence à la fois des ions type y et b et cela dans la zone de faibles masses. La séquence a été caractérisée en se basant sur les ions intenses et la quasi-totalité des fragments consécutifs des ions y est déterminée et confirmée avec la série des ions type b. La séquence est caractérisée comme étant LNWKVA(ou AV)AAMAKKLL(-0.98) avec une bonne valeur d'ALC% =95%. Cependant, l'absence d'ion y_9 ne permet pas de déterminer avec confiance l'enchaînement de séquence A-V ou V-A à la position de y_{9-10} . Il s'agit précisément de l'enchaînement différenciant avec

celui de la séquence proposée pour le peptide Mastoparan X (14 aa) ou Mastoparan-like peptide 12a comme étant INWKGIAAMAKKLL(-0.98). La combinaison de deux acides G-I/L possédant exactement la même masse que la combinaison des acides aminés A-V avec 170.1055 Da.

La séquence de cet ion est suivie manuellement avec le logiciel Compass DataAnalysis (**Figure IV.17**) afin de confirmer la labélisation des ions utilisée par PEAKS.

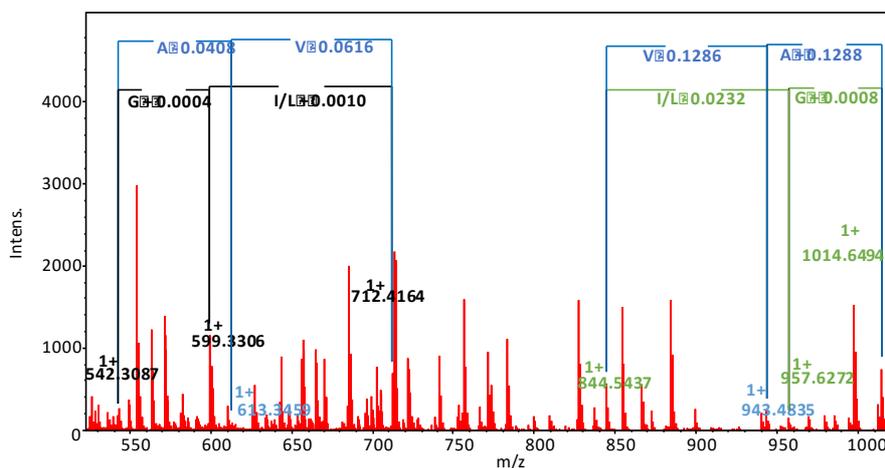


Figure IV.17 : Séquence de l'ion m/z 519.3228 $[M+3H]^{3+}$ obtenue en traçant manuellement à Compass DataAnalysis (Bruker). **Ligne verte** : la séquence tracée manuellement. **Ligne noire** : la séquence tracée manuellement suite aux séries d'ions. **Ligne bleue** : La séquence proposée par PEAKS

À travers cette étude, la séquence AV a été trouvée en suivant les séries d'ions y et b (ligne bleue) avec néanmoins une erreur importante en masse (comprise entre 0.04 à 0.12 Da) pour chaque résidu A et V. Parallèlement, la combinaison GI/L a également été retrouvée avec une labélisation d'ion plus intense tel que l'ion m/z 599.3306 et une erreur en masse plus faible de l'ordre de 0.0004 à 0.02.

Ainsi, après vérification manuelle le même l'enchaînement que celui du peptide Mastoparan X (14 aa) ou Mastoparan-like peptide 12a déjà décrit dans le venin de *Vespa xanthoptera* et *Vespa magnifica* [64], [65] semble être confirmé au sein du venin de frelon asiatique. La présence de fragments (tableau X) ayant cette partie de la séquence permet d'apporter une plus grande robustesse sur notre interprétation. Néanmoins, la séquence **INWGIAAMAKKLL(-0.98)** devra être synthétisée afin de valider expérimentalement la corrélation de l'empreinte spectrale MS/MS avec celle trouvée au sein du venin de frelon asiatique ainsi que son activité en tant que substrat de l'élastase.

Ce résultat nous a amenés à poursuivre nos vérifications avec les deux peptides nommés « produit **N°15** d'ion m/z 673.4284, 1+ » et « produits **N° 16** d'ion m/z 436.7538, 2+ » obtenus lors des essais enzymatiques avec la fraction peptidique de venin de frelon et l'élastase. Concernant ces deux produits, le résultat de cette étude a permis de confirmer la séquence de l'ion m/z 673.4284, 1+ (peptide **N°15** du **tableau IV.8**) comme étant **FLPLLA** et la séquence de l'ion m/z 436.7538, 2+ (peptide **N°16** du **tableau IV.8**) comme étant **INWGIAA**. Comme nous pouvons l'observer, ces bouts séquences correspondent respectivement à un fragment du peptide Vespide chemotatic X/5^e (13 aa) et au peptide Mastoparan X (14 aa) ou Mastoparan-like peptide 12a lui-même décrit ci-dessus. Ce résultat tend à confirmer à la fois les séquences de ces produits et à renforcer nos conclusions sur la présence potentielle de substrat de l'élastase dans le venin de frelon asiatique (décrit **partie II chapitre IV**).

Afin de finaliser nos vérifications de séquences, les peptides **N°9** d'ion m/z 462.6129 $[M+3H]^{3+}$ et **N° 5** d'ion m/z 449.2492, 3+ ont été étudiés.

5.2.3.3 Séquençage de novo de l'ion N°9 m/z 462.6129 $[M+3H]^{3+}$ -« Vespakinin-C »

Le spectre MS/MS de l'ion m/z 462.6129 $[M+3H]^{3+}$ obtenu à l'énergie de collision à 30.7 eV a présenté un spectre très informatif et riche en fragments type γ . L'interprétation de ce dernier par PEAKS studio a permis de proposer la séquence suivante **KLPPGFLLPFR** avec une valeur ALC% = 69% satisfaisante (**Figure IV.18**).

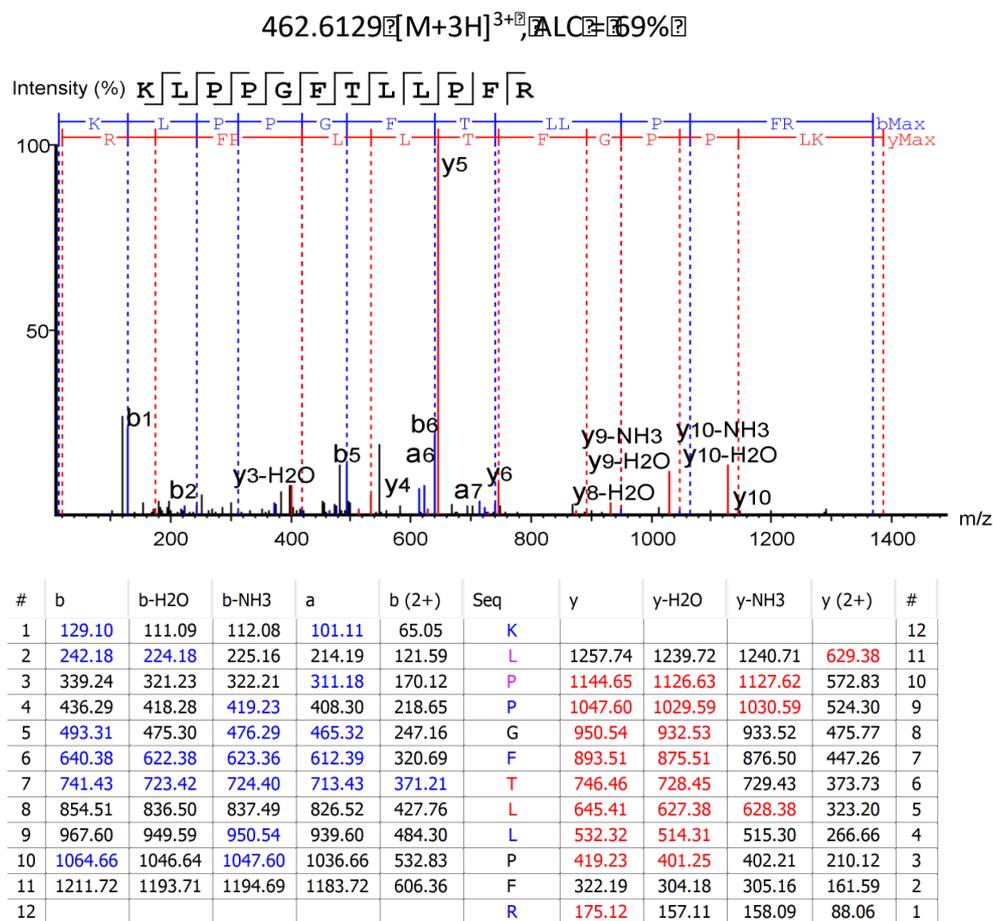


Figure IV.18 : Séquence obtenue de l'ion m/z 462.6129 $[M+3H]^{3+}$ par l'analyse de séquençage de novo du logiciel PEAKS

La correspondance de la séquence avec celles décrites dans la littérature de venin de frelon européen (*Vespa crabro flavogasciata*) [58] a permis de proposer le peptide Vespakinine-C (12 aa) **KLPPGFTLPLFR** comme hit. La séquence de ce peptide est extrêmement proche de celle proposée lors du séquençage de notre peptide, si ce n'est une inversion des acides aminés à la fin de la séquence C-terminale (y) : **TL(I)L(I)PFR** versus **TPFR** pour le peptide Vespakinine-C. Ces différences peuvent s'expliquer par le manque de certains ions dans l'enchaînement y et b. La vérification manuelle réalisée sur le logiciel Compass DataAnalysis (Bruker) nous a permis d'observer que l'ion intense au rapport m/z 548.3559 (1+) n'avait pas été pris en compte lors de l'interprétation par les logiciels de *de novo*. L'ordre de ce morceau de séquence a été suivi à partir d'ion $y_5 = 645.4084$ (Figure IV.19).

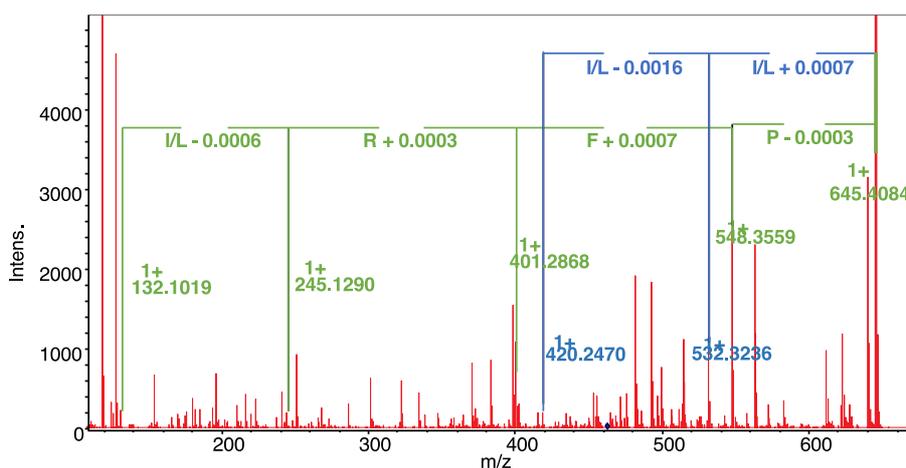


Figure IV.19 : Séquence de l'ion m/z 462.6129 $[M+3H]^{3+}$ obtenue en traçant manuellement à Compass DataAnalysis (Bruker). *Ligne verte* : la séquence tracée manuellement. *Ligne bleue* : La séquence proposée par PEAKS

En se basant sur les deux ions plus intenses à m/z 548.3559, $[M+H]^+$ et à m/z 401.2868, $[M+H]^+$, ce dernier a donné lieu à l'enchaînement de séquence (T-)PFRL avec une erreur de masse faible (<0.001 Da) (*ligne verte*) plutôt que la séquence proposée par logiciel PEAKS (*ligne bleue*) (T-) utilisant les **ions moins intenses** (**Figure IV.19**). Dans ce contexte, en attente de la synthèse de ce peptide, cette vérification nous a amenés à choisir la séquence **KLPPGFTPFRII** comme étant la plus probable avec la littérature et la nature de notre venin. Une nouvelle famille de peptide (Vespakinin) a donc été validée en attente de l'interprétation du dernier ion (m/z 449.2492, $[M+3H]^{3+}$, **N°5**) n'ayant donné aucune identification après soumission.

5.2.3.4 Séquençage de novo de l'ion N° 5 m/z 449.2492 $[M+3H]^{3+}$

En effet, l'ion **N° 5** de m/z 449.2492 $[M+3H]^{3+}$ a été analysé en MS/MS avec l'énergie de collision à 22.3 eV. Sa séquence a été proposée **PVNLGM(+15.99)SPFAVAK(-0.98)** par logiciel PEAKS avec une ALC% = 59% et une erreur de masse de -0.3 ppm (**Figure IV.20**). Malheureusement, la convolution avec le logiciel Biotools n'est pas envisageable, ce dernier n'ayant proposé aucune séquence dans nos critères de fiabilité.

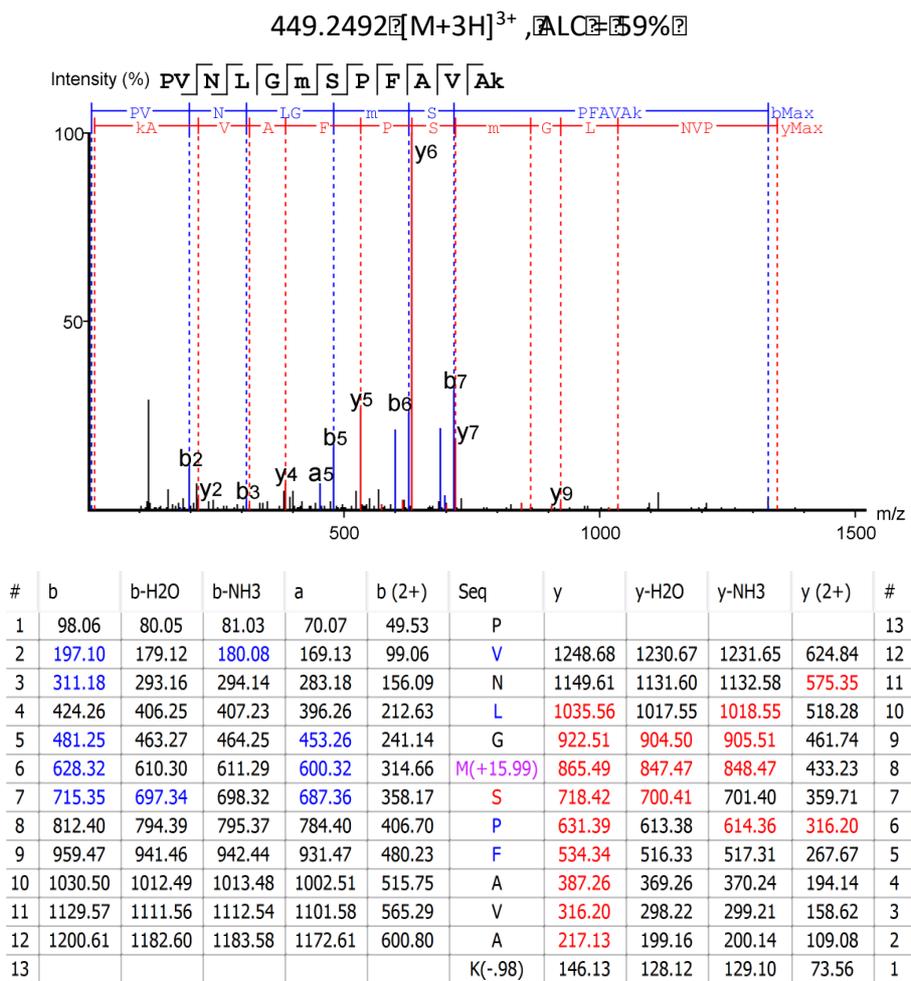


Figure IV.20 : Séquence obtenue de l'ion m/z 449.2492 [M+3H]³⁺ par l'analyse de séquençage de novo du logiciel PEAKS

De plus, le spectre MS/MS obtenu contient peu d'ions fragments intenses dans la gamme masse supérieure à 800 Da. L'interprétation se base principalement sur les ions fragments de faible rapport m/z. Comme pour les peptides précédents, une interprétation manuelle a été menée par logiciel de Compass DataAnalysis (Bruker) et présentée dans la Figure IV.21.

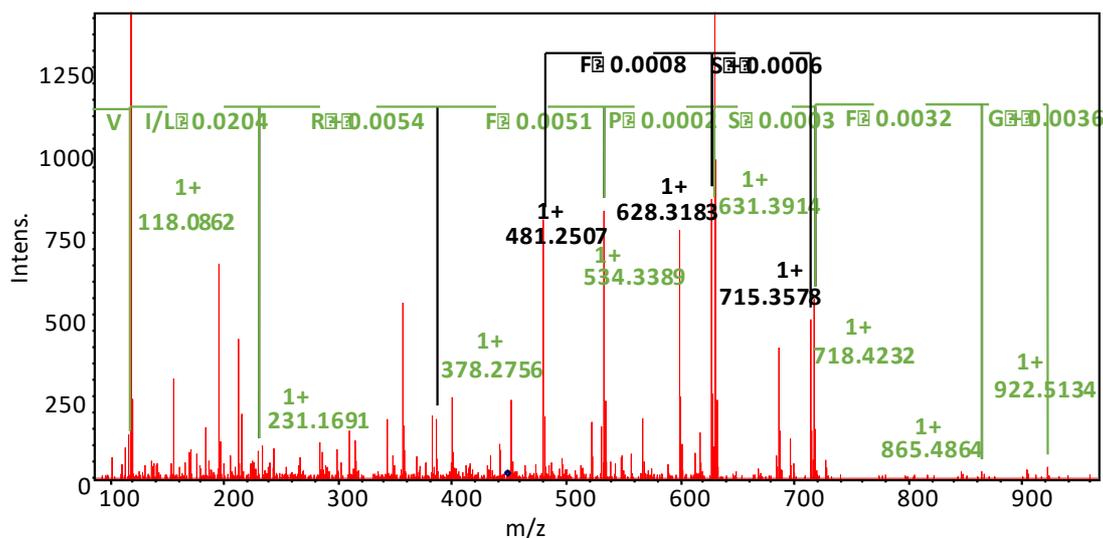


Figure IV.21 : Séquence de l'ion m/z 449.2492 $[M+3H]^{3+}$ obtenue en traçant manuellement à Compass DataAnalysis (Bruker). **Ligne verte** : la séquence tracée manuellement suite aux séries d'ions y. **Ligne noire** : la séquence tracée manuellement suite aux séries d'ions b

Cette dernière a permis de révéler l'enchaînement des acides aminés en utilisant les ions y (**ligne verte**) les plus intenses et avec une erreur en masse faible : **GFSPFRI/LV**. Contrairement à ce qui avait été proposé par le logiciel Peaks, la différence entre y_8 et y_7 correspondrait plutôt à un résidu de Phénylalanine (F) qu'à une oxydation d'un résidu Méthionine M (+15.99). De plus le suivi de l'enchaînement de la série b (**ligne noire**) tant à confirmer cette observation avec le bout de séquence (g) -FS obtenu avec une erreur de masse inférieure de 0.001 Da. Par ailleurs, nous avons observé que le logiciel Peaks avait pris en compte un ion bichargé de m/z 316.20 $[M+2H]^{2+}$ induisant une erreur sur la proposition du résidu A à la suite du résidu F. Dans ce contexte, l'enchaînement trouvé manuellement semblerait être le plus probable. La séquence « tag » serait finalement composée de l'enchaînement **GFSPFRI/LV** pour ce peptide au lieu de la séquence **PVNLGM(+15.99)** **SPFAVAK(-0.98)** initialement trouvée par Peaks. Ce résultat est très différent des études précédentes, cela pourrait expliquer pourquoi nous n'avons eu aucune correspondance lors de notre soumission.

Nous avons donc recherché une corrélation de notre nouvelle proposition de séquence sur la littérature et avons constaté que ce bout de séquence se trouve dans les peptides de type kinine comme Vespakinin-A (GRPP**GFSPFRVI**, masse monoisotopique = 1328.7353 Da)[66] et Vespakinin – X (ARPP**GFSPFRIV**, masse monoisotopique = 1342.7509 Da), [67]. Ce résultat conforte et complète

la présence dans notre venin de frelon asiatique de la famille de Vespakinin, avec un nouveau peptide de masse monoisotopique de 1344.7239 Da. Cependant, le manque d'informations dans l'enchaînement ne permet pas d'aller plus loin dans le séquençage entier de ce peptide.

À travers cette première étude préliminaire *de novo*, nous avons été en mesure de vérifier les propositions de séquences obtenues et d'identifier une partie de notre cocktail moléculaire de venin de frelon asiatique la présence de trois familles de peptides (Mastoparans, Vespide chemotactique et Vespakinin). C'est dans ce contexte que nous proposons de dresser, dans le cadre de notre conclusion, un bilan des peptides identifiés par *de novo* et la corrélation avec les marqueurs discriminants mis en avant lors de l'étude de « sourcing » de venin de frelon et la présence de substrat de l'élastase.

Conclusion

L'approche développée dans la **partie I** de ce chapitre avait pour objectifs d'évaluer par une approche analytique non ciblée combinée avec des outils statistiques multivariés l'influence du « sourcing » sur la richesse de l'extrait et ces particularités. Dans ce contexte, nous avons été en mesure de mettre en évidence la **présence de molécules discriminantes** permettant de **différencier le venin de frelon selon la période de collecte, le rôle d'ouvrières et les castes**. Parallèlement, une **stratégie de criblage** d'interaction ligand/enzyme utilisant une enzyme immobilisée et une détection basée sur la spectrométrie de masse a été mise en place dans la **partie II**. L'approche d'immobilisation de **l'élastase** a été introduite pour la première fois et a permis de révéler la présence de deux composés d'intérêt jouant **un rôle de substrat** pour cette enzyme. C'est dans ce contexte que nous avons mis en place, dans la **partie III**, une méthode de caractérisation des peptides naturels discriminants ou actifs (substrat) en utilisant l'approche de séquençage *de novo*. Une synthèse de ces résultats est présentée ci-dessous sous forme d'un **Tableau IV-9**.

Tableau IV-9 : Molécules discriminantes du venin de frelon selon la nature du « sourcing » et de l'activité vis-à-vis de l'élastase. Les lettres dans les colonnes de variation de venin représentent le groupe ayant le contenu du peptide le plus intense pour chaque comparaison. [S] : Substrat.

[M+nH] ⁿ⁺ m/z	Charge z	Séquence	Nom	Partie I Etude de sourcing			Partie II Etude de criblage (IF/IH)
				Été/ Hiver (E/H)	Nid/ Ruche (N/Ru)	Fondatrice/ Ouvrier/ Reine (F/O/Re)	
388.7103	2	WKGIAA	Fragments de Mastoparan X			Re	
510.2713	2	INWKGIAAM(+15.99)			Ru		
502.2714	2	INWKGIAAM		H		Re	
401.5615	3	INWKGIAAMAK				Re	
519.3228	3	INWKGIAAMAKKLL(-.98)	Mastoparan X				[S]
471.3269	1	LGLL	Fragments de Vespid chemotactic peptide X/5e			Re	
654.4508	1	PIIAKL		H			
384.2726	2	LPPIAKL			Ru		
401.2645	2	FLPIIAK		H		Re	
457.8068	2	FLPIIAKL				Re	[S]
514.3498	2	FLPIIAKLL				O	
449.2519	3	PVNLGFSPFRLV	Kinin	E			
462.6129	3	KLPPGFTPFRIL	Vespakinin C	E			

À notre connaissance, nous n'avons trouvé aucune corrélation directe entre la nature de ces peptides et leurs spécificités au sein de la colonie de frelons asiatiques dans la littérature. Dans ce contexte, nous avons essayé de proposer certaines hypothèses entre nos observations et le rôle des familles de peptides identifiés.

- i) Ainsi lors de la comparaison des profils peptidiques entre les venins collectés sur les deux périodes (été-hiver) et cela sur deux années consécutives (2017-2018), les fragments de Mastoparan X (14 aa) à m/z 502.2712 $[M+2H]^{2+}$ et Vespid chemotactic peptide à m/z 654.4508 $[M+H]^+$ et m/z 401.2645 $[M+2H]^{2+}$ ont participé à la discrimination de ces deux populations, en particulier avec une présence de ces fragments plus abondants dans les venins d'ouvrières collectées en hiver. Malgré de multiples fonctions de ces peptides et de leurs fragments, l'hypothèse portant sur la capacité antimicrobienne [68] des ouvrières dans leur cycle de maturité pourrait expliquer leurs présences en plus grande quantité dans le sac à venin en prévision d'une infection du nid en hiver.

Parallèlement, les composés de Vespakinin C à m/z 462.6129 $[M+3H]^{3+}$ et N ° 5 de kinin à m/z 449.2492 $[M+3H]^{3+}$ ont été quant à eux trouvés **plus abondant dans les venins collectés en été**. De par le rôle de ce peptide et de ces fragments décrits comme étant principalement responsables de

réactions inflammatoires, de production de douleur et paralysie [63], [69]. Il peut être envisagé que la présence plus en abondant de ces peptides en été soit en corrélation avec la saison de prédation.

- ii) Afin de compléter cette observation, une étude sur la comparaison des venins de frelon collectés au mois d'octobre sur des ouvrières devant rucher (prédation) et celles au sein de leur nid a pu être réalisée (2017 et 2018). Le fragment Mastoparan à m/z 510.2713 $[M+2H]^{2+}$ et celui du peptide de Vespida chemotatic m/z 384.2726 $[M+2H]^{2+}$ ont été quant à eux trouvés **plus abondant dans les venins collectés en devant rucher (phase de prédation)**. Contrairement, à ce que nous avons envisagé, ce n'est pas la famille des Vespakinines qui sont les plus abondants, mais bien des fragments des peptides Mastoparan et Vespida chemotatic différents de ceux décrits précédemment comme antimicrobien. Il semblerait, dans le cadre de cette étude, que les fragments de ces peptides expriment leur caractère amphipathique de dégranulation des mastocytes entraînant une hypersensibilité immédiate et une inflammation [68], [70] pour but de favoriser la **diffusion de venin sur leurs proies**. Au vu de ces deux études, il semble difficile d'émettre avec robustesse des hypothèses.
- iii) Néanmoins, nous avons eu l'opportunité d'enrichir notre étude de « sourcing » avec une comparaison de la composition du venin en fonction des castes en été en 2017 (reine, fondatrice et ouvrière). Cette comparaison a permis de mettre en avant une discrimination significative entre ces dernières avec une empreinte peptidique plus intense pour le venin de reines. Bien que les fragments correspondent aux deux peptides Mastoparan X (14 aa) et peptide de Vespida chemotatic (13 aa), aucun de ces fragments ne correspond à ceux trouvés lors du rôle de prédation devant rucher ou en été (Vespakinin). Ils sont plutôt décrits comme abondants en hiver pour les ouvrières. Sachant que le rôle de la reine se résume à la fécondation (fondation d'un nid), l'utilisation de son venin reste très limitée, ce qui peut expliquer l'abondance de certains peptides. Malgré l'abondance de son cocktail de peptide, le fragment peptidique de Vespida chemotatic (13 aa) l'ion m/z 457.8068 $[M+2H]^{2+}$ est quant à lui plus faible en comparaison avec la caste des ouvrières. Cet ion a été également trouvé comme étant un substrat de l'élastase (**partie II**). Ce résultat pourrait valider l'hypothèse des clivages des peptides pour enrichir la diversité moléculaire du venin peptidique, en formant des fragments distingués ayant des activités sur différentes cibles et modes d'action [61].

Bien que préliminaires, ces résultats nous permettent d'envisager la synthèse peptidique de certains candidats décrits ci-dessus afin de valider notre approche multivariée (**partie I**) et de

criblage de ligand/élastase (**partie II**). Néanmoins, un grand nombre des peptides reste encore caractérisation. Il devra être envisagé d'approfondir l'approche *de novo*.

Références

- [1] D. Eliyahu, K. G. Ross, K. L. Haight, L. Keller, and J. Liebig, "Venom Alkaloid and Cuticular Hydrocarbon Profiles Are Associated with Social Organization, Queen Fertility Status, and Queen Genotype in the Fire Ant *Solenopsis invicta*," *J Chem Ecol*, vol. 37, no. 11, pp. 1242–1254, Nov. 2011, doi: 10.1007/s10886-011-0037-y.
- [2] C. T. Cologna, R. S. Rodrigues, J. Santos, E. de Pauw, E. C. Arantes, and L. Quinton, "Peptidomic investigation of *Neoponera villosa* venom by high-resolution mass spectrometry: seasonal and nesting habitat variations," *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, vol. 24, p. 6, 2018, doi: 10.1186/s40409-018-0141-3.
- [3] B. Halassy *et al.*, "Intraspecific variability in *Vipera ammodytes ammodytes* venom related to its toxicity and immunogenic potential," *COMP BIOCHEM PHYS C*, vol. 153, no. 2, pp. 223–230, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cbpc.2010.10.007.
- [4] J.-F. Gao *et al.*, "Proteomic and biochemical analyses of short-tailed pit viper (*Gloydius brevicaudus*) venom: Age-related variation and composition–activity correlation," *J. Proteom.*, vol. 105, pp. 307–322, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.jprot.2014.01.019.
- [5] M. A. Abdel-Rahman, M. A. A. Omran, I. M. Abdel-Nabi, O. A. Nassier, and B. J. Schemerhorn, "Neurotoxic and cytotoxic effects of venom from different populations of the Egyptian *Scorpio maurus palmatus*," *Toxicon*, vol. 55, no. 2, pp. 298–306, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.toxicon.2009.08.003.
- [6] T.-B. Chen, Y.-H. Zuo, G.-T. Dong, L. Liu, and H. Zhou, "An integrated strategy for rapid discovery and identification of quality markers in Guanxin Kangtai preparation using UHPLC-TOF/MS and multivariate statistical analysis," *Phytomedicine*, vol. 44, pp. 239–246, May 2018, doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.005.
- [7] J. Bao *et al.*, "Fast identification of anticancer constituents in *Forsythiae Fructus* based on metabolomics approaches," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 154, pp. 312–320, May 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.020.
- [8] X. Wang, X. Zhao, L. Gu, Y. Zhang, K. Bi, and X. Chen, "Discrimination of aqueous and vinegary extracts of Shixiao San using metabolomics coupled with multivariate data analysis and evaluation of anti-hyperlipidemic effect," *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 17–26, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.ajps.2013.11.008.
- [9] P. S. Gromski *et al.*, "A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding," *Anal. Chim. Acta*, vol. 879, pp. 10–23, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.02.012.
- [10] R. C. Bernardi *et al.*, "Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum* Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 175, pp. 200–206, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.09.004.
- [11] G. S. Nystrom, M. J. Ward, S. A. Ellsworth, and D. R. Rokyta, "Sex-based venom variation in the eastern bark centipede (*Hemiscolopendra marginata*)," *Toxicon*, vol. 169, pp. 45–58, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.toxicon.2019.08.001.
- [12] Y. Bai, Q. Zhao, M. He, X. Ye, and X. Zhang, "Extensive characterization and differential analysis of endogenous peptides from *Bombyx batryticatus* using mass spectrometric approach," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 163, pp. 78–87, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2018.09.033.
- [13] A. Touchard, A. Dejean, P. Escoubas, and J. Orivel, "Intraspecific variations in the venom peptidome of the ant *Odontomachus haematodus* (formicidae: ponerinae) from French Guiana," *J. Hymenopt. Res.*, vol. 47, pp. 87–101, Mar. 2018, doi: 10.3897/JHR.47.6804.
- [14] S. Naz, M. Vallejo, A. García, and C. Barbas, "Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics," *J Chromatogr A*, vol. 1353, pp. 99–105, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.04.071.
- [15] C. A. Smith, E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, and G. Siuzdak, "XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 3, pp. 779–787, Feb. 2006, doi: 10.1021/ac051437y.
- [16] J. Xia, N. Psychogios, N. Young, and D. S. Wishart, "MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation," *Nucleic Acids Res*, vol. 37, no. Web Server issue, pp. W652–W660, Jul. 2009, doi: 10.1093/nar/gkp356.
- [17] M. Katajamaa and M. Orešič, "Data processing for mass spectrometry-based metabolomics," *J Chromatogr A*, vol. 1158, no. 1, pp. 318–328, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.04.021.

- [18] H. Zheng, M. R. Clausen, T. K. Dalsgaard, G. Mortensen, and H. C. Bertram, "Time-Saving Design of Experiment Protocol for Optimization of LC-MS Data Processing in Metabolomic Approaches," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 15, pp. 7109–7116, Aug. 2013, doi: 10.1021/ac4020325.
- [19] M. Eliasson *et al.*, "Strategy for Optimizing LC-MS Data Processing in Metabolomics: A Design of Experiments Approach," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 15, pp. 6869–6876, Aug. 2012, doi: 10.1021/ac301482k.
- [20] W. B. Dunn *et al.*, "Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the LTQ-Orbitrap mass spectrometry system," *J Chromatogr B*, vol. 871, no. 2, pp. 288–298, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.03.021.
- [21] G. Libiseller *et al.*, "IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters," *BMC Bioinformatics*, vol. 16, p. 118, Apr. 2015, doi: 10.1186/s12859-015-0562-8.
- [22] K. Monceau, O. Bonnard, and D. Thiéry, "Vespa velutina: a new invasive predator of honeybees in Europe," *J Pest Sci*, vol. 87, no. 1, pp. 1–16, Mar. 2014, doi: 10.1007/s10340-013-0537-3.
- [23] T. Piek, *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Elsevier, 2013.
- [24] Z. Liu *et al.*, "Deciphering the venom transcriptome of killer-wasp *Vespa velutina*," *Sci Rep*, vol. 5, p. 9454, Apr. 2015, doi: 10.1038/srep09454.
- [25] M. W. Pennington, A. Czerwinski, and R. S. Norton, "Peptide therapeutics from venom: Current status and potential," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 26, no. 10, pp. 2738–2758, 01 2018, doi: 10.1016/j.bmc.2017.09.029.
- [26] N. Peiren, F. Vanrobaeys, D. C. de Graaf, B. Devreese, J. Van Beeumen, and F. J. Jacobs, "The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1752, no. 1, pp. 1–5, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.07.017.
- [27] N. B. Dias, B. M. de Souza, P. C. Gomes, and M. S. Palma, "Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): a comparison of the intra- and inter-colony compositions," *Peptides*, vol. 51, pp. 122–130, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.029.
- [28] N. Sookrung *et al.*, "Proteome and allergenome of Asian wasp, *Vespa affinis*, venom and IgE reactivity of the venom components," *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 1336–1344, Mar. 2014, doi: 10.1021/pr4009139.
- [29] M. Gilar, A. Belenky, and B. H. Wang, "High-throughput biopolymer desalting by solid-phase extraction prior to mass spectrometric analysis," *J Chromatogr A*, vol. 921, no. 1, pp. 3–13, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)00833-0.
- [30] J. Boekel *et al.*, "Multi-omic data analysis using Galaxy," *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, pp. 137–139, Feb. 2015.
- [31] E. Afgan *et al.*, "The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update," *Nucleic Acids Res*, vol. 46, no. W1, pp. W537–W544, Jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky379.
- [32] F. Giacomoni *et al.*, "Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 9, pp. 1493–1495, May 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btu813.
- [33] E. M. Forsberg *et al.*, "Data processing, multi-omic pathway mapping, and metabolite activity analysis using XCMS Online," *Nat Protoc*, vol. 13, no. 4, pp. 633–651, Apr. 2018, doi: 10.1038/nprot.2017.151.
- [34] C. Kuhl, R. Tautenhahn, C. Böttcher, T. R. Larson, and S. Neumann, "CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 1, pp. 283–289, Jan. 2012, doi: 10.1021/ac202450g.
- [35] E. Szymańska, E. Saccenti, A. K. Smilde, and J. A. Westerhuis, "Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies," *Metabolomics*, vol. 8, no. Suppl 1, pp. 3–16, Jun. 2012, doi: 10.1007/s11306-011-0330-3.
- [36] J. A. Westerhuis *et al.*, "Assessment of PLS-DA cross validation," *Metabolomics*, vol. 4, no. 1, pp. 81–89, Mar. 2008, doi: 10.1007/s11306-007-0099-6.
- [37] P. Good, *Permutation Tests: A Practical Guide to Resampling Methods for Testing Hypotheses*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [38] S. Bijlsma *et al.*, "Large-Scale Human Metabolomics Studies: A Strategy for Data (Pre-) Processing and Validation," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 2, pp. 567–574, Jan. 2006, doi: 10.1021/ac051495j.
- [39] R. Lievense, *Pharmaceutical Quality by Design Using JMP®: Solving Product Development and Manufacturing Problems*. SAS Institute, 2018.
- [40] Y. Ouyang *et al.*, "A high throughput metabolomics method and its application in female serum samples in a normal menstrual cycle based on liquid chromatography-mass spectrometry," *Talanta*, vol. 185, pp. 483–490, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.03.087.
- [41] B. Worley and R. Powers, "Multivariate Analysis in Metabolomics," *Curr Metabolomics*, vol. 1, no. 1, pp. 92–107, 2013, doi: 10.2174/2213235X11301010092.
- [42] Q. Rome, F. J. Muller, A. Touret-Alby, E. Darrouzet, A. Perrard, and C. Villemant, "Caste differentiation and seasonal changes in *Vespa velutina* (Hym.: Vespidae) colonies in its introduced range," *J. Appl. Entomol.*, vol. 139, no. 10, pp. 771–782, 2015, doi: 10.1111/jen.12210.

- [43] W. Chen *et al.*, “Antimicrobial peptides from the venoms of *Vespa bicolor* Fabricius,” *Peptides*, vol. 29, no. 11, pp. 1887–1892, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.peptides.2008.07.018.
- [44] M. D. Owen, “Quantitative and temporal changes in honey bee venom — A review,” *Toxicon*, vol. 21, pp. 329–332, Jan. 1983, doi: 10.1016/0041-0101(83)90222-2.
- [45] S. Dutertre, A.-H. Jin, P. F. Alewood, and R. J. Lewis, “Intraspecific variations in *Conus geographus* defence-evoked venom and estimation of the human lethal dose,” *Toxicon*, vol. 91, pp. 135–144, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.toxicon.2014.09.011.
- [46] F. REQUIER, “Le risque de mortalité des colonies d’abeilles s’accroît sous la pression du frelon asiatique,” Dec. 05, 2018. <http://www.spe.inra.fr%2FToutes-les-actualites%2Ffrelon-asiatique-et-mortalite-des-colonies-d-abeilles> (accessed Nov. 27, 2019).
- [47] K. Monceau, N. Maher, O. Bonnard, and D. Thiéry, “Predation pressure dynamics study of the recently introduced honeybee killer *Vespa velutina*: learning from the enemy,” *Apidologie*, vol. 44, no. 2, pp. 209–221, Mar. 2013, doi: 10.1007/s13592-012-0172-7.
- [48] F. Requier *et al.*, “Predation of the invasive Asian hornet affects foraging activity and survival probability of honey bees in Western Europe,” *J Pest Sci*, vol. 92, no. 2, pp. 567–578, Mar. 2019, doi: 10.1007/s10340-018-1063-0.
- [49] K. Monceau *et al.*, “Native Prey and Invasive Predator Patterns of Foraging Activity: The Case of the Yellow-Legged Hornet Predation at European Honeybee Hives,” *PLOS ONE*, vol. 8, no. 6, p. e66492, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066492.
- [50] A. A. Walker *et al.*, “Entomo-venomics: The evolution, biology and biochemistry of insect venoms,” *Toxicon*, vol. 154, pp. 15–27, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.toxicon.2018.09.004.
- [51] “Abeille domestique contre Frelon asiatique | Parc naturel régional de la Haute Vallée de Chevreuse.” <https://www.parc-naturel-chevreuse.fr/une-autre-vie-sinvente-ici/nature-ressources-protection-des-especes/abeille-domestique-contre-frelon> (accessed Nov. 27, 2019).
- [52] E. L. Danneels, M. Van Vaerenbergh, G. Debyser, B. Devreese, and D. C. de Graaf, “Honeybee Venom Proteome Profile of Queens and Winter Bees as Determined by a Mass Spectrometric Approach,” *Toxins (Basel)*, vol. 7, no. 11, pp. 4468–4483, Oct. 2015, doi: 10.3390/toxins7114468.
- [53] “Chapter 5 Methods for the detection of peptides,” in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 9, Elsevier, 1981, pp. 135–160.
- [54] A. Salwiński, “Development of novel mass spectrometry-based approaches for searching for low-mass tyrosinase inhibitors in complex mixtures,” thesis, Université d’Orléans, 2014.
- [55] E. G. Del Mar, C. Largman, J. W. Brodrick, M. Fassett, and M. C. Geokas, “Substrate specificity of human pancreatic elastase 2,” *Biochemistry*, vol. 19, no. 3, pp. 468–472, Feb. 1980, doi: 10.1021/bi00544a011.
- [56] Bruker Daltonics, “maXis user manual.” [Online]. Available: http://core.tmmu.edu.cn/attachments/193/maXis_User_Manual.pdf.
- [57] A. T. Lebedev, E. Damoc, A. A. Makarov, and T. Yu. Samgina, “Discrimination of Leucine and Isoleucine in Peptides Sequencing with Orbitrap Fusion Mass Spectrometer,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 14, pp. 7017–7022, Jul. 2014, doi: 10.1021/ac501200h.
- [58] K. A. Yoon *et al.*, “Comparative functional venomomics of social hornets *Vespa crabro* and *Vespa analis*,” *J. Asia Pac. Entomol.*, vol. 18, no. 4, pp. 815–823, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.aspen.2015.10.005.
- [59] T. Nakajima *et al.*, “Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties,” *Peptides*, vol. 6, pp. 425–430, Jan. 1985, doi: 10.1016/0196-9781(85)90409-7.
- [60] B. Rates, K. K. F. Ferraz, M. H. Borges, M. Richardson, M. E. De Lima, and A. M. C. Pimenta, “*Tityus serrulatus* venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity,” *Toxicon*, vol. 52, no. 5, pp. 611–618, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.toxicon.2008.07.010.
- [61] T. Verano-Braga *et al.*, “Moving Pieces in a Venom Puzzle: Unveiling Post-translationally Modified Toxins from *Tityus serrulatus*,” *J. Proteome Res.*, vol. 12, no. 7, pp. 3460–3470, Jul. 2013, doi: 10.1021/pr4003068.
- [62] P. Edman, “A method for the determination of amino acid sequence in peptides,” *Arch Biochem*, vol. 22, no. 3, p. 475, Jul. 1949.
- [63] X. Xu, J. Li, Q. Lu, H. Yang, Y. Zhang, and R. Lai, “Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom,” *Toxicon*, vol. 47, no. 2, pp. 249–253, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.toxicon.2005.10.015.
- [64] X. Xu, H. Yang, H. Yu, J. Li, and R. Lai, “The mastoparanogen from wasp,” *Peptides*, vol. 27, no. 12, pp. 3053–3057, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.peptides.2006.09.003.
- [65] Y. Hirai, M. Kuwada, T. Yasuhara, H. Yoshida, and T. Nakajima, “A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*),” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 27, no. 8, pp. 1945–1946, Aug. 1979, doi: 10.1248/cpb.27.1945.
- [66] M. Gobbo, L. Biondi, F. Filira, R. Rocchi, and T. Piek, “Cyclic analogues of wasp kinins from *Vespa analis* and *Vespa tropica*,” *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 282–289, 1995, doi: 10.1111/j.1399-3011.1995.tb01490.x.

-
- [67] T. Yasuhara, H. Yoshida, and T. Nakajima, "Chemical Investigation of the Hornet (*Vespa xanthoptera* CAMERON) Venom. The Structure of a New Bradykinin Analogue 'Vespakinin-X,'" *Chem Pharm Bull*, vol. 25, no. 5, pp. 936–941, 1977, doi: 10.1248/cpb.25.936.
- [68] D. Mans, S. Sairras, D. Ganga, and J. Kartopawiro, "Exploring the global animal biodiversity in the search for new drugs - insects," *J Transl Sci*, vol. 3, pp. 371–386, Dec. 2016, doi: 10.15761/JTS.1000164.
- [69] Y. Tsukamoto, C. Mori, S. Fukutani, M. Mori, T. Yasuhara, and T. Nakajima, "O-118 - Structure and Activity of Chemotactic Peptides from Wasp Venom and Frog Skin," *Jpn J Pharmacol*, vol. 43, p. 92, Jan. 1987, doi: 10.1016/S0021-5198(19)58080-5.
- [70] S. Lee, J. Baek, and K. Yoon, "Differential Properties of Venom Peptides and Proteins in Solitary vs. Social Hunting Wasps," *Toxins*, vol. 8, no. 2, p. 32, Jan. 2016, doi: 10.3390/toxins8020032.

Conclusion générale et perspectives

L'utilisation topique de substances dépigmentantes efficaces et inoffensives est particulièrement recherchée en cosmétique et en dermatologie. La recherche de nouveaux composés pour prévenir ou atténuer le vieillissement de la peau et également améliorer l'image de soi est une priorité des recherches actuelles dans les cosmétiques actifs. C'est dans ce contexte que nos travaux, dans le cadre du projet **FrelonCosm'**, ont porté sur l'étude d'une source particulière de molécules potentiellement bioactives en l'occurrence le venin de frelons asiatiques ou frelon à pattes jaunes (*Vespa velutina nigrithorax*). Ce **projet ARD 2020 Cosmétosciences**, financé par la **Région Centre Val de Loire**, regroupe trois partenaires académiques, l'Institut de Chimie Organique et Analytique (**ICOA**) UMR CNRS 7311 de l'université d'Orléans, Centre de Biophysique Moléculaire (**CBM**) UPR4301 de CNRS, l'Institut de Recherche sur la Biologie des Insectes (**IRBI**) UMR CNRS 7261 de l'Université de Tours et un partenaire industriel la société **CHIMEX** du groupe l'Oréal).

Une caractérisation sur le plan moléculaire du venin de frelon à pattes jaunes a permis d'investiguer une nouvelle source de molécules potentiellement bioactives. Nos recherches ont conduit à mettre en place des méthodologies et techniques innovantes et spécifiques sur le venin brut ou des fractions moléculaires issues de ce venin afin d'extraire des actifs d'une quantité minimale de venin et la mise au point de méthodes spécifiques de criblage basées sur les interactions substrat/enzyme, sur des tests biologiques et sur l'application d'études structurales par spectrométrie de masse.

Un des **premiers résultats** est la mise en évidence par séparation SDS-PAGE d'une différence au niveau des profils protéiques des venins collectés selon deux méthodes d'échantillonnage différentes : l'une réalisée par compression douce du sac à venins et l'autre réalisée par écrasement du sac à venin et récupération par centrifugation. Ces premières études permettent de confirmer que l'extraction du sac à venin par écrasement induit des contaminations venant des protéines constitutives du sac à venin. Il a alors été décidé d'appliquer la **méthode de la compression de glande de venin dans toutes les études** de cette thèse.

Par la suite, une stratégie sur l'étude du venin brut du frelon asiatique en mettant en œuvre une méthode chromatographique de fractionnement guidé afin de rechercher, via différents tests chimiques ou biologiques, les fractions protéiques (**Vv > 10 kDa**), peptidiques (**Vv < 10 kDa**) et/ou molécules issues de ce venin responsable d'activités inhibitrices spécifiques (anti-tyrosinase, anti-élastase, anti-collagénase, antimicrobienne) et de l'activité antioxydante.

Il s'avère qu'**aucune** des deux fractions Vv < 10 kDa et Vv > 10 kDa ne montrent d'activité inhibitrice notable vis-à-vis de la **tyrosinase, l'élastase et la collagénase**.

En parallèle, nous avons mis en évidence une activité antioxydante du venin brut via la réduction des espèces réactives oxygénées intracellulaires sur lignée cellulaire kératinocytes HaCaT à une faible concentration ($2.5 \cdot 10^{-4}$ µg protéine/mL) sans montrer de cytotoxicité. Des études par TLC-DPPH, HPLC-UV-DPPH et par UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS ont été alors mis en œuvre afin d'une part de simplifier la fraction d'intérêt et d'autre part de caractériser la ou les molécules responsables de cette activité antioxydante. La **sérotonine** a été ainsi identifiée, dans notre cas, comme le **composé actif responsable de l'activité antioxydante** du venin de frelon asiatique, activité antioxydante validée par l'utilisation la méthode **TEAC** (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), le test de la réduction du fer **FRAP** (*Ferric reducing-antioxidant power*) et le test indirect de l'activité de l'enzyme **SOD** (Superoxyde dismutase).

Pour finir, l'activité antimicrobienne du venin (Vv) et de la fraction Vv < 10 kDa a été évaluée sur deux cibles d'intérêt dans le domaine cosmétique : la bactérie *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), vivant dans et autour des glandes sudoripares et des glandes sébacées et est liée à l'écllosion de l'acné et le champignon de *Malassezia furfur* (*M. furfur*) qui peut se développer et être responsable de *pityriasis versicolor* (desquamation de la peau en fines pellicules blanchâtres). Seul **un effet inhibiteur du venin brut** a été démontré sur la souche *C. acnes* (effet antimicrobien).

Pour finir, une **stratégie peptidomique** a été mise en place afin de comparer l'influence de « sourcing » (**période de collecte, castes, comportement de l'insecte**) des venins de frelon. Il s'avère que la différence en termes de profil moléculaire entre les venins d'animaux collectés **en hiver ou en été est très faible**. Cependant, l'analyse statistique a permis de déduire une **discrimination significative** présente dans le profil peptidique et de petites molécules dans le venin des **frelons prédateur devant une ruche versus des frelons dans leur nid**. Concernant les profils des **castes** (reine, ouvrières, fondatrices), ces derniers ont montré une **discrimination significative** entre les reines et les deux autres castes. À l'issue de cette expérience, les méthodes « **Ion Fading** » et « **Ion Hunting** » basées sur **l'immobilisation** des enzymes élastase sur support solide (billes magnétiques) ont été introduites pour la première fois afin d'étudier l'interaction ligand-enzyme par ESI-QTOF-HRMS. Ainsi, deux composés d'une masse autour de **458 Da et 519 Da** ont été identifiés comme possédant le rôle de **substrats** de cette enzyme **élastase**.

En final, nous avons mis en évidence une méthode de caractérisation des peptides naturels en utilisant la technique ESI-QTOF-HRMS/MS avec l'outil « **de novo sequencing** » du logiciel **PEAKS Studio et Biotoools**. La méthodologie impliquée a permis de caractériser **16 peptides** comprenant quatre peptides entiers et leurs fragments. De nos connaissances, nous avons mis en évidence, pour la première fois dans le venin de frelon asiatique *Vespa velutina*, la présence potentielle de **Mastoparan X** et **Vespide chemotactic peptide X/5^e** dont, respectivement, **INWKGIAAMAKLL(-0.98)** relatif à l'ion **m/z 519.3228 [M+3H]³⁺**, et **FLPIIAKLLGGLL(-.98)** relatif à l'ion **683.9633 [M+2H]²⁺** a été déterminé par séquençage *de novo*.

Ainsi, le projet FrelonCosm' participe à répondre à une **demande croissante de produits cosmétiques** basés sur le développement de **nouveaux agents topiques dépigmentants stables, efficaces**, et s'inscrit directement dans une démarche de **Bien Etre et de Santé**.

Alors que ces travaux de Thèse constituent **un point de départ** dans **l'étude de venin** pour l'équipe analytique de l'Institut de Chimie Organique et Analytique, de nombreuses investigations supplémentaires pourront être menées en prolongement.

Tout d'abord, il serait intéressant de ne pas seulement étudier des animaux morts, mais également des **animaux vivants**, car l'on peut penser que la synthèse finale du venin se fait en fonction de la situation devant laquelle l'insecte se trouve (prédation, défense, reproduction). Aussi, il serait judicieux de mettre un protocole de collecte de venin sur ces animaux vivants en employant par exemple **un choc électrique** maîtrisé soit par application d'aiguille soit sur plaque.

Lors des études par les méthodes « Ion Fading » et « Ion Hunting », nous pouvons être confrontés à des interactions non spécifiques entre les composés d'intérêt et la surface silice des billes magnétiques. Aussi, des recherches pourraient être menées sur l'utilisation d'un **support de type polymérique** (polyninyl alcohol, glycidyl methacrylate, poly(2-hydroxyethyl acrylate)) afin de piéger l'enzyme tout en permettant le passage du substrat et des produits à travers ce support. Cette méthode amènerait **peu de modifications structurales de l'enzyme** de par l'absence de contraintes mécaniques et améliorerait la protection des enzymes du milieu extérieur augmentant ainsi la stabilité.

De plus, les études sur l'évaluation d'interaction spécifique d'inhibiteur vis-à-vis des enzymes cibles tyrosinase ou élastase pourront être élargies à **d'autres enzymes** telles que la **collagénase** ou **l'hyaluronidase**, enzymes dont l'inhibition diminuerait d'autant la dégradation du collagène assurant la fermeté de la peau et la dégradation de l'acide hyaluronique assurant l'hydratation. La possibilité d'existence d'interaction ligand/enzyme pourra également être validée par modélisation moléculaire.

Les résultats obtenus dans ces travaux ont mis en évidence la capacité du **séquençage de novo** des peptides de venin par ESI-QTOF-HRMS afin d'élucider la séquence en acides aminés des peptides retenus comme actifs. Il est nécessaire cependant **d'optimiser l'obtention** (en termes **d'intensité et de charge**) de l'ion précurseur, de son isolement et des paramètres de fragmentation MS/MS afin d'augmenter la capacité d'accéder à un plus grand nombre d'ions fragments afin d'avoir une caractérisation complète des peptides d'intérêt. Nous pouvons dans ce but réduire les **liaisons disulfures** dont la présence au sein de peptide rend la fragmentation plus difficile. Par ailleurs, il est important de prendre en considération le fait que la présence de **modifications post traductionnelles** possibles au sein des peptides et que **les peptides cycliques** peuvent augmenter la complexité dans le séquençage *de novo*.

Les composés identifiés comme actifs pourront alors être **synthétisés en plus grande quantité** compatible avec des tests in-cellulo sur les différentes cibles cosmétiques. Des modifications apportées lors des étapes de synthèse apporteront aux molécules et/ou **peptidomimétiques** d'intérêts des caractéristiques nouvelles tant sur le plan physico-chimique qu'en termes d'activité biologique. Ces nouveaux ingrédients devront également dans le cas d'une perspective d'application topique et pour des raisons de sécurité sanitaire, être contrôlés sur le programme de différenciation et de migration des cellules de kératinocytes et de fibroblastes.

◇◇◇

Table des figures

Figure I.1 : Structure de la peau [3]	12
Figure I.2 : Structure de l'épiderme. Image traduite de référence [4]	12
Figure I.3 : Voie de biosynthèse de mélanine [17]	17
Figure I.4 : La structure de tyrosinase de champignon(PDB ID : 2Y9W) [18] . La partie grise est la sous-unité catalytique et la verte est la sous-unité non catalytique de « lectine-like ». La sphère orange et les liaisons oranges sont la chélation entre trois résidus d'histidine et chaque atome de cuivre, respectivement. La figure est obtenue du site http://www.pymol.org/ par Aleksander Salwiński [19]	18
Figure I.5 : La structure de l'élastase de pancréas porcine (PDB ID : 1GVK). La triade catalytique se forme par trois résidus Sérine 195, Histidine 57, Aspartate 102. La figure est extraite de la référence [33]	25
Figure I.6 : La structure de collagénase de Clostridium histolyticum (PDB ID : 2Y50) [18] . Le site catalytique comprenant 3 résidus d'histidines avec un ion Zn ²⁺ . La figure est extraite de site http://www.rcsb.org/3d-view/2Y50/1	30
Figure I.7 : Les sources endogènes des ROS [56].....	33
Figure I.8 : Exemple de réaction de peroxydation induite par le radical hydroxyle[56]	35
Figure I.9 : Réactions directes de A. vitamine E (TOH) avec ·OH. B. vitamine C (AsCH [·]) avec ROO· C. Régénération de vitamine E par vitamine C [61]	39
Figure I.10 : Classification des insectes (d'après André-Claude Deblock, 2019 [102])	50
Figure I.11 : Distribution de Vespa velutina en France entre 2004 et 2012 (Données INPN 2013) [133]	57
Figure I.12 : Nid de frelon asiatique [135]	58
Figure I.13 : Cycle de la vie de frelon Vespa velutina (Source : INRA, K.Monceau et D.Thiéry).....	59
Figure II.1 : Présentation de deux stratégies (① et ②) sur la recherche de molécules actives issue du venin de frelon brut ou fractionné	72
Figure II.2 : Protocole d'échantillonnage (M1 : par compression, M2 : Récupération du sac entier de venin) et analyse du venin par SDS-PAGE.....	81
Figure II.3 : Profil de SDS-PAGE des venins de V. velutina extraits par les deux protocoles différents (n=2) M1 ou M2 sous la condition réductrice. À – profil expérimental de venin à 10 % de gel. B -profil de venin à 15% de gel. C- Profil de référence obtenu par le protocole M2 du venin à 10 % de gel d'après Liu et al. [5] sous la condition réductrice. D. profil de référence de venin, obtenu par le protocole M2, à 8-18% de gel d'après Longé et al. [24], sous la condition non réductrice. M : marqueur étalon (Prestained Protein Ladder 06P-0111)	83

Figure II.4 : Illustration de la stratégie d'étude ① du venin brut et des fractions protéines ou peptides.....	86
Figure II.5 : Description des différentes étapes constitutives d'une analyse par chromatographie sur couche mince (TLC) (Schéma inspiré de la référence [25]).....	88
Figure II.6 : Mécanisme de la réaction de ninhydrine avec α -acide aminé[31]	92
Figure II.7 : Schéma simplifié d'une chaîne Chromatographique HPLC [41].....	95
Figure II.8 : Exemple de gamme de perméation sélective (gamme de fractionnement) pour les trois colonnes commercialisées Superdex [46].....	98
Figure II.9 : Principe de chromatographie d'exclusion stérique. CV : volume de colonne, V_c : volume total de la colonne de verre vide. V_t : Volume de perméation totale. V_0 : volume interstitiel ou d'exclusion totale. V_i : volume des pores. V_e : volume d'élution (ou de rétention). Schéma adapté à partir de la référence [46].....	99
Figure II.10 : Représentation des différents types de dépôts usuels: (a) goutte séchée (b) en couche mince et (c) en sandwich	105
Figure II.11 : Schéma du procédé d'ionisation MALDI : l'énergie laser absorbée par la matrice provoque une désorption/ionisation des analytes. Image extraite de la référence [25]	105
Figure II.12 : Principe de fonctionnement de l'analyseur TOF en mode linéaire. Image extraite de la référence [25].....	106
Figure II.13 : Principe de fonctionnement de l'analyseur TOF en mode réflecteur. Image extraite de la référence [25].....	107
Figure II.14 : Résultats d'analyse du venin brut Vv et des deux fractions $V_v < 10$ kDa et $V_v > 10$ kDa par chromatographie SDS-PAGE et spectrométrie MALDI-TOF-MS . M : marqueur étalon (Prestained Protein Ladder 06P-0111).....	109
Figure II.15 : Représentation schématique d'une source électronébulisation ou électrospray [57].	112
Figure II.16 : Représentation schématique de l'émission des ions $[M+nH]^{n+}$ en phase gazeuse en ESI d'après (a) Le modèle de Dole et (b) Le modèle d'Iribarne et Thomson [58].	112
Figure II.17 : Schéma du spectromètre de masse Maxis UHR-QTOF utilisé dans le cadre de nos études [25]	115
Figure II.18 : Schéma de stratégie ② dirigée vers la détermination de l'activité de molécules discriminantes	117
Figure II.19 : Résumé des différentes étapes d'itération XCMS (d'après Smith et al. [62]).....	119
Figure II.20 : Stratégie d'immobilisation covalente des enzymes sur bille de silice. Image inspirée de la référence [67].....	122

Figure II.21 : Illustration du principe ENALDI (Enzyme-coupled Nanoparticles-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry)	123
Figure II.22 : Illustration du mode « Ion Hunting » en utilisant la spectrométrie de masse ESI-QTOF-MS.....	124
Figure II.23 : Nomenclature de fragmentation d'un tripeptide d'après Biemann (fragmentation basse énergie)[71].....	126
Figure III.1 : Évaluation de l'activité inhibitrice des venins et ses fractions Vv > 10 kDa et Vv < 10 kDa sur l'élastase, n=4.....	140
Figure III.2 : Évaluation de l'activité inhibitrice des venins et des fractions Vv > 10 kDa et Vv < 10 kDa sur la collagénase extraite de Clostridium histolyticum, n=3. E : Enzyme, S : substrat, I : inhibiteur	142
Figure III.3 : Évaluation de l'activité des venins et des fractions (Vv > 10 kDa et Vv <10 kDa) sur la tyrosinase de champignon (n=3). Gla: Glabridine. Trait rouge : limite de 100%.....	144
Figure III.4 : Mesure de l'activité antioxydante du venin brut Vv et des fractions Vv < 10 kDa et Vv > 10 kDa par la méthode TEAC T, n=3.....	167
Figure III.5 : Mécanisme de réaction dans l'essai de FRAP [61].	168
Figure III.6 : Mesure de l'activité antioxydante du venin brut Vv par le test de la réduction du fer, n=3.....	168
Figure III.7 : Principe de l'essai de SOD	170
Figure III.8 : Mesure de l'activité antioxydante du venin brut Vv et des fractions Vv < 10 kDa et Vv > 10 kDa par le test indirect de l'activité de l'enzyme Superoxyde dismutase (SOD)	170
Figure III.9 : Analyse du venin brut Vv par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) avec détection spectrophotométrique à 280 nm	172
Figure III.10 : Profil protéique des 14 fractions sur SDS-PAGE 15 % et 12% (Vv : venin brut de V. velutina, F'x : Fraction de SEC).....	172
Figure III.11 : Mesure de l'activité antioxydante de la fraction Vv >10 kDa et des fractions F'1 à F'6 par le test indirect de l'activité de l'enzyme Superoxyde dismutase (SOD).....	173
Figure IV.1 : Frelon asiatique volant devant la ruche pour la prédation (par Fabrice REQUIER)[46]	207
Figure IV.2 : Le frelon V. velutina collecté devant ruche et dans le nid [51].....	208
Figure IV.3 : Chromatogramme de l'ensemble des venins collectés pour la comparaison du venin de frelon devant le rucher et dans le nid en 2017 et 2018.....	209
Figure IV.4 : Représentation de PCA et PLSDA dans la comparaison du profil peptidomique du venin de frelon d'ouvrières collectées devant rucher et dans le nid de frelons sur deux années consécutives 2017-2018.....	210

Figure IV.5 : BPC Chromatogrammes de reines, ouvrières, fondatrices pour les ions compris entre 49 et 2250 Da	214
Figure IV.6 : Représentation des PCA et PLS-DA des venins des différences castes : fondatrice, ouvrier et reine.....	215
Figure IV.7 : Profil chromatographique du venin Vv < 10 kDa par HPLC-UV et les 15 sous-fractions collectées à l'absorbance 214 nm.....	221
Figure IV.8 : Principe de l'approche de criblage de ligand / enzyme immobilisée par "Ion Fading" et "Ion Hunting"	226
Figure IV.9 : Résultat de l'approche IF-IH d'un composé en absence d'interaction avec l'élastase dans la sous-fraction F6 du venin V. velutina. Den : MPs-enzyme dénaturée. Act : MPs-enzyme active.....	228
Figure IV.10 : Empreinte de ESI-QTOF-MS de la sous-fraction F11 dans l'approche IF-IH avec l'enzyme élastase active et dénaturée (n= 3). Le symbole cercle ● indique le candidat de produit du substrat. Le symbole triangle ▲ indique le candidat de substrat. Les masses en verte sont l'étalon interne (bradykinine fragment de 1-7). Den : MPs-enzyme dénaturée. Act : MPs-enzyme active. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est fixée à ± 0.01 m/z.....	229
Figure IV.11 : Empreinte de ESI-QTOF-MS de la sous-fraction F12 dans l'approche IF-IH avec l'enzyme élastase active et dénaturée (n= 3). Le symbole cercle ● indique le candidat de produit du substrat. Le symbole triangle ▲ indique le candidat de substrat. Les masses en verte sont l'étalon interne (bradykinine fragment de 1-7). Den : MPs-enzyme dénaturée. Act : MPs-enzyme active. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est fixée à ± 0.01 m/z	231
Figure IV.12 : Résultat de l'approche IF-IH d'un composé présentant une interaction non spécifique avec l'élastase dans la sous-fraction F15 du venin V. velutina. Den : MPs-enzyme dénaturée. Act : MPs-enzyme active	233
Figure IV.13 : Suivi de l'interaction non spécifique sur la bille magnétique MPs-APTES-GLA encapping avec glycine et sans enzyme par l'approche de IF-IH combinée avec ESI-QTOF-HRMS. La précision pour extraire l'EIC de chaque ion est fixée à ± 0.01 m/z, sauf pour l'ion m/z 514.3508 ± 0.1.....	234
Figure IV.14 : Stratégie de séquençage de novo des peptides impliqués dans la thèse.....	237
Figure IV.15 : Séquence obtenue de l'ion m/z 683.9633 [M+2H] ²⁺ par l'analyse de séquençage de novo du logiciel PEAKS	248
Figure IV.16 : Séquence obtenue de l'ion m/z 519.3228 [M+3H] ³⁺ par l'analyse de séquençage de novo du logiciel PEAKS	249
Figure IV.17 : Séquence de l'ion m/z 519.3228 [M+3H] ³⁺ obtenue en traçant manuellement à Compass DataAnalysis (Bruker). Ligne verte : la séquence tracée manuellement. Ligne	

noire : la séquence tracée manuellement suite aux séries d'ions. Ligne bleue : La séquence proposée par PEAKS	250
Figure IV.18 : Séquence obtenue de l'ion m/z 462.6129 [M+3H] ³⁺ par l'analyse de séquençage de novo du logiciel PEAKS	252
Figure IV.19 : Séquence de l'ion m/z 462.6129 [M+3H] ³⁺ obtenue en traçant manuellement à Compass DataAnalysis (Bruker). Ligne verte : la séquence tracée manuellement. Ligne bleue : La séquence proposée par PEAKS	253
Figure IV.20 : Séquence obtenue de l'ion m/z 449.2492 [M+3H] ³⁺ par l'analyse de séquençage de novo du logiciel PEAKS	254
Figure IV.21 : Séquence de l'ion m/z 449.2492 [M+3H] ³⁺ obtenue en traçant manuellement à Compass DataAnalysis (Bruker). Ligne verte : la séquence tracée manuellement suite aux séries d'ions y. Ligne noire : la séquence tracée manuellement suite aux séries d'ions b	255

Table des tableaux

Tableau I.1 : Liste d'exemples de composés utilisés pour traitement d'hyperpigmentation approuvé par le Ministère de la Santé, du Travail et des Affaires sociales (MHLW) du Japon.....	21
Tableau I.2 : Exemples des inhibiteurs de l'élastase.....	27
Tableau I.3 : Exemples des molécules inhibitrices de l'enzyme collagénase	31
Tableau I.4: Exemples des piègeurs enzymatiques de radicaux libres. Tableau extrait et traduit de la référence[60]	36
Tableau I.5 : Exemples des molécules antioxydantes dans la cosmétique	37
Tableau I.6 : Exemples des peptides cosméceutiques.....	45
Tableau I.7 : Propriétés pharmacologiques des constituants du venin d'abeille[109]	52
Tableau I.8 : Principaux composés actifs identifiés dans le venin d'abeille et de guêpe[111]	53
Tableau I.9: Familles de toxines détectées dans <i>Vespa velutina</i> [135]	60
Tableau II.1 Méthodes de collecte de venin à partir des insectes de l'ordre des Hyménoptères	75
Tableau II.2 : Avantages et inconvénients des Conditions de conservation des échantillons contenant des protéines et peptides [16]	76
Tableau II.3 : Techniques de séparations des protéines et peptides	80
Tableau II.4 : Type de phases stationnaires et de chromatographies associées les plus utilisées en TLC (figure extraite de la référence [25]	88
Tableau II.5 : Exemples des systèmes de migration de TLC dans l'étude des acides aminés et peptides	93
Tableau II.6 : Exemples des séparations du venin par HPLC-UV-MS.....	96
Tableau II.7 : Exemple d'étude de venin par chromatographie d'exclusion stérique.....	101
Tableau II.8 : Exemples de matrices organiques utilisées pour les analyses MALDI avec les longueurs d'onde d'absorption, la masse moléculaire et les applications associées. Tableau extrait de la référence [25] :.....	104
Tableau II.9 : Protocole optimisé pour l'analyse du venin <i>V. velutina</i> par MALDI-TOF.....	108
Tableau II.10 : Avantages et désavantages de la technique ESI	113
Tableau II.11 : Tableau comparatif des performances de différents analyseurs[59].....	113
Tableau III.1 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) du venin et sa fraction Vv < 10 kDa sur <i>C. acnes</i> et le champignon de <i>M. furfur</i>	176
Tableau III. 2 : Activité inhibitrice sur <i>C. acnes</i> des fractions F'2 à F'6 issus du venin brut.....	177
Tableau IV-1 : Les couleurs dans chaque ligne représentent le groupe ayant la valeur surexprimée par rapport à l'autre groupe. Pour les conditions « Dans le nid » en orange et en vert	

« Devant rucher ». Pour les boîtes à moustache, les couleurs seront : ■ Dans le nid, ■ Devant rucher.....	211
Tableau IV-2 : Liste des ions discriminants (VIP>1, p-value <0.05) de la comparaison des venins des différentes castes. F : fondatrice, O : Ouvrière, R : Reine. Le symbole « = » décrit l'expression égale de deux valeurs normalisées. Les couleurs dans chaque ligne montrent la caste ayant la valeur la plus intense par rapport à deux autres castes. Avec les couleurs respectives pour chaque caste Fondatrice, Ouvrière, Reine. Pour les boîtes à moustache, les couleurs sont : ■ Fondatrice, ■ Ouvrière, ■ Reine.....	217
Tableau IV-3 : Gradient HPLC utilisé pour la collecte des sous-fractions du venin < 10 kDa	221
Tableau IV-4 : Méthode d'analyse des sous-fractions du venin Vv < 10 kDa -Paramètres de ESI-QTOF-MS.....	222
Tableau IV-5 : Listes des masses observées dans chaque sous-fraction de HPLC-UV et décrites ou non comme des molécules potentiellement discriminantes dans la partie 1 de ce chapitre (écrite en rouge dans le tableau).....	223
Tableau IV-6 : Séquençage de novo de BSA digéré par logiciel de PEAKS et Biotoools. Dans la séquence de peptide, la lettre en couleur: Noir et gras - bonne séquence, Orange - bonne identification sans bon ordre, Gris - fausse identification. ALC : average local confidence. - : non-détection.....	240
Tableau IV-7 : Critères appliqués sur l'interprétation et identification des séquences peptidiques du venin de frelon asiatique.....	243
Tableau IV-8 : Séquençage des peptides discriminants et potentiels pour ligands enzymatiques dans le venin V. velutina par logiciel de PEAKS et Biotoools. La masse grasse : ligand des enzymes immobilisées. Cellules grises : peptides ne sont pas dans la liste de composés discriminants. ALC% : average local confidence. Dans la séquence de peptide, la lettre en couleur : Noir et gras - bonne séquence et Gris - acide aminé absents. Le score de confiance individuelle calculée par PEAKS et Biotoools pour chaque acide aminé définit les acides aminés en couleur : Rouge - niveau de fiabilité supérieur de 80%, Bleu - niveau de fiabilité entre 50-80%. Noir - niveau de fiabilité inférieur de 50% . - : non-détection.	245
Tableau IV-9 : Molécules discriminantes du venin de frelon selon la nature du « sourcing » et de l'activité vis-à-vis de l'élastase. Les lettres dans les colonnes de variation de venin représentent le groupe ayant le contenu du peptide le plus intense pour chaque comparaison. [S] : Substrat.	257

Annexe

ANNEXE 1 : Protocoles

1. Approche SDS-PAGE

Tableau A.1. Protocole de l'électrophorèse en gels SDS-PAGE

	Gel de concentration (4%)	Gel de séparation (12%)		
		10 %	13 %	15 %
40% bisacrylamide (µL)	200	800	1040	1200
H2O (µL)	1630	1533	1295	1133
Tris 1.5 M, pH 8.8 (µL)		800	800	800
Tris 2 M, pH 6.8 (µL)	125			
SDS 10% (µL)	20	32	32	32
APS (Persulfate d'ammonium) 10% (µL)	20	32	32	32
TEMED (µL)	3	3.2	3.2	3.2
Préparation du gel		<ul style="list-style-type: none"> • Assembler deux plaques en verre de l'appareil électrophorèse selon le manuel de fabricant • Préparer le gel de séparation et ajouter rapidement 3 mL dans l'espace entre deux plaques en verre. • Remplir le top de gel avec isopropanol et laisser à polymériser pendant 15-30 min à la température d'ambiance. • Vider l'isopropanol. • Préparer le gel de concentration et remplir l'espace entre deux plaques par cette solution. • Insérer un peigne de 10 ou 15 puits dans la couche de gel de concentration. • Laisser à polymériser pendant 15-30 min 		
Préparation l'échantillon	de	<ul style="list-style-type: none"> • Préparer la solution 1x Laemmli + l'échantillon. • Chauffer la solution à 95°C pendant 5 min et centrifuger rapidement pendant 5 min. 		
Migration Coloration	et	<ul style="list-style-type: none"> • Enlever le peigne du gel et ajouter l'échantillon (10 µL/puit pour gel de 15 puits et 20 µL/puit pour gel de 10 puits) • Migrer les gels dans le tampon de migration : 250 V, 25 mA/gel, 50 W • Après migration, le gel est coloré avec le Bleu Coomassie pendant 30-60 min • Rincer le gel avec l'eau et décoloration dans le micro-ondes. 		

2. Méthode de mesure de la concentration de protéine Bradford**Tableau A.2.** *Protocole de test de Bradford pour le dosage de protéine.*

Echantillons	Prise d'essai de venin brut préparée à plusieurs dilutions
Droite d'étalonnage	BSA préparé à 7 concentrations : 0-0.05-0.1-0.2-0.3-0.4-0.5 (µg/mL)
Protocoles	Ajout de 10 µL de l'échantillon/standards avec 200 µL de réactif bio-rad 1X Agitation et incubation 5 min à la température d'ambiance et mesure d'absorbance à 595 nm

3. Activité d'élastase in-tubo

Tableau A.3. Protocole pour mesurer l'activité d'élastase in-tubo (kit d'Enzchek Elastase Assay E-12056, Molecular Probe (ThermoFisher, Les Ulis, France))

Matériels	<ul style="list-style-type: none"> • Tampon de réaction 1X : 0.1M Tris HCl, pH 8.0, 0.2 mM sodium azide. • L'échantillon est préparé dans le tampon de réaction aux concentrations testées. Le tampon est utilisé pour dilution.
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µL de l'échantillon/standard d'inhibiteur est ajouté avec 50 µL du substrat élastine DQ 100 µg/mL et 100 µL de l'élastase 0.5 U/mL dans le puit de la plaque 96 puis. – • Pour le standard d'inhibiteur et contrôle, N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone à 0.04 mM ou le tampon a été remplacé des échantillons. • La concentration démontrée dans le graphique est la concentration finale des molécules dans la solution • Incuber la plaque à T° ambiante, en noir pendant 2 heures. • Mesurer la fluorescence à 490 nm-535 nm au spectrophotomètre Victor (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
Résultat	<p>% activité d'élastase = $(Abs_{\text{échantillon}} - Abs_{\text{sans enzyme}}) / (Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{sans enzyme}}) * 100\%$</p> <p>Avec:</p> <p>$Abs_{\text{échantillon}}$: absorbance du mélange : Echantillon + Elastine + Elastase</p> <p>$Abs_{\text{sans enzyme}}$: absorbance du mélange : Tampon + Elastine</p> <p>$Abs_{\text{contrôle}}$: absorbance du mélange : Tampon + Elastine + Elastase</p>
Remarques	<p>Pour évaluation de l'activité des venins sur élastase, le protocole reste pareil sauf dans les puits de l'échantillon, l'élastase est remplacée par le tampon.</p> <p>Les manipulations sont faites en triplicata et en 3 jours.</p>

4. Activité de collagénase in-tubo

Tableau A.4. Protocole pour mesure l'activité de collagénase in-tubo (kit d'Enzchek Collagenase/Gelatinase Assay kit E-12055, Molecular Probe (Thermofisher, Les Ulis, France))

Matériels	<ul style="list-style-type: none"> • Tampon de réaction 1X : 0.05M Tris HCl, 150 mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH7.6 0.2 mM sodium azide. • L'échantillon est préparé dans le tampon de réaction aux concentrations testées. Le tampon est utilisé pour dilution.
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> • 80 µL de l'échantillon/standard d'inhibiteur est ajouté avec 20 µL du substrat gélatine DQ 180 µg/mL et 120 µL de la collagénase 0.4 U/mL dans le puit de la plaque 96 puis. – • Pour le standard d'inhibiteur et contrôle, 1,10-Phenanthroline à 0.25 mM ou le tampon a été remplacé des échantillons. • `La concentration démontrée dans le graphique est la concentration finale des molécules dans la solution. • Incuber la plaque à T° ambiante, en noir pendant 2 heures. • Mesurer la fluorescence à 490 nm-535 nm au spectrophotomètre Victor (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
Résultat	<p>% activité de collagénase= $(Abs_{\text{échantillon}} - Abs_{\text{sans enzyme}}) / (Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{sans enzyme}}) * 100\%$</p> <p>Avec:</p> <p>Abs_{échantillon} : absorbance du mélange : échantillon + Collagénase + Gélatine</p> <p>Abs_{sans enzyme} : absorbance du mélange : Tampon + Gélatine</p> <p>Abs_{contrôle}: absorbance du mélange : Tampon + Collagénase + Gélatine</p>
Remarques	<p>Pour évaluation de l'activité des venins sur collagénase, le protocole reste pareil sauf dans les puits de l'échantillon, la collagénase est remplacée par le tampon.</p> <p>Les manipulations sont faites en triplicata et en 3 jours.</p>

5. Activité de tyrosinase de champignon in-tubo

Tableau A.5. Protocole de mesure de l'activité de tyrosinase de champignon in-tubo (selon le protocole de Sang Mi Han [1])

Standard	<ul style="list-style-type: none"> • La glabridine à 10 µM
Echantillon	<ul style="list-style-type: none"> • L'échantillon est préparé dans le tampon phosphate PHB (10 mM, pH 6.8) aux concentrations testées. Pour le contrôle, le tampon est remplacé par l'échantillon.
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> • 40 µL de la solution de tyrosinase de champignon <i>Agaricus bisporus</i> 125 U (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) diluée dans le tampon PHB est mélangée avec 40 µL de l'échantillon. • Incubation de la plaque à T° ambiante dans 5 min • Ajouter 120 µL de la solution L-DOPA 8.3 mM dans PHB • Agiter et incuber de la plaque en noir, à 37°C pendant 30 min • Mesurer l'absorbance à 490 nm au spectrophotomètre Thermo scientific Multiskan GO UV/Vis microplate
Résultat	<p>% activité de tyrosinase = $(Abs_{\text{échantillon}} - Abs_{\text{sans enzyme}}) / (Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{sans enzyme}}) * 100\%$</p> <p>Avec:</p> <p>$Abs_{\text{échantillon}}$: absorbance du mélange : Echantillon + L-DOPA + Tyrosinase</p> <p>$Abs_{\text{sans enzyme}}$: absorbance du mélange : Tampon + L-DOPA</p> <p>$Abs_{\text{contrôle}}$: absorbance du mélange : Tampon + L-DOPA + Tyrosinase</p>

6. Essai antioxydant de TEAC

Tableau A.6. Protocole de l'essai de TEAC (Antioxydant assay kit SigmaAldrich (CS0790))

Standard	Trolox est préparé en 6 dilutions (0-0.42 mM)
Echantillon	L'échantillon est préparé dans l'eau
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µL des échantillons/standards + 20 µL de solution myoglobine + 150 µL de substrat ABTS. • Agitation et incubation de la plaque pendant 5 min à température ambiante • Ajout de 100 µL de la solution de stop (Catalog Number S3446, Sigmaaldrich) • Mesure d'absorbance à 405 nm
Résultat	<p>$TEAC = (Abs_{\text{échantillon}} - \text{interception}) / \text{pente}$</p> <p>Interception, pente sont valeurs obtenues à partir de droite d'étalonnage de Trolox</p> <p>$Abs_{\text{échantillon}}$: Absorbance du mélange: échantillon + myoglobine + substrat ABTS</p>

7. Essai antioxydant de FRAP (pouvoir antioxydant réducteur des ions ferriques)

Tableau A.7. Protocole de l'essai de FRAP (selon celui de Dildar Ahmed avec la modification pour la plaque 96 puits [2])

Standard	Sulfate de fer (II) est préparé en 8 dilutions (1.95-125 µM)
Echantillon	Echantillon est préparé dans l'eau
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> • Mélange des solutions au ratio de 1 :1 :10 (TPTZ 10mM dans HCl 40 mM :FeCl₃ 20 mM :tampon d'acétate sodium 300mM, pH 3.6) • Chauffe de mélange jusqu'à 37°C • Ajoute de 100 µL des échantillons/standards avec 100 µL de mélange préparé • Incubation à 37°C, en noir, pendant 10 min et mesure d'absorbance à 595 nm

Résultat	Equivalent de ferrous : $FE = (Abs_{\text{échantillons}} - \text{interception}) / \text{pente}$ Interception, pente sont valeurs obtenues à partir de droite d'étalonnage de sulfate de fer (II)
-----------------	---

8. Essai antioxydant de SOD (Superoxyde dismutase)

Tableau A.8. Protocole de l'essai de SOD (protocole utilisé est de kit SOD Assay, 19160, Sigma-Aldrich)

Echantillon	L'échantillon est préparé dans l'eau
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> • 20 µL des échantillons/standards est mélangé avec 200 µL de solution de travail WST et 20 µL de solution de travail d'enzyme • Agitation et incubation de la plaque à 37°C pendant 20 min • Mesure d'absorbance à 450 nm

Résultat	$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{(Abs_{\text{Contrôle}} - Abs_{\text{blanc1}}) - (Abs_{\text{échantillon}} - Abs_{\text{blanc2}})}{(Abs_{\text{Contrôle}} - Abs_{\text{blanc1}})} \times 100\%$ <p>$Abs_{\text{échantillon}}$: absorbance du mélange : Echantillon + WST + Enzyme</p> <p>$Abs_{\text{contrôle}}$: absorbance du mélange : Eau+ WST + Enzyme</p> <p>Abs_{blanc1} : absorbance du mélange : Eau+ WST</p> <p>Abs_{blanc2} : absorbance du mélange : Echantillon+ WST</p>
-----------------	--

Références :

- [1] S. Mi Han, J. Min Kim, and S. Cheon Pak, "Anti-melanogenic properties of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom in α -MSH-stimulated B16F1 cells," *Food Agric Immunol*, vol. 26, pp. 451–462, Jul. 2014, doi: 10.1080/09540105.2014.950202.
- [2] D. Ahmed, M. M. Khan, and R. Saeed, "Comparative Analysis of Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant and Antibacterial Potential of Methanolic, Hexanic and Aqueous Extracts from *Adiantum caudatum* Leaves," *Antioxidants (Basel)*, vol. 4, no. 2, pp. 394–409, Jun. 2015, doi: 10.3390/antiox4020394.

ANNEXE 2 : Figures et Tableaux supplémentaires

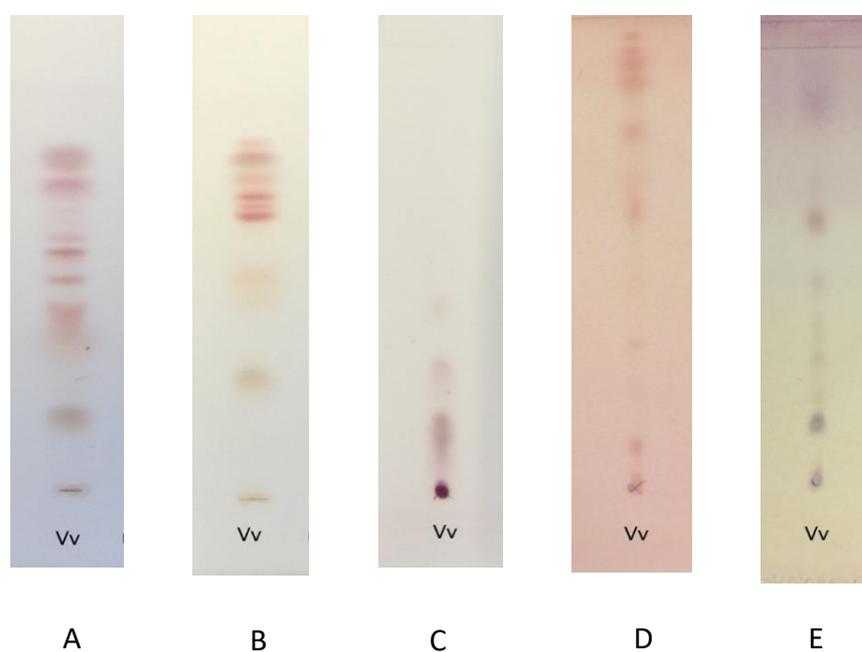


Figure A1. Screening of elution solvent system for *Vespa velutina* venom (Vv) separation on TLC plate. Silica gel 60 plate: (A) 1-butanol: acetic acid: water = 4:1:2 (B) 1-butanol: acetic acid: water = 4:1.5:3 (C) Acetonitrile: methanol: water = 5:1:1 (D) Chloroform: methanol: ammoniac 35% = 2:2:1. RP-18 W plate: (E) Methanol: water = 7:3

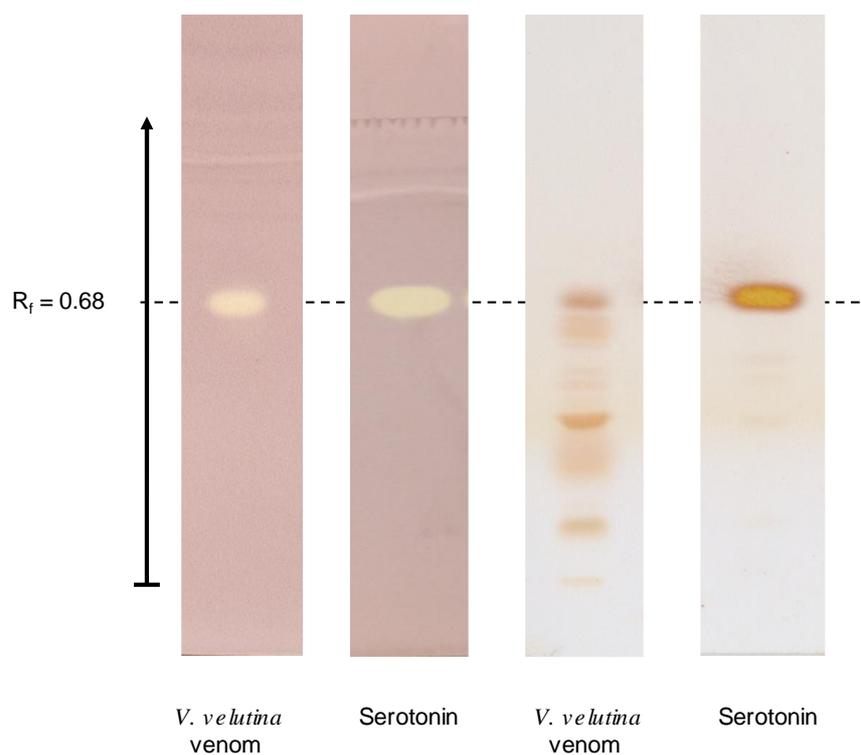


Figure A2. TLC profile of crude venom (Vv) and serotonin on TLC silica gel 60 plate (Merck) by reagent: (1) DPPH/methanol (2) Ninhydrin/ethanol. The elution solvent was 1-butanol : acetic acid : water = 4:1:2 for 90 min.

Tableau A.1. Parameter settings for XCMS processing

	Parameter	Value
Peak detection	Method	CentWave
	ppm	(in optimization)
	Peakwidth (second)	5,12
	Filter on Retention time	60,720
	Filter on Mz	100,3000
	snthresh	10
	prefilter (k,l)	3,1000
	mzCenterFun	intensity weighted mean of the peak's <i>m/z</i> values
	integrate	peak limits are found through descent on the mexican hat filtered data (more robust, but less exact)
	fitgauss	False
	mzdiff	0.003
	noise	500
	Peak grouping 1	Method
bandwidth		(in optimization)
minFraction		0.5
minSamples		1
binsize		(in optimization)
maxFeatures		50
Retention time correction	Method	PeakGroups - retention time correction based on alignment of features (peak groups) present in most/all samples.
	minFraction	0.4
	extraPeaks	1
	smooth	loess
	span	0.5
	family	gaussian
Peak grouping 2	Method	PeakDensity - peak grouping based on time dimension peak densities
	bandwidth	10
	minFraction	0.5
	minSamples	1
	binsize	Same value as peak grouping 1
	maxFeatures	50

Tableau A.2. Condition and results of optimization of the threshold for elimination of interfering peaks from blank. In the column Code, 1, 2, 3, 4 correspond to four levels of B/S (0.1, 0.25, 0.5, 0.75), -, + correspond to two level of Peak intensity (1000, 10000), 0: center point

N°	Code	B/S	Peak intensity	Reliable peaks ($R^2 > 0.9$)	Unreliable peaks ($R^2 < 0.1$)	Reliability index	Number of extracted peaks
1	3-	0.5	1000	562	94	3360.042553	946
2	1+	0.1	10000	206	39	1088.102564	323
3	4+	0.75	10000	303	61	1505.065574	491
4	2-	0.25	1000	492	74	3271.135135	809
5	1-	0.1	1000	462	62	3442.645161	732
6	00	0.425	5500	357	70	1820.7	606
7	4-	0.75	1000	620	110	3494.545455	1049
8	3+	0.5	10000	256	54	1213.62963	425
9	2+	0.25	10000	218	44	1080.090909	356

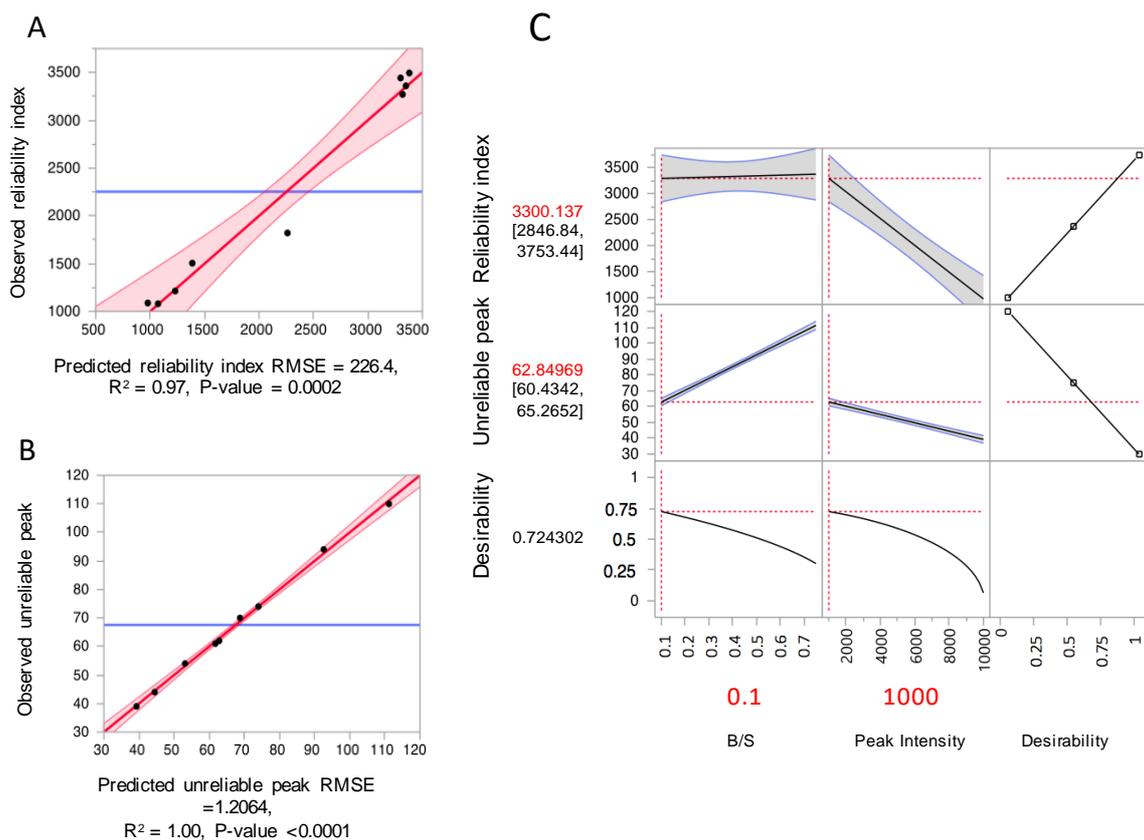


Figure A3. Optimization of elimination blank by JMP software. (a) Reliability index. (b) Unreliable peak. Black dot: the response value for each condition, red zone: 95% confidence interval for mean values, red line: relationship between the actual and predicted value, RMSE: root mean square error. (c) Prediction profiler of optimization of the threshold for blank by JMP software. Grey zone: 95% confidence interval for mean values

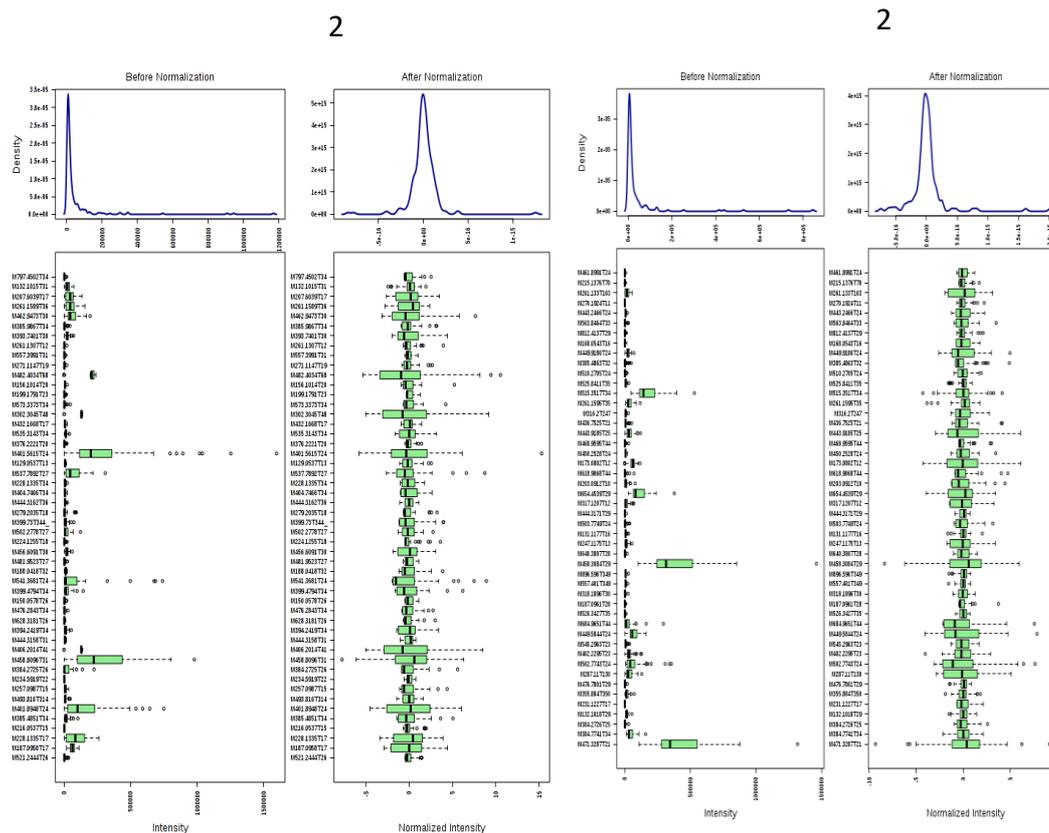


Figure A4. Data distribution (summer-winter) after normalization and scaling. (a) 2017, (b) 2018

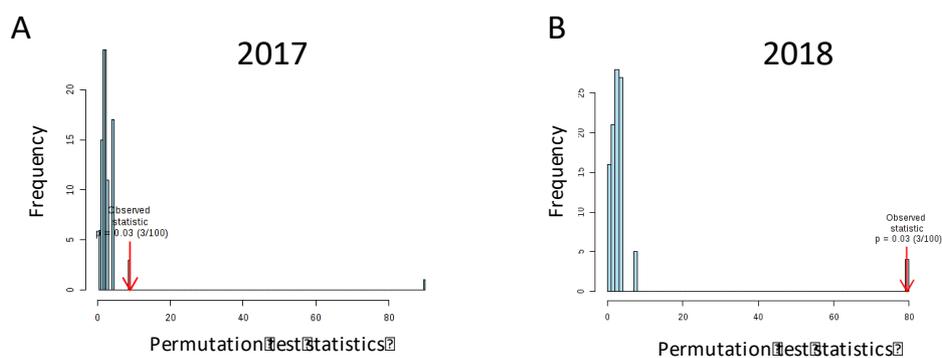


Figure A5. Permutation test in PLS-DA with database (summer-winter) by MetaboAnalyst 4.0. (a) 2017, (b) 2018. Red bar indicates the original classification

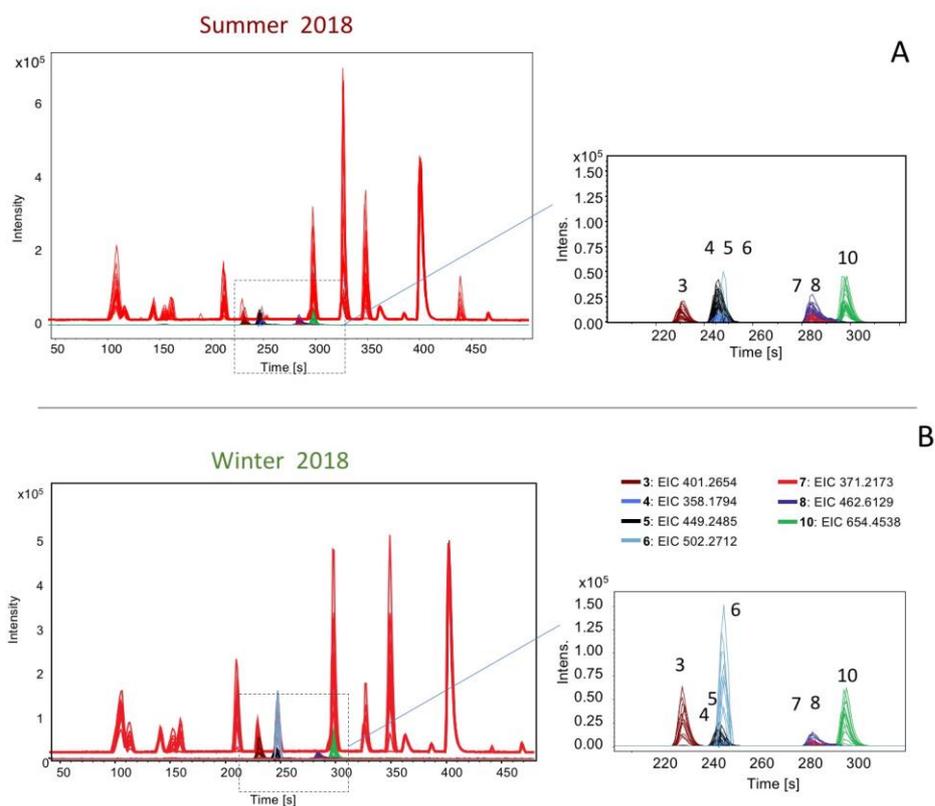


Figure A6. LC-MS chromatography of Asian hornet venom show the base peak chromatograms (red line) with extracted ion chromatograms (EIC) of common discriminating ions (colorful lines) (a) in summer in 2018, (b) in winter in 2018. Brown line is EIC of m/z 401.2645, $RT=231$ s; blue line is EIC of m/z 358.1794, $RT=246$ s; black line is EIC of m/z 449.2485, $RT=246$ s; turquoise line is EIC of m/z 502.2712, $RT=248$ s; red line is EIC of m/z 371.2173, $RT=284$ s; purple line is EIC of m/z 462.6129, $RT=248$; green line is EIC of m/z 654.4508, $RT=298$ s



Figure A7. Frelons et les réservoirs de venin collectés de de 2018.

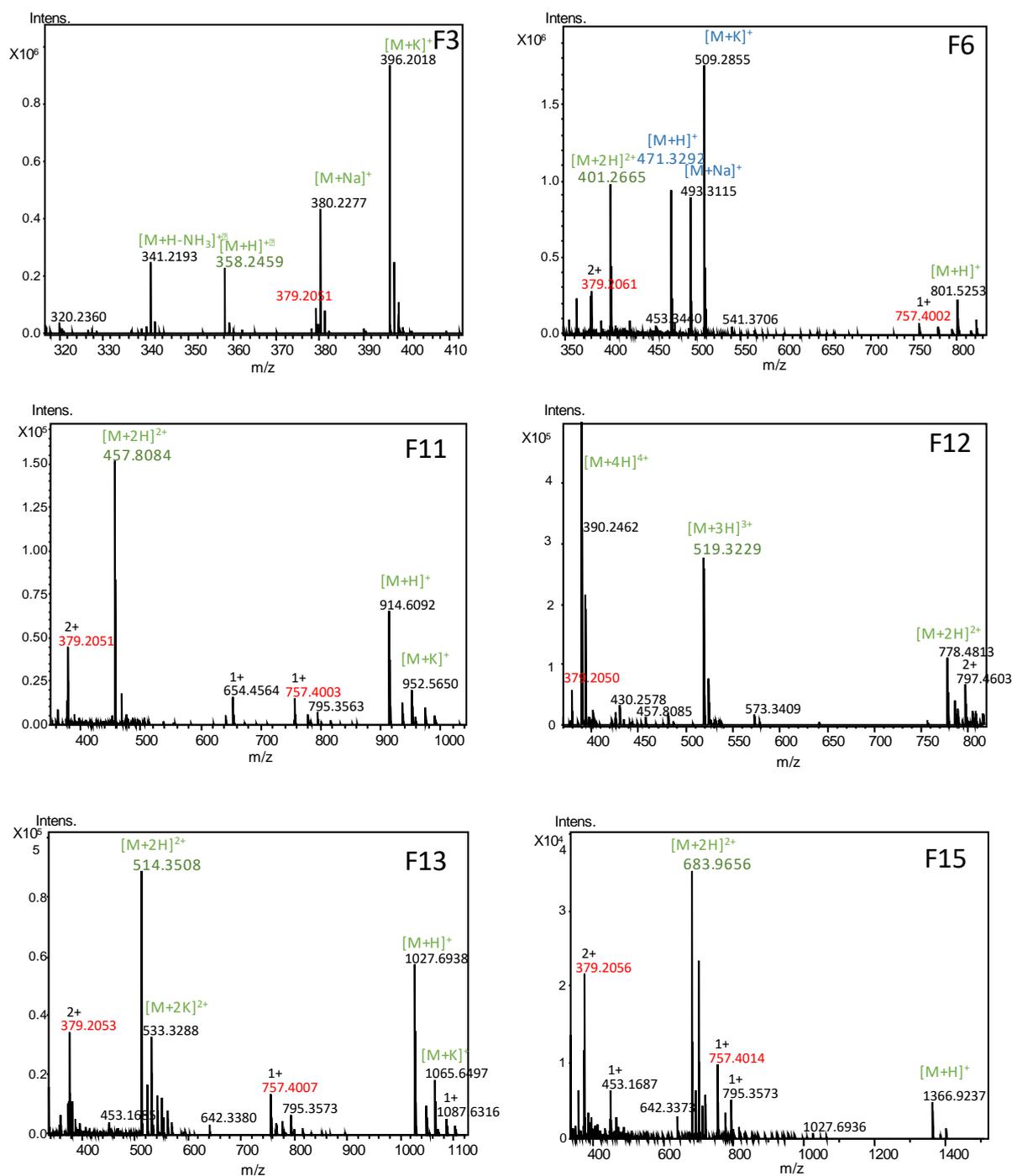


Figure A8. Profils massiques des sous-fractions obtenues par ESI-QTOF-MS. Les ions repérés de couleur *verte/bleue* sont de potentielles molécules d'intérêt mises en avant lors du criblage d'activité en IH et IF. En *rouge*, les ions moléculaires de la bradykinine (fragment 1-7) à m/z 379.2056 $[M+2H]^{2+}$ et m/z 757.4014 $[M+H]^+$ (étalon interne).

Thao Nhi LE

Le frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) : Stratégies d'études sur l'identification de nouvelles molécules actives pour la dermacosmétique.

Résumé

La recherche de nouveaux composés pour prévenir ou atténuer le vieillissement de la peau est une priorité des recherches actuelles dans les cosmétiques. Dans ce contexte, le venin de frelon asiatique (*Vespa velutina nigrithorax*) a été étudiée comme une source particulière de molécules potentiellement bioactives d'intérêt dermacosmétique.

La première étude a tout d'abord porté sur la mise en œuvre d'un protocole fiable d'extraction et récupération du venin. Puis, la fraction peptidique et petites molécules a été sélectionnée afin d'évaluer, en comparaison avec le venin brut, la présence de molécules actives vis-à-vis d'une activité antioxydante, anti-microbienne (*C. acnes*) et inhibitrice enzymatique (tyrosinase, élastase, collagénase) in-tubo et in-cellulo. Ces études ont conduit à identifier par UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS, dans le venin brut, une molécule responsable de l'activité anti-oxydante sur kératinocytes HaCaT.

Dans une seconde étude, une approche peptidomique basée sur une méthode UHPLC-QTOF-HRMS et MS/MS suivie par un traitement statistique (PCA, PLS-DA) a été appliquée sur l'étude différentielle de profil peptidique du venin, en fonction de la période de collecte, des castes et du comportement. Ces derniers ont pour but d'évaluer l'influence de différents facteurs sur le patrimoine moléculaire de ces venins.

Parallèlement, en troisième étude, une approche de criblage d'interaction Ligand/enzyme par spectrométrie de masse sur les enzymes élastase et tyrosinase immobilisées a été développée. Cette méthode a pour objectif de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs ou de substrats dans des fractions plus ou moins complexes. Deux peptides présents dans le venin de frelon ont été montrés d'être capable d'interagir avec l'enzyme élastase en tant que substrat. La séquence peptidique de ces peptides a été partiellement obtenue par séquençage *de novo*.

Mots clés : venin, interaction ligand/enzyme, enzymes immobilisées, PLSDA/PCA, séquençage *de novo*, TLC-DPPH, UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS.

The Asian Hornet (*Vespa velutina nigrithorax*): Strategies for studies on the identification of new active molecules for dermacosmetics.

Abstract

The search for new compounds to prevent or attenuate skin aging is a priority in current research in cosmetics. In this context, Asian Hornet venom (*Vespa velutina nigrithorax*) has been studied as a particular source of potentially bioactive molecules for dermacosmetic interest.

The first study focused on the implementation of a reliable venom extraction and sampling protocol. Then, the peptide - small molecules fraction was selected to evaluate, in comparison with crude venom, the presence of active molecules with respect to antioxidant, anti-microbial (*C. acnes*) and enzyme inhibition (tyrosinase, elastase, collagenase) activity in-tubo and in-cellulo. These studies led to the identification in crude venom, by UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS, of one molecule responsible for antioxidant activity on HaCaT keratinocytes.

In a second study, a peptidomic approach based on UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS followed by statistical processing (PCA, PLS-DA) was applied to the differential study of venom, according to the collection period, castes and behavior. The latter aim to evaluate the influence of these different factors on the venom molecular heritage.

At the same time, in a third study, a ligand/enzyme interaction screening approach by mass spectrometry on solid-supported elastase enzymes was developed. The aim of this method is to detect the presence of inhibitors or substrates in more or less complex fractions. Two hornet venom peptides presenting in the hornet venom were identified to be capable to interact with the enzyme elastase. Their peptide sequences were then partially obtained by *de novo* sequencing.

Keywords: venom, Ligand/enzyme interaction, enzyme immobilization, PLSDA/PCA, *de novo* sequencing, TLC-DPPH, UHPLC-ESI-QTOF-HRMS/MS.



Institut de Chimie Organique et Analytique

Université d'Orléans, CNRS UMP 7311,
BP 6759 45067 Orléans Cedex 2, France



Made in
Chimex

