

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Appliquée

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Bioinformatique*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Evaluation *in silico* de l'inhibition de la tyrosinase par les  
molécules bioactives des plantes**

---

Présenté par : CHELLIL Djoumana  
LFRADA Cheima

Le 27/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : BELLIL Ines (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).  
Examineur 1 : GHERBOUDJ Amira (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).  
Examineur 2 : BENCHIHEUB Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire  
2021 - 2022

# Remerciment

*Avant tout, nous remercions Allah qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans de bonnes conditions.*

*Nous exprimons notre plus profonde gratitude et remerciement le plus sincère à notre encadreur Dr Ines Bellil de l'Université Frères Mentouri Constantine 1 pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et surtout sa confiance et sa persévérance dans le suivi de ce travail.*

*Nous adressons notre profonde gratitude aux examinateurs de notre travail pour avoir accepté d'examiner ce travail en nous faisant l'honneur de juger et d'évaluer ce mémoire.*

*Enfin nous tenons à remercier toute personne qui de près ou de loin nous a soutenues pour mener à terme notre travail.*

# Dédicace

*Merci ALLAH de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire « ya Rahim ».*

*Je dédie ce travail*

*♥A Mon père Mourad, pour tout sa sacrifice, s'amour, sa tendresse, sa soutien et sa prière tout au long de mes études.*

*♥A ma mère Samira que dieu ait pitié d'elle; j'espère que vous êtes heureuse et fière de moi que j'ai réalisé ses vœux.*

*♥A ceux qui m'ont dit un mot gentil dans un moment difficile, je demande à Dieu de vous donner tout ce que vous souhaitez.*

*♥A toute ma famille surtout ma grand-mère Dawya .*

*♥A mes fidèles amies pour leurs amours et leurs encouragements.*

*♥A mon chere oncle Badis pour son soutien moral et son encouragement.*

*♥A mon binôme Cheima qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin*

*Djoumana*

# Dédicace

*Grace a la volonté divine d'Allah notre dieu tout puissant et bien veillant qui a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce modeste travail, que je dédié !*

*A mes très chers parents : Ibrahim et Zahra*

*Pour les encouragements, sacrifices, tendresse, amour et soutien durant mes études, je souhaite que j'ai réalisé l'un de vos rêves par ce modeste travail. Puise Dieu vous accorder longue vie pleine de santé et de bonheur.*

*A mes chers frères : Nasro*

*A mes chères sœurs : Djouhaina , Madjda et Kawter*

*A ma binôme et chère amie : Chelli Djoumana*

*A mes chèreS amies : khawla , chaima , rania*

*A mes cousines : Siham, khadija*

*A ma tante : Djamaa*

*A ma cousine : Amel*

*A tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université*

*A toute personne ayant contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail*

*A tous mes collègues de la promotion de Master II Biochimie appliquée je leur souhaite beaucoup de réussite.*

*Chaima*

**Liste des abréviations :**

**Å** : Angström.

**L-DOPA** : L-3, 4 Dihydroxyphénylalanine.

**PDB** : Protein Data Bank (banque de donnée protéique).

**PUBCHEM** : PubChem est la plus grande collection au monde d'informations chimiques librement accessibles.

**R** : Coefficient de corrélation linéaire.

**RMSD** : Root Mean Square Deviation.

**RMSF** : Les valeurs moyennes de fluctuation.

**Rg** : Rayon de giration.

**TYR** : Tyrosinase.



<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>La mélanogénèse</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Description structurale et fonctionnelle de la tyrosinase</b>	<b>3</b>
3.1	Le site actif	4
3.2	Rôle physiologique de tyrosinase	5
<b>4</b>	<b>Les inhibiteurs de la tyrosinase</b>	<b>6</b>
4.1	Les inhibiteurs naturels	6
4.1.1	L'hydroquinone <sup>15</sup>	6
4.1.2	Acide kojique	6
4.1.3	Arbutine	7
4.1.4	Flavonoïdes	7
4.2	Inhibiteurs synthétiques	8
4.2.1	4-n-butylrésorcinol/Rucinol®	8
4.2.2	Tropolone	8
4.2.3	N- phenylethiourée	9
4.2.4	Acide azélaïque	9
<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Le Docking Moléculaire</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Présentation de la méthode du docking moléculaire</b>	<b>12</b>
3.1	Principes	12
<b>4</b>	<b>Les outils du docking moléculaire</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>Les Types de docking moléculaire</b>	<b>14</b>
<b>6</b>	<b>Les programmes</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>Matériels</b>	<b>17</b>
1.1	Logiciels	17
1.2	Banques de données	17
<b>2</b>	<b>Méthodes</b>	<b>17</b>
2.1	Préparation de la protéine	17
2.2	Préparation des ligands	17
2.2.1	Les ligands utilisés dans ce travail	17

2.3	Doking moléculaire .....	18
2.4	Simulation de dynamique moléculaire (DM) .....	19
<b>1</b>	<b>Doking moléculaire .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Analyse de trajectoire de simulation MD .....</b>	<b>21</b>
2.1	Écart quadratique moyenRMSD.....	22
2.2	Rayon de giration.....	22
2.3	Surface accessible aux solvants .....	23
2.4	Fluctuation quadratique moyenne .....	24



## *Liste des figures :*

Figure 1: Biosynthèse des mélanines .....	3
Figure 2: Structure de la tyrosinase.....	5
Figure 3: Structures de l'hydroquinone.....	6
Figure 4: Structure de l'acide kojique.....	7
Figure 5: Structures d'arbutine.....	7
Figure 7: Structure du 4-n-butylrésorcinol.....	8
Figure 6: Structures de quelques flavonoïdes inhibant la tyrosinase : la Kaempferol et Morin.	8
Figure 8: Structure de la Tropolone .....	9
Figure 9: Structure du N- phenylethiourée.....	9
Figure 10: Structure de l'acide azélaïque.....	9
Figure 11: Procédures générales pour l'amarrage moléculaire [5].....	12
Figure 12: Position d'amarrage et interactions de la tyrosinase avec quatre ligands : (a) l'isorhamnétine, (b) le kaempférol, (c) la myricétine et (d) la quercétine.....	20
Figure 13: Résultats de la dynamique moléculaire (100 ns) de quatre complexes.....	23

***Liste des tableaux :***

Tableau 1: Principaux programmes de docking moléculaire<sup>34</sup> ..... 16

# Introduction générale

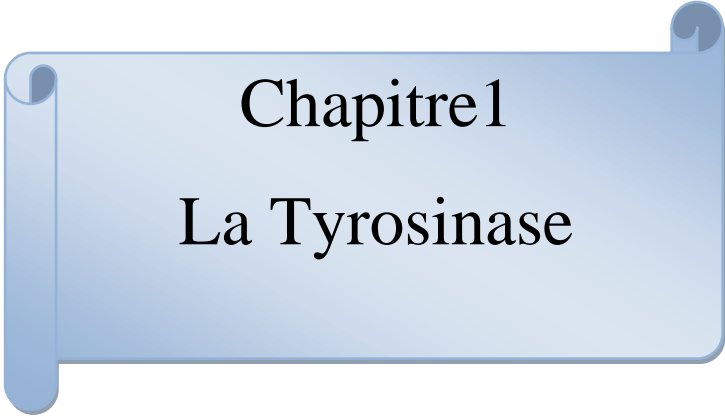
La conception d'un nouveau médicament est un processus basé sur une méthode quasiment expérimentale, long, coûtant très cher à l'industrie pharmaceutique (au moins 800 millions de dollars). Avec le développement de l'outil informatique, des méthodes de modélisation moléculaire *in silico*, telle que le docking moléculaire, ont pris une place capitale dans le processus du drug design. En effet, cette approche consiste à rechercher le mode d'interaction le plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur, ce qui est plus facile à mettre en œuvre, plus rapide pour un coût bien moindre que les méthodes expérimentales classiques [1]

Les produits naturels présentent normalement une faible toxicité et une efficacité élevée pour être utilisés comme agents chimio préventifs. Ils présentent de nombreuses bio activités, telles que antitumorale, antioxydante, anti-inflammatoire, antiradiation, etc. Aujourd'hui il y a un grand nombre de plantes médicinales qui possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Les plantes ont constitué donc la source majeure des médicaments grâce à leur richesse en métabolites secondaires.

Dans ce contexte, et pour apprécier l'effet des substances naturelles, nous avons initié ce travail qui consiste en l'étude et l'analyse d'un article scientifique se rapportant à la question intitulé «**Molecular Simulation Study on the Interaction between Tyrosinase and Flavonoids from Sea Buckthorn** », réalisé par **Li et al 2021**. Le but de cet article est d'étudier les interactions de quatre ligands de petites molécules avec la tyrosinase en vue de son inhibition. Ce travail fait appel à la bioinformatique où l'étude *in silico* en utilisant l'amarrage « docking » moléculaire et la simulation de dynamique moléculaire.

A travers cette analyse d'article scientifique, nous présentons les nouveautés dans le domaine du drug design dans le but de trouver des traitements relatifs à l'inhibition de la tyrosinase impliquée dans les différentes maladies de la peau.

Le présent mémoire est structuré en deux parties ; les données bibliographiques sont présentées dans la première partie de ce mémoire, avec une présentation générale de la tyrosinase en mettant l'accent sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles ainsi que sur le rôle et la physiopathologie de la mélanogenèse. La deuxième partie se rapporte à l'analyse et l'étude de l'article scientifique et décrit le matériel et l'ensemble des méthodes utilisées ainsi que les étapes suivies dans l'exploitation des résultats et leur discussion. Une conclusion générale et des perspectives sont enfin données.



Chapitre1  
La Tyrosinase

## **1 Introduction**

Notre peau est le reflet de notre santé. Elle joue le rôle d'interface entre notre organisme et l'environnement extérieur, et de barrière contre les agressions extérieures. De ce fait, elle fait l'objet d'attentions de plus en plus grandes. Les pathologies et les imperfections cutanées sont traitées au même titre que les dysfonctionnements des autres organes du corps humain.

Parmi les dysfonctionnements cutanés, les hyperpigmentations et leur traitement tiennent une place importante dans la recherche en dermocosmétique. Ces hyperpigmentations ont pour origine, un dérèglement dans la production de mélanines, qui sont les pigments responsables de la coloration cutanée. Par conséquent, ces hyperpigmentations sont traitées par des produits dépigmentants inhibant la mélanogénèse.<sup>2</sup>

## **2 La mélanogénèse**

La synthèse des mélanines débute par l'oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphénylalanine), qui à son tour sera oxydée en dopaquinone. Ces deux transformations peuvent être catalysées par une seule et même métalloenzyme, la tyrosinase<sup>3</sup>. En réalité la transformation de la tyrosine en L-DOPA repose sur une compétition entre deux enzymes : la tyrosinase précédemment citée, plus connue, et la tyrosine hydroxylase qui a comme cofacteur le 6BH4<sup>4</sup>. Dans les deux cas, la L-DOPA sera transformée en dopaquinone par la tyrosinase. A ce stade, la mélanogénèse peut être orientée vers la voie des eumélanines, mélanines brun foncé présentes chez les personnes à chevelure foncée ou vers la voie des phaeomélanines, mélanines jaune orangé rencontrées chez les blonds ou les roux<sup>5</sup>(figure 1).

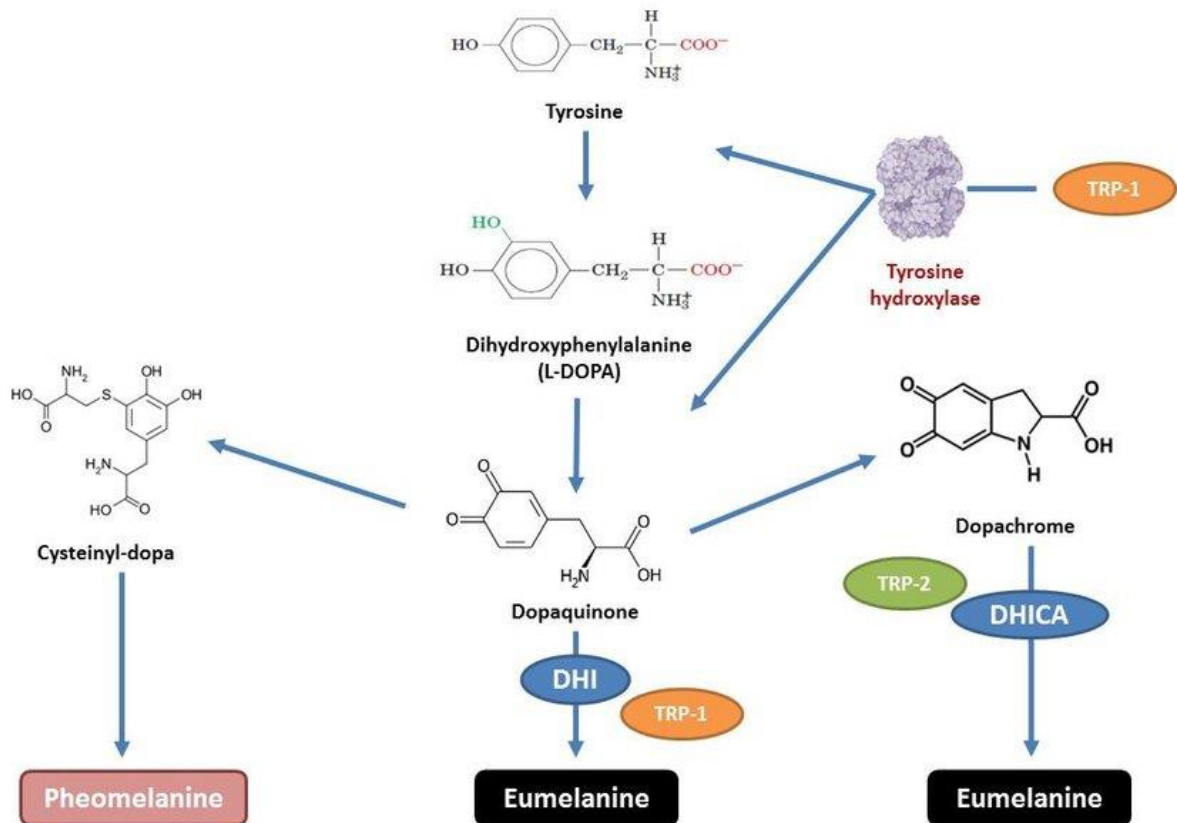


Figure 1: Biosynthèse des mélanines

### 3 Description structurale et fonctionnelle de la tyrosinase

La tyrosinase est une métalloprotéine qui catalyse les deux premières étapes communes de la mélanogénèse et s'avère être ainsi l'enzyme limitante<sup>6</sup>. Son absence ou des mutations de son gène conduisent à une diminution voire à un arrêt de la pigmentation. Il a été établi que la mutation de son gène est associée à l'albinisme oculocutané de type I<sup>7</sup>.

La tyrosinase humaine comme celle de mammifère appartient à la famille des protéines transmembranaires de type I<sup>8</sup>. C'est une métalloprotéine possédant deux atomes de cuivre au niveau de son site actif qui sont nécessaires à sa fonction catalytique. Le domaine de liaison des atomes de cuivre est situé dans la lumière du mélanosome<sup>8</sup>. La détermination complète de la structure primaire et la cristallisation de la tyrosinase humaine n'ont pas

encore été réalisées à ce jour<sup>8</sup>. La présence d'une région transmembranaire et d'une extrémité N-glycosylée rend sa cristallisation très difficile<sup>9</sup>. Des données spectroscopiques ont permis de démontrer que le site catalytique cuivre dépendant impliqué dans la mélanogénèse, ressemble structurellement à celui des catechol oxydases et des hémocyanines (protéine transporteur d'oxygène contenant du cuivre)<sup>10</sup>.

### **3.1 Le site actif**

Sur la base de comparaison des séquences d'acides aminés des tyrosinases de mammifères et d'hémocyanines de mollusques et d'arthropodes, il a été identifié deux régions d'homologie évidente appelées « Cu A » et « Cu B » qui semblent être impliquées dans la liaison des deux atomes de cuivre nécessaires à l'activité catalytique<sup>11</sup>. Au total, six acides aminés histidine localisés dans les sites Cu A et Cu B sont conservés dans la tyrosinase humaine, de mammifères et dans les protéines associées aux tyrosinases TRP-1 et TRP-2<sup>12</sup>. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré la présence de trois histidines au niveau du site Cu B en position 363, 367 et 390. Ces histidines sont autant nécessaires à la liaison de l'atome de cuivre qu'à l'activité de la tyrosinase<sup>12</sup>. La coordination du site Cu B est conservée dans les hémocyanines, les catéchol oxydases et la tyrosinase de mammifères alors que celle du site Cu A semble différente<sup>10</sup>. Il semblerait aussi que la liaison d'un atome de cuivre au niveau de l'un des sites favoriserait la liaison d'un autre atome de cuivre au niveau de l'autre site<sup>7</sup>(figure 2).



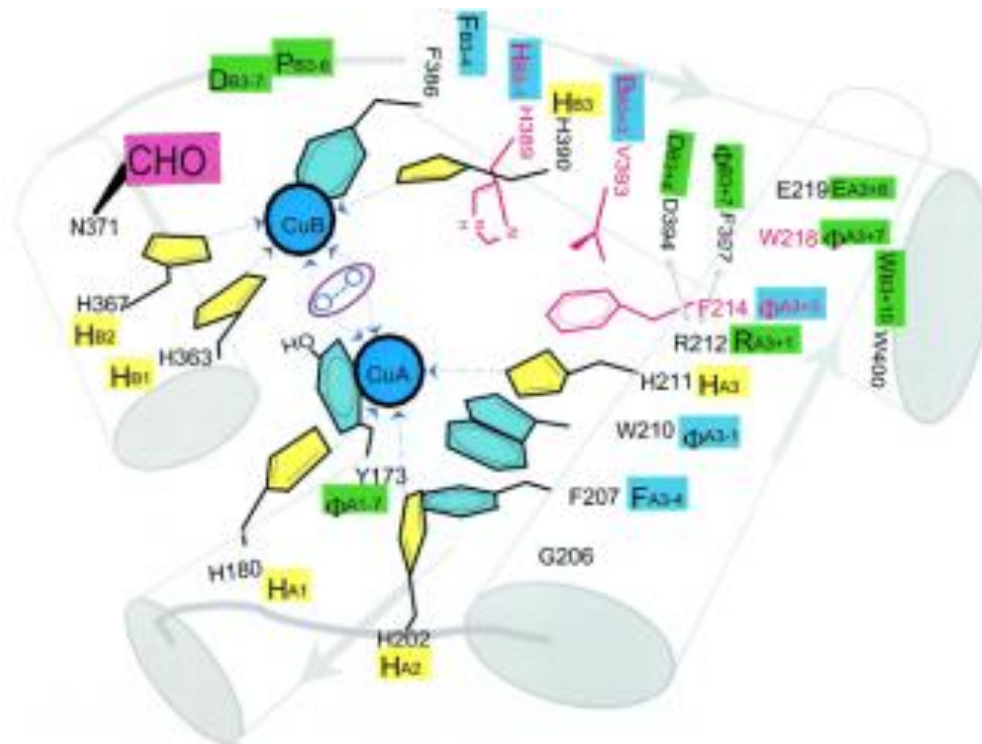


Figure 2: Structure de la tyrosinase.

### 3.2 Rôle physiologique de tyrosinase

La TYR est un membre de la famille des enzymes de cuivre de type 3, elle joue un rôle primordial dans la synthèse des mélanines principalement l'eumélanine et la phéomélanine. En effet, elle catalyse les deux premières étapes de la mélanogenèse correspondant à la conversion de l'acide aminé L-tyrosine en L-DOPA quinone. Cette réaction implique à la fois l'hydroxylation et l'oxydation à deux électrons du substrat, accompagnée de la formation d'eau. La polymérisation spontanée subséquente de l'ortho-quinone conduit au biopolymère mélanine<sup>13</sup>.

L'élévation de la synthèse et de l'accumulation des mélanines au niveau de la peau est une caractéristique courante dans de nombreux types de troubles cutanés, y compris l'hyperpigmentation acquise, le lentigo solaire ou sénile, le mélasma, le mélanome et la neurodégénérescence associée à la maladie de Parkinson<sup>14</sup>. Ainsi, l'inhibition de la TYR peut considérablement corriger le taux des mélanines dans les cas précités.

## 4 Les inhibiteurs de la tyrosinase

En raison du rôle critique de la tyrosinase dans la mélanogénèse et processus de brunissement, plusieurs enquêtes ont été signalées pour l'identification de l'inhibiteur de la tyrosinase à la fois naturel (champignons, bactéries, plantes) et de sources synthétiques jusqu'à présent.

### 4.1 Les inhibiteurs naturels

Les inhibiteurs de la TYR provenant de sources naturelles attirent généralement plus attention par rapport aux composés synthétisés chimiquement en raison de la demande cosmétique. Dans cette classe d'inhibiteurs, on distingue :

#### 4.1.1 L'hydroquinone<sup>15</sup>

L'hydroquinone est l'un des premiers agents dépigmentants introduit en clinique depuis les années 60 (figure 3). Elle sert de substrat à l'enzyme et les produits issus de son oxydation sont des quinones (1,4-benzoquinone) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont toxiques pour le mélanocyte<sup>16</sup>.

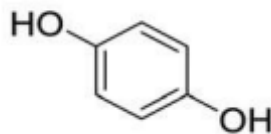


Figure 3: Structures de l'hydroquinone

#### 4.1.2 Acide kojique

C'est une substance antibiotique produite par plusieurs champignons du genre *Agaricus* et *Penicillium* (figure 4), très utilisée comme agent dépigmentant en cosmétique. Son mécanisme d'inhibition consiste à chélater le cuivre, cofacteur indispensable à l'activité de l'enzyme<sup>17</sup>.

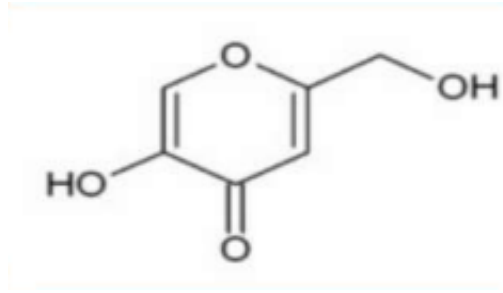


Figure 4: Structure de l'acide kojique.

#### 4.1.3 Arbutine

Largement utilisé en cosmétique, l'arbutine est un promédicament de l'hydroquinone (figure 5) inhibant la synthèse des mélanines en bloquant le site actif de la TYR<sup>18</sup> avec une IC<sub>50</sub> égale à 17000 µM. Il s'agit d'un glycoside naturel fréquent dans les plantes de la famille des Ericacées. En présence d'une glycosidase, il se décompose rapidement en glucose et en hydroquinone<sup>1</sup>.

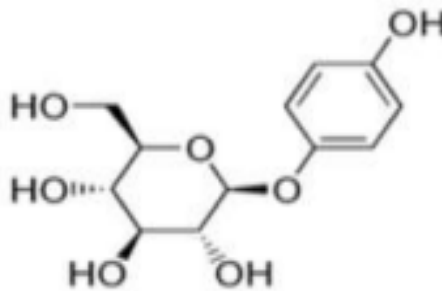


Figure 5: Structures d'arbutine

#### 4.1.4 Flavonoïdes

Les polyphénols végétaux sont produits comme métabolites secondaires par les plantes hautes et ont de nombreuses activités biologiques. Les flavonoïdes sont l'un des dérivés de polyphénols les plus explorés, constitués de phénols et d'anneaux de pyrane et distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes. Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés à ce jour, et ils assurent la protection contre le rayonnement ultraviolet, les agents pathogènes et les herbivores<sup>19</sup>.

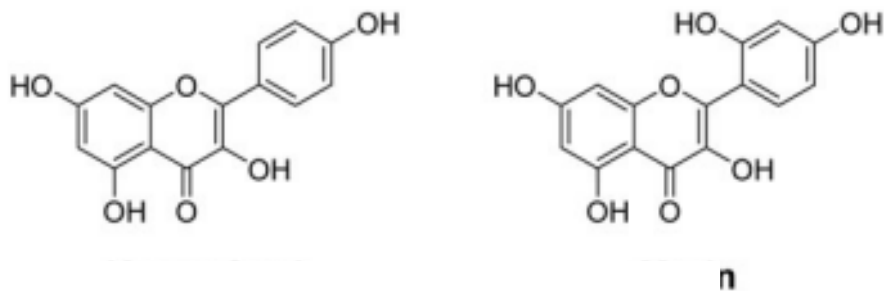


Figure 6: Structures de quelques flavonoïdes inhibant la tyrosinase : la Kaempferol et Morin.

## 4.2 Inhibiteurs synthétiques

### 4.2.1 4-n-butylrésorcinol/Rucinol®

Le 4-n-butylrésorcinol (Rucinol®) est un inhibiteur des voies de synthèse de la mélanine. Il inhibe d'une part la tyrosinase, réduisant ainsi la quantité de mélanine produite et d'autre part la TRP-1 impliquée dans les étapes de la synthèse des eumélanines.

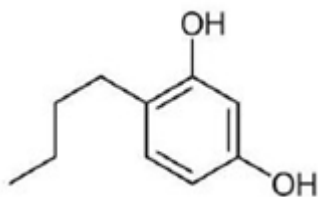


Figure 7: Structure du 4-n-butylrésorcinol

Il a montré une efficacité dépigmentante dans le traitement des hyperpigmentations du mélasma, des lentigos séniles et actiniques, des séquelles pigmentaires, des phénomènes inflammatoires ou cicatriciels.

### 4.2.2 Tropolone

La tropolone est une molécule synthétique connue pour complexer des métaux. Elle a été identifiée comme un puissant inhibiteur de la TYR, avec un IC<sub>50</sub> égal à 0,5  $\mu\text{M}^{20}$ .

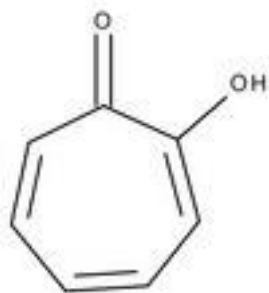


Figure 8: Structure de la Tropolone

#### 4.2.3 N- phenylethiourée

Le N- phenylethiourée se présente comme l'un des meilleurs inhibiteurs compétitifs de la TYR avec un IC50 égal à 1.5 $\mu$ M [16].

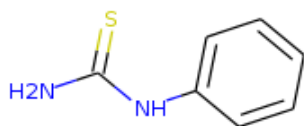


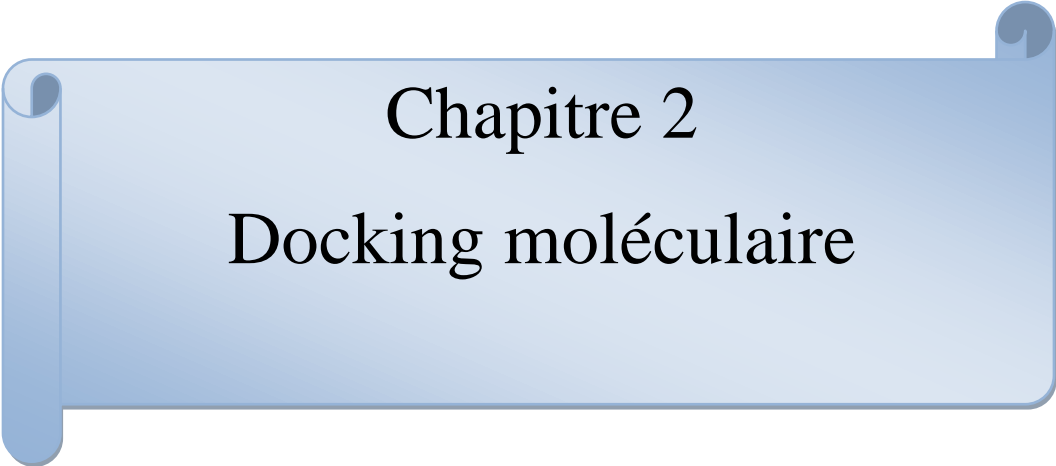
Figure 9: Structure du N- phenylethiourée

#### 4.2.4 Acide azélaïque

L'un des traitements de l'hyperpigmentation les plus vendus est connu sous le nom commercial de Skinoren®. Le principe actif de ce produit s'appelant L'acide azélaïque est un puissant inhibiteur de la TYR. Il ne présente aucun effet sur la peau normalement pigmentée<sup>21</sup>.



Figure 10: Structure de l'acide azélaïque.



Chapitre 2  
Docking moléculaire

# 1 Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre les molécules. De même, la découverte de nouvelles molécules activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom "docking", ont été développées.

L'action d'une molécule dans une protéine est gouvernée par des principes de reconnaissance mutuelle entre la molécule et sa cible. C'est dans ce contexte que s'inscrit le docking moléculaire. Il s'agit d'un ensemble de méthodes algorithmiques et géométriques permettant la prédiction in silico de la conformation (position et orientation relative) la plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur [21]. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand). Le terme docking seul est couramment employé pour désigner un «docking protéine-ligand »<sup>22</sup>.

Dans ces dernières décennies, la conception de molécules d'intérêt thérapeutique a bénéficié des progrès issus de diverses disciplines scientifiques telles que la biologie, la pharmacochimie et l'informatique. En effet, avec le développement de l'outil informatique, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire (assemblage ou arrangement moléculaire) a rapidement investi dans le domaine de la recherche en biologie pour y devenir un outil incontournable<sup>23</sup>.

Le docking moléculaire a été appliqué avec succès sur un certain nombre de cibles thérapeutiques (protéines) dont la structure 3D en complexe avec le ligand a été parallèlement déterminée. Actuellement, un bon nombre de médicaments mis sur le marché proviennent d'une conception rationnelle basée sur des stratégies de criblage virtuel comme par exemple :

- Des inhibiteurs de l'aldose réductase: par recherche dans des bases de données de composés.

- Un inhibiteur d'un élément de réponse de la trans-activation de la HIV-1 RNA: par docking rigide et recherche dans des bases de données de composés.
- Un inhibiteur de la thrombine et celui de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase : par docking sur des chimiothèques combinatoires.

## **2 Le Docking Moléculaire**

L'amarrage moléculaire est une méthode empirique qui permet de prédire l'affinité entre deux molécules. Il est généralement utilisé pour prédire l'affinité du ligand pour la protéine, y compris la position et la direction les plus favorables de l'interaction entre le ligand et la protéine cible. Cet outil est actuellement très demandé pour trouver de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Il permet de réaliser des criblages très rapides et peu coûteux pour identifier des molécules pouvant avoir une forte activité sur la cible enzymatique, ou au contraire, pour identifier la cible de molécules ayant une activité biologique intéressante. En revanche, lorsque la structure tridimensionnelle de la protéine cible est définie, l'amarrage peut mettre en évidence les régions et les résidus à explorer pour optimiser l'affinité du ligand pour la cible. Il est également utilisé pour optimiser la sélectivité d'une molécule entre deux ou plusieurs protéines<sup>24</sup>.

Le but du Docking moléculaire est de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou de plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur<sup>25</sup>.



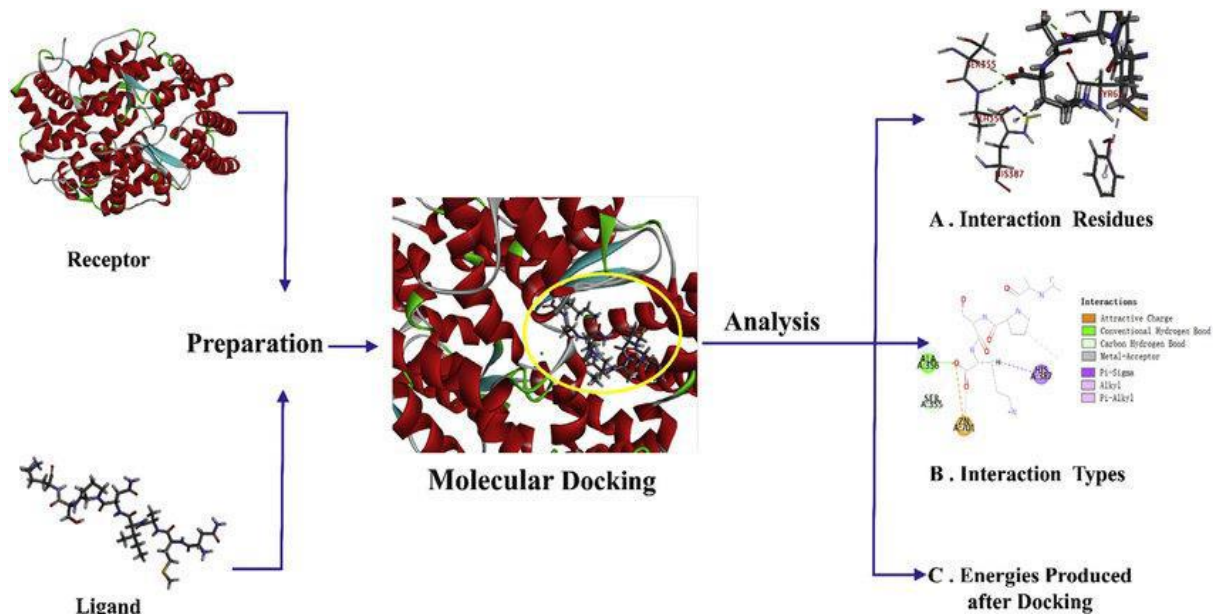


Figure 11: Procédures générales pour l'amarrage moléculaire [5].

### 3 Présentation de la méthode du docking moléculaire

#### 3.1 Principes

Le plus important problème pour l'étape de Docking est de parcourir le mieux possible l'espace conformationnel. La complexité de ce problème est en fonction du nombre de degrés de liberté, de translation, de rotation en plus des conformations de départ possibles du ligand. Afin d'éviter des calculs que les machines ne peuvent résoudre ou seulement dans des temps bien trop importants, plusieurs approximations sont possibles. Les algorithmes de recherche de la flexibilité du ligand peuvent se classer en trois principes, nommés combinatoire, stochastique, et déterministe.

##### ✓ L'approche combinatoire

Cette approche est basée sur des grilles de valeurs pour chaque degré de liberté, et chacune de ces grilles est explorée de manière combinatoire au cours de la recherche. En raison de l'effet combinatoire, le nombre d'évaluations augmente bien plus rapidement que le nombre de degrés de liberté. Pour cela, des critères de fin sont imposés pour éviter à l'algorithme de parcourir des portions de l'espace qui ne mèneraient qu'à de mauvaises solutions.

##### ✓ L'approche stochastique

L'approche stochastique consiste à effectuer des changements aléatoires dans la structure tridimensionnelle du ligand. Habituellement il s'agit de modifier un degré de liberté à chaque fois. L'un des points faibles de cette méthode est l'incertitude de convergence. Pour l'éviter, il faut multiplier les calculs, indépendamment les uns des autres. Un des principaux algorithmes stochastiques est la méthode de Monte Carlo.

#### ✓ **L'approche déterministe**

Dans l'approche déterministe, l'état initial détermine les mouvements à effectuer pour générer l'état suivant. Cet état devant être d'énergie égale ou inférieure à celle de l'état initial. Le problème des systèmes déterministes est qu'ils peuvent facilement rester piégés dans un minimum local car leurs capacités à surmonter des barrières énergétiques sont faibles. Il s'agit de l'approche la plus simple et la plus directe<sup>26</sup>.

## **4 Les outils du docking moléculaire**

### ✓ **Récepteur**

Dans le cas d'une molécule le récepteur est une protéine spéciale qui peut se lier spécifiquement et de manière réversible à une autre molécule appelée ligand. Pour obtenir le récepteur, nous utilisons la structure 3D de la protéine disponible gratuitement dans la base de données PDB [11]. Différentes conformations tridimensionnelles peuvent être téléchargées sous l'extension .pdb, qui peut être lue par le logiciel d'accueil et contient diverses informations sur la protéine. Par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolu la structure, la méthode expérimentale, etc. Il contient également des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z, qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée. Si la cible n'a pas été stockée dans la bibliothèque et que la bibliothèque contient des protéines avec des séquences similaires, une modélisation d'homologie sera effectuée pour construire la structure 3D de la cible souhaitée [12].

### ✓ **Ligand**

En biologie, un ligand (du latin ligandum, liant) est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule cible, une protéine ou un acide nucléique, et remplit généralement des rôles fonctionnels : stabilité structurelle, catalyse, régulation de l'activité

enzymatique et transmission du signal. Le terme est largement utilisé dans la recherche sur les protéines et fait référence aux molécules qui interagissent avec les protéines de manière non covalente et spécifique et jouent un rôle dans leurs fonctions.

La liaison du ligand à la protéine réceptrice modifie généralement la conformation de cette dernière, qui est sa structure tridimensionnelle. L'énergie associée à l'interaction intermoléculaire entre la protéine et son ligand favorise ce changement conformationnel, appelé ajustement induit. Par conséquent, cette modification structurelle peut réguler son état fonctionnel et son activité<sup>27</sup>.

En Docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules<sup>28</sup>.

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes complémentaires : le docking et le scoring.

- **Le Docking (la première)** : est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
  
- **Le Scoring (la deuxième)** : est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le Ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposée<sup>29</sup>.

## 5 Les Types de docking moléculaire

### ❖ Docking rigide

Dans le cas des méthodes de docking rigide, la recherche de la pose optimale se limite au positionnement. Cette opération consiste en la recherche exhaustive dans l'espace discrétisé

des 6 degrés de liberté. Certains programmes, s'ils n'appartiennent pas à la famille des techniques de docking rigide, utilisent plusieurs étapes successives d'optimisation dont les premières peuvent s'apparenter à du docking rigide<sup>30</sup>.

#### ❖ Docking flexible

Lorsque les méthodes de docking prennent en compte la flexibilité du ligand, deux étapes sont effectuées successivement pendant toute la durée du docking. La première étape correspond à une exploration de l'espace conformationnel de manière à retrouver, parmi les conformations proposées, la conformation bioactive. Pendant la deuxième étape une fonction de score évalue ces conformations. Il existe plusieurs types d'algorithmes pour le traitement de la flexibilité du ligand : les méthodes systématiques (fragmentation/reconstruction), les méthodes aléatoires, et les méthodes de simulation (dynamique moléculaire)<sup>31</sup>.

#### ❖ Docking semi-flexible

Lorsque l'espace conformationnel des ligands est exploré, le nombre de degrés de liberté de l'espace de recherche peut être conséquent dans le cas de molécules très flexibles. Dans un tel contexte, l'emploi de méthodes de recherche exhaustives apparaît souvent inapproprié car nécessitant des simplifications importantes au niveau de l'échantillonnage. D'autres algorithmes, dits de fragmentation, sont employés pour construire de façon incrémentielle le ligand au sein du site actif de la protéine. L'espace des conformations du ligand est alors restreint au voisinage d'un ensemble initial d'états simplifiés. Cette stratégie de recherche par construction, qui se présente sous diverses variantes, est notamment adoptée par les programmes DOCK, FLEXX, et Hammerhead<sup>32</sup>.

## 6 Les programmes

Le docking est une approche permettant de prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et leur cible. Il se déroule en deux étapes distinctes:

La première étape consiste à placer et à positionner le ligand dans son site d'interaction. La seconde étape consiste, quant à elle, à évaluer les poses du ligand générées lors de la première étape pour ne retenir que la ou les meilleures. Les algorithmes utilisés pour ces deux étapes diffèrent en fonction du programme de docking utilisé (Tableau 1)<sup>33</sup>.

Tableau 1: Principaux programmes de docking moléculaire<sup>34</sup>

<b>Nom</b>	<b>Editeur</b>	<b>Site Internet</b>
AutoDock	Scripps	<a href="http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/">http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/</a>
Gold	CCDC	<a href="http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/">http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/</a>
FlexX	BioSolveIT	<a href="http://www.biosolveit.de/FlexX/">http://www.biosolveit.de/FlexX/</a>
Fred	OpenEyes	<a href="http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html">http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html</a>
Glide	Schrödinger	<a href="http://www.schrodinger.com/Products/glide.html">http://www.schrodinger.com/Products/glide.html</a>
Dock	UCSF	<a href="http://dock.compbio.ucsf.edu/">http://dock.compbio.ucsf.edu/</a>
ICM	Molsoft	<a href="http://www.molsoft.com/products.html">http://www.molsoft.com/products.html</a>
LigandFit	Accelrys	<a href="http://www.accelrys.com/ceius2/c2ligandfit.html">http://www.accelrys.com/ceius2/c2ligandfit.html</a>
Surflex	Biopharmics	<a href="http://www.biopharmics.com/products.html">http://www.biopharmics.com/products.html</a>



# Chapitre 3

## Matériel et méthode

# 1 Matériels

## 1.1 Logiciels

DécouverteStudio (DS, Dassault Systems BIOVIA, USA), qui est le logiciel professionnel de simulation moléculaire, a été utilisé pour prétraiter les récepteurs protéiques, notamment en supprimant les ligands et des molécules d'eau, l'hydrogénation et l'achèvement des résidus d'acides aminés incomplets. La topologie a été construite en utilisant le serveur PRODRG2.18. Le logiciel DS a été utilisé pour optimiser la géométrie des ligands à petites molécules. Les deux protéines récepteurs et ligands à petites molécules sont dotés de champ de force CHARMM.

## 1.2 Banques de données

La structure cristalline de la tyrosinase (PDB ID : chaîne 2zmx A) a été obtenue à partir de la base de données Brookhaven Protein.

Tridimensionnel (3D) transformateur des quatre petites molécules ligands est téléchargé à partir de la base de données PubChem.

# 2 Méthodes

## 2.1 Préparation de la protéine

La valeur R de ce fichier est de 0,213, et le cristal de protéine a été préparé à pH 7,5. L'enzyme étant présentée sous forme homodimérique, la chaîne B a donc été supprimée afin de conserver uniquement la chaîne A tout en éliminant les molécules d'eau et les différents ligands.

## 2.2 Préparation des ligands

Les numéros d'enregistrement des ligands flavonoïdes, isorhamnetin, le kaempférol, la myricétine et la quercétine sont 5281654, 5280863, 5281672 et 5280343, respectivement.

### 2.2.1 Les ligands utilisés dans ce travail

#### ❖ L'isorhamnetin

C'est un flavonoïde qui existe largement dans la merne prun, Ginkgo biloba, cotylédon de mûrier et autres végétaux. Il est couramment utilisé dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires<sup>35</sup> et a de nombreuses fonctions telles que l'anti-hépatotoxicité, l'antioxydation et l'inhibition des plaquettes d'agrégation. Des études récentes ont montré que

l'isorhamnetin peut prévenir les dommages oxydatifs induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cardiomyocytes<sup>36</sup>.

#### ❖ **Le kaempférol**

Il a été trouvé dans de nombreuses plantes comestibles (telles que le thé, le chou-fleur, la fraise et le raisin), qui est couramment utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise. Certaines études épidémiologiques ont montré que la consommation à long terme de kaempférol peut éventuellement réduire le risque de cancer et de maladies cardiovasculaires<sup>37</sup>.

#### ❖ **La myricétine**

C'est un métabolite courant dans les aliments naturels tels que baies, légumes, thé, vin et herbes. Il a été considéré en tant qu'antioxydant qui peut inhiber l'action médiée par les radicaux libres qui provoquent le photovieillissement de la peau<sup>38</sup>. Certaines études révèlent que la myricétine peut inhiber le gain de poids et l'accumulation de graisse corporelle en augmentant l'oxydation des acides gras<sup>39</sup>.

#### ❖ **La quercétine**

Elle a des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire. La quercétine et d'autres flavonoïdes peuvent protéger la faible densité lipides (LDL) de l'oxydation, inhibent la formation de la plaque d'athérosclérose<sup>40</sup>, par la résistance à l'hypertension et à l'arythmie en favorisant la relaxation des muscles lisses cardiovasculaires<sup>41</sup>.

### **2.3 Docking moléculaire**

La tyrosinase est composée de 277 acides aminés et deux ions Cu. Une sphère de rayon 12 Å était réglée. Le logiciel DS a été utilisé pour visualiser et analyser les résultats d'amarrage flexibles. Pendant tout le processus d'amarrage, les résidus d'acides aminés tels que HIS38, HIS54, HIS63, HIS180, HIS190, HIS194, HIS215 et HIS216 dans le récepteur protéique sont tous flexibles, et le reste une structure rigide. L'énergie de liaison a été considérée comme la position d'amarrage optimale des ligands à petites molécules, et l'énergie de liaison minimale des complexes protéiques a été sélectionnée pour une analyse plus approfondie.



## 2.4 Simulation de dynamique moléculaire (DM)

Le plus bas de l'énergie libre de liaison de chaque complexe a été considérée comme la conformation initiale de l'étude MD<sup>42</sup>. Les résultats de la simulation MD peuvent expliquer les changements conformationnels du complexe protéique au cours du processus contraignant. De plus, ils ont fourni la base pour le mode de liaison des ligands à petites molécules et du récepteur protéines<sup>43</sup>. Toutes les simulations MD dans le travail actuel ont utilisé le GROMACS (version 19.5) avec la force GROMACS96 43a1field<sup>44</sup>. Le serveur Dundee PRODRG2.5 a été utilisé pour générer les paramètres topologiques des petites molécules.

Le minimum de la distance entre les atomes de soluté et le bord de la boîte périodique est de 1,0 nm<sup>45</sup>. La boîte a été remplie de charge (SPC), molécules d'eau et système de solvant ; alors, des contre-ions ont été ajoutés pour neutraliser la charge totale du système. Après avoir minimisé l'énergie, le système a été équilibré en deux étapes : (1) ensemble canonique (NVT, 0,2 ns) et (2) isotherme isobare (NPT, 0,2 ns). Enfin, 100 ns MD simulation a été réalisée à 1 bar et 300 K<sup>46</sup>, et les coordonnées ont été enregistrées dans le fichier de trajectoire toutes les 0,1 ps pour une analyse ultérieure. Enfin, la reliure complète a été utilisée pour empêcher le ligand de dériver dans la dynamique moléculaire, et les ions Cu dans la tyrosinase ont été contraints. Après simulation MD, la trajectoire a été analysée à l'aide de GROMACS (version 19.5).

## Chapitre 4

### Résultats et Discussion

## 1 Doking moléculaire

Le mécanisme des interactions entre la tyrosinase et quatre ligands de petites molécules a été étudié par le logiciel DS. La figure 2a1–d1 montre la valeur optimale de la conformation d'amarrage entre la tyrosinase et les ligands. Durant le processus d'amarrage, les quatre ligands ont été insérés dans le site actif de la tyrosinase pour former une liaison relativement stable conformation 2a2–d2, et l'énergie de liaison de la quercétine avec la tyrosinase est de  $-586,7$  kcal/mol, la myricétine est de  $-165,3$  kcal/mol, le kaempférol vaut  $-111,7$  kcal/mol et l'isorhamnétine vaut  $-75,7$  kcal/mol.

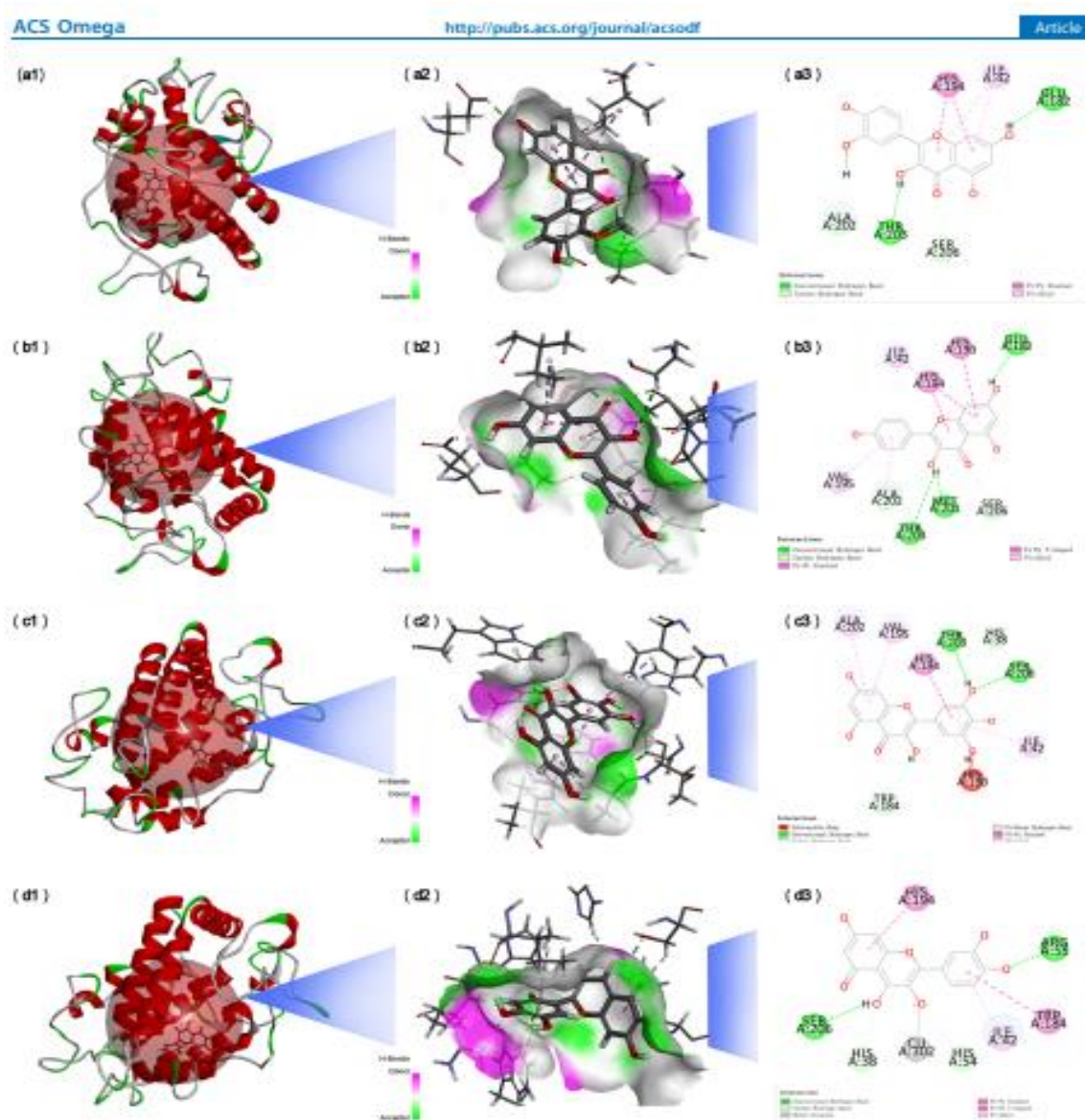


Figure 12: Position d'amarrage et interactions de la tyrosinase avec quatre ligands : (a) l'isorhamnétine, (b) le kaempférol, (c) la myricétine et (d) la quercétine.

Les nombres 1 à 3 représentent le site de liaison, la conformation de liaison et le diagramme des interactions entre les ligands et la tyrosinase, respectivement.

D'une manière générale, la lumière protéique peut fournir un environnement hydrophobe fort et de multiples sites de liaison hydrogène pour les ligands, ce qui contribue à la stabilité des ligands. Ainsi, les interactions entre tyrosinase et quatre ligands de petites molécules ont été analysés par DS, et les résultats sont présentés dans la figure 2. L'isorhamnétine, le kaempférol, la myricétine et la quercétine peuvent tous interagir avec les sites actifs de la tyrosinase par liaisons hydrogène conventionnelle, liaisons carbone-hydrogène, pilement Pi-Pi et interactions Pi-alkyle.

À l'exception de ce qui précède, HIS190 et la myricétine montrent l'effet de bosse défavorable, tandis que Cu302 et la quercétine présentent l'effet d'un accepteur de métal. L'énergie de liaison entre la quercétine et la tyrosinase est 4 à 8 fois plus élevée que celle des trois autres petites molécules, cela peut être dû aux interactions entre la quercétine et les ions Cu dans le centre actif de la tyrosinase. Par conséquent, l'effet inhibiteur de la quercétine est certain.

## **2 Analyse de trajectoire de simulation MD**

Bien que les interactions entre la tyrosinase et quatre petites molécules des ligands ont été étudiées par la méthode de docking moléculaire, à l'exception de la quercétine, la différence entre eux n'est pas importante. Par conséquent, une méthode de simulation MD de 100 ns a été utilisée pour comparer davantage les différences des quatre complexes au niveau moléculaire.

La stabilité et le degré des interactions entre la tyrosinase et quatre petites molécules ont été élucidés à l'aide du programme GROMACS. Les propriétés dynamiques des quatre complexes ont ensuite été soumises à l'analyse des données de trajectoire obtenues à partir du MD 100 ns simulations. Écart quadratique moyen (RMSD), rayon de giration ( $R_g$ ), surface accessible au solvant (SASA) et racine de la fluctuation quadratique moyenne (RMSF) ont été utilisées pour évaluer chaque système dans les études de dynamique moléculaire, et les résultats sont illustrés à la figure 3.

## 2.1 Écart quadratique moyen RMSD

Il est utilisé pour déterminer l'écart moyen entre la conformation du complexe et la conformation originale à un moment précis et d'évaluer si le système complexe a atteint un état stable. Comme le montre la figure 3, pendant la simulation, la Valeur RMSD de la configuration du complexe isorhamnetine-tyrosinase continue d'augmenter jusqu'à ce qu'elle se stabilise à environ 0,45 nm après 40 ns.

De même, la valeur RMSD des complexes kaempférol-tyrosinase et myricétine-tyrosinase a finalement atteint un plateau RMSD à environ 0,4 nm après 50 ns. Pendant ce temps, la valeur RMSD de la quercétine/tyrosinase atteint rapidement environ 0,38 nm après 25 ns, bien que le complexe ait subi de petites fluctuations au cours des périodes comprises entre 15 et 25 ns, il est le moins volatil des quatre complexes.

Ces résultats indiquent que les quatre systèmes atteints un état stable à la fin des simulations MD. Heureusement, le complexe de quercétine et de tyrosinase était stable moins de 25 ns, et sa vitesse d'équilibre était plus rapide. La valeur du RMSD était de 0,3 nm. En conclusion, les quatre complexes sont stables, et la quercétine est la plus stable.

## 2.2 Rayon de giration

L'évolution temporelle du rayon de giration ( $R_g$ ) est une excellente évaluation d'effondrement de la protéine dynamique<sup>47</sup>. Le rayon de giration des quatre systèmes a été quantifié et la relation entre le rayon de giration et le temps de simulation ont été tracés pour vérifier la compacité des protéines<sup>48</sup>, comme le montre la figure 3b. Le  $R_g$  de tous les systèmes a atteint une valeur constante à environ 40 ns, indiquant que la simulation MD a atteint un équilibre après 40 ns.

Les valeurs  $R_g$  de l'isorhamnetine-tyrosinase, du kaempférol-tyrosinase et les complexes myricétine-tyrosinase n'ont pas changé de manière significative tout au long de la simulation et ont été conservées fluctuant à 1,75, 1,77 et 1,8 nm, respectivement, indiquant que la région de liaison montre peu d'influence sur leurs structures. La valeur  $R_g$  du complexe quercétine-tyrosinase montre une tendance à la baisse pendant les 100 ns de simulation, tandis que la valeur moyenne de  $R_g$  est de  $1,77 \pm 0,02$  nm, indiquant que leur structure est devenue plus compacte après la simulation MD. Les résultats montrent que le rayon de giration du complexe quercétine-tyrosinase est plus petit que ceux des trois autres systèmes, indiquant que l'étanchéité structurelle du complexe quercétine-tyrosinase était meilleure que celle des autres systèmes.

### 2.3 Surface accessible aux solvants

Théoriquement, la surface accessible aux solvants SASA peut être utilisée comme paramètre pour décrire le rapport des interactions de la protéine avec les solvants qui prédit le degré de changements de conformation dans les processus de liaison et peut être utilisée pour évaluer l'accessibilité des protéines<sup>49</sup>. Pendant les 100 ns du temps de simulation, le SASA du système change comme indiqué sur la figure 3c.

Le SASA de l'isorhamnétine-tyrosinase, la kaempférol-tyrosinase et la myricétine-tyrosinase ont fluctué dans la plage de 125-130, 115-125 et 120-130 nm, respectivement, tandis que le SASA de la quercétine-tyrosinase a montré une tendance à la baisse légèrement oscillatoire pendant la simulation MD.

Le SASA de la quercétine-tyrosinase a diminué rapidement de 130 à 110 nm, respectivement, et a maintenu un équilibre après 40 ns. Ceci indique que la combinaison de la quercétine rend la structure de la tyrosinase plus compacte. Le résultat de SASA est cohérent avec celui de Rg, ce qui confirme la justesse de la simulation MD.

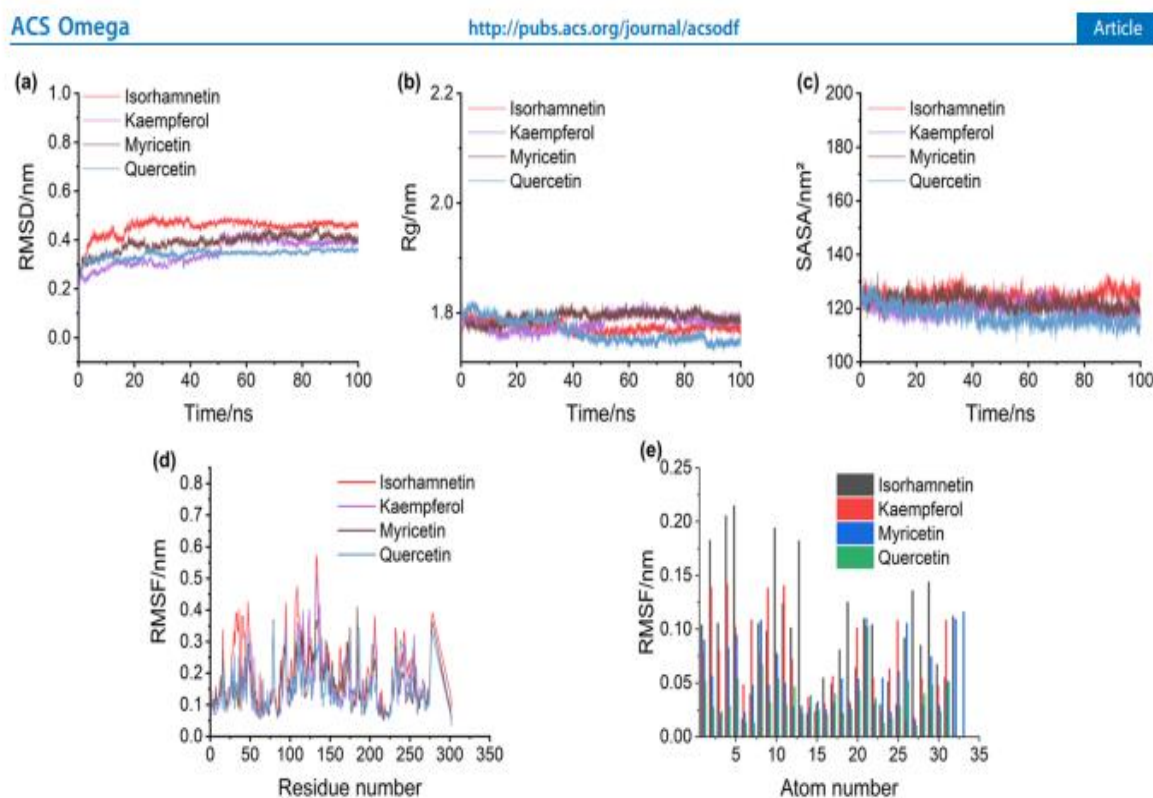


Figure 13: Résultats de la dynamique moléculaire (100 ns) de quatre complexes.

tyrosinase-ligand. (a) RMSD, (b) Rg, (c) SASA et (d) valeurs RMSF de quatre.

les types de tyrosinase sans ligand ont été tracés en fonction du nombre de résidus, et (e) les valeurs RMSF de quatre ligands de tyrosinase ont été tracées

selon le nombre d'atomes

## 2.4 Fluctuation quadratique moyenne

La moyenne quadratique est utilisée pour évaluer la mobilité des protéines locales, dans le temps. Les valeurs moyennes de fluctuation (RMSF) des résidus de tyrosinase dans l'absence et la présence de ligands ont été calculées et tracées par rapport aux nombres de résidus sur la trajectoire de simulation, comme indiqué sur la figure 3d. Les valeurs RMSF de la tyrosinase pure étaient généralement supérieures à celles des quatre ligands, indiquant que la liaison des ligands a restreint les fluctuations de la tyrosinase.

Les résultats montrent que la fluctuation supérieure à 0,4 nm correspond aux résidus éloignés de la liaison au ligand placé. De plus, le résidu en contact avec le ligand est le plus stable et la valeur RMSF est faible. De plus, les RMSF des quatre positions d'atome de ligand ont été calculés pour vérifier leurs changements conformationnels, comme illustré à la figure 3e. Les résultats montrent que la fluctuation de quatre atomes de ligand était limitée ( $<0,22$  nm). Par conséquent, il peut être conclu que les interactions entre la tyrosinase et les quatre ligands étaient stables pendant la simulation.



Conclusion



Dans ce travail, les interactions de quatre ligands de petites molécules avec la tyrosinase ont été étudiées à la fois par docking moléculaire et simulation de dynamique moléculaire. Selon les résultats de l'amarrage moléculaire, l'isorhamnétine, le kaempférol, la myricétine et la quercétine étaient liées dans la cavité de la tyrosinase.

L'affinité de la tyrosinase aux ligands peut être dans l'ordre quercétine > myricétine > kaempférol > isorhamnétine. Les facteurs Hydrophobicité, liaison hydrogène et interactions d'empilement Pi-Pi jouent un rôle majeur dans la stabilité du complexe tyrosinase–ligand . La quercétine s'est révélée être le ligand le plus puissant à la tyrosinase, qui pourrait être attribué à la force non liante entre la quercétine et les ions Cu de tyrosinase. La simulation de dynamique moléculaire montre que les complexes tyrosinase-ligand étaient stables en 50 ns.

Depuis les petites molécules interagissent avec deux ions cuivre de la tyrosinase, de meilleurs inhibiteurs pourraient être conçus artificiellement à l'avenir. Ce qu'on voit clairement c'est que les valeurs Rg et SASA des complexes quercétine-tyrosinase sont plus petits que celles des trois autres systèmes, ce qui indique que l'énergie de liaison du complexe quercétine-tyrosinase est la plus faible des résultats d'amarrage moléculaire.

De plus, la fluctuation atomique montre que les interactions entre la tyrosinase et les quatre ligands sont stables pendant le temps de simulation. Les résultats de simulation de dynamique moléculaire sont compatibles avec ceux de l'amarrage moléculaire, ce qui prouve encore la précision des résultats d'amarrage.

En perspectives, il conviendrait donc de tester les biomolécules des plantes algériennes médicinales et endémiques et de les tester de nouveau *in silico* pour confirmer leur effet sur la tyrosinase, et pourquoi pas développer des médicaments naturels sans effets néfastes sur la santé humaine par rapport à leurs analogues synthétiques.



Références bibliographiques

- (1) Okombi, S. Recherche et etude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. phdthesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005.
- (2) Okombi, S. Recherche et etude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. phdthesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005.
- (3) *Regulatory Mechanisms of Melanogenesis: Beyond the Tyrosinase Concept* / Elsevier Enhanced Reader.  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022202X9390202S?token=BC60359523290C06E7C1136ED740780D033A646F178CDCD1B31FD7D0FE72C53DF680DBB8B460AED87EEBD8F0F9F543E7&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220625002730> (accessed 2022-06-25).  
<https://doi.org/10.1038/jid.1993.69>.
- (4) *Hair Follicle Pigmentation* / Elsevier Enhanced Reader.  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022202X15321084?token=8A2D63A1D2613491D2E5DEDB767AEF9C70DA4D06DBCC15C30FE0BDF3D6012E91E727128F8A07752506984F6723E7362E&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220625003116> (accessed 2022-06-25). <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23528.x>.
- (5) Mount David. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (Mount, *Bioinformatics*).  
<https://www.abebooks.com/9780879697129/Bioinformatics-Sequence-Genome-Analysis-Mount-0879697121/plp> (accessed 2022-06-19).
- (6) Seo, B.; Yun, J.; Lee, S.; Kim, M.; Hwang, K.; Kim, J.; Min, K. R.; Kim, Y.; Moon, D. Barbarin as a New Tyrosinase Inhibitor from *Barbarea orthoceras*. *Planta Med.* **1999**, *65* (8), 683–686. <https://doi.org/10.1055/s-1999-14092>.
- (7) Spritz, R. A.; Ho, L.; Furumura, M.; Hearing, V. J. Mutational Analysis of Copper Binding by Human Tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* **1997**, *109* (2), 207–212. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12319351>.
- (8) Hall, A. M.; Orlow, S. J. Degradation of Tyrosinase Induced by Phenylthiourea Occurs Following Golgi Maturation. *Pigment Cell Res.* **2005**, *18* (2), 122–129. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00213.x>.

- (9) García-Borrón, J. C.; Solano, F. Molecular Anatomy of Tyrosinase and Its Related Proteins: Beyond the Histidine-Bound Metal Catalytic Center. *Pigment Cell Res.***2002**, *15* (3), 162–173. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.02012.x>.
- (10) Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchettini, J. C.; Krebs, B. Crystal Structure of a Plant Catechol Oxidase Containing a Dicopper Center. *Nat. Struct. Biol.***1998**, *5* (12), 1084–1090. <https://doi.org/10.1038/4193>.
- (11) Tripathi, R. K.; Hearing, V. J.; Urabe, K.; Aroca, P.; Spritz, R. A. Mutational Mapping of the Catalytic Activities of Human Tyrosinase. *J. Biol. Chem.***1992**, *267* (33), 23707–23712. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35895-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35895-2).
- (12) Olivares, C.; García-Borrón, J. C.; Solano, F. Identification of Active Site Residues Involved in Metal Cofactor Binding and Stereospecific Substrate Recognition in Mammalian Tyrosinase. Implications to the Catalytic Cycle. *Biochemistry***2002**, *41* (2), 679–686. <https://doi.org/10.1021/bi011535n>.
- (13) Matoba, Y.; Kihara, S.; Bando, N.; Yoshitsu, H.; Sakaguchi, M.; Kayama, K.; Yanagisawa, S.; Ogura, T.; Sugiyama, M. Catalytic Mechanism of the Tyrosinase Reaction toward the Tyr98 Residue in the Caddie Protein. *PLoS Biol.***2018**, *16* (12), e3000077. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000077>.
- (14) Ketata, E. E.; Neifar, A.; Mihoubi, W.; Pigeon, P.; Gouzi, H.; Mallet, J.-M.; Top, S.; Gupta, G. K.; Jaouen, G.; Gargouri, A.; Arbi, M. E. The Inhibition of Tyrosinase by Some Aryl Butenes: A Desired Activity or a Side Effect to Avoid. *J. Organomet. Chem.***2017**, *848*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.07.031>.
- (15) Briganti, S.; Camera, E.; Picardo, M. Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.***2003**, *16* (2), 101–110. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00029.x>.
- (16) Kasraee, B. Peroxidase-Mediated Mechanisms Are Involved in the Melanocytotoxic and Melanogenesis-Inhibiting Effects of Chemical Agents. *Dermatol. Basel Switz.***2002**, *205* (4), 329–339. <https://doi.org/10.1159/000066439>.
- (17) Wu, L.-C.; Chen, Y.-C.; Ho, J.-A. A.; Yang, C.-S. Inhibitory Effect of Red Koji Extracts on Mushroom Tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.***2003**, *51* (15), 4240–4246. <https://doi.org/10.1021/jf034064f>.
- (18) Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Namasivayam, V. Skin Whitening Agents: Medicinal Chemistry Perspective of Tyrosinase Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.***2017**, *32* (1), 403–425. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256882>.

- (19) Lee, S. Y.; Baek, N.; Nam, T. Natural, Semisynthetic and Synthetic Tyrosinase Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.***2016**, *31* (1), 1–13. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1004058>.
- (20) Haudecoeur, R. Pharmacochimie des auronnes pour la modulation d'enzymes. phdthesis, Université de Grenoble ; Université de Genève. Faculté des sciences, 2011.
- (21) Hida, M. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Fès. **2010**.
- (22) Boukli-Hacene, F. Etude de l'interaction de quelques sels de métaux avec les sucres en solution aqueuse par modélisation moléculaire. Thesis, 2016.
- (23) Elhadj said, K. contribution à étude de l'inhibition d'enzyme par des tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Thesis, 2016.
- (24) Safa, L. Z. Prédiction in silico de la structure 3D et étude d'amarrage moléculaire de la xanthine oxydoréductase. Thesis, university center of abdalhafid boussouf - MILA, 2021.
- (25) Wassila, S.-L. Spécialité : Chimie Physique : Option : Chimie Théorique et Modélisation Moléculaire. 90.
- (26) Gabb, H. A.; Jackson, R. M.; Sternberg, M. J. Modelling Protein Docking Using Shape Complementarity, Electrostatics and Biochemical Information. *J. Mol. Biol.***1997**, *272* (1), 106–120. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1203>.
- (27) Fox, W.; Imbeau, L. M. *Statistiques sociales*; 1999.
- (28) La toxicité et son évaluation. 4.
- (29) Fioravanti, S.; Loreto, M. A.; Pellacani, L.; Tardella, P. A. A Facile Aziridination of Allylic and Homoallylic Cyclic Acetals. *Tetrahedron Lett.***1993**, *34* (27), 4353–4354. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79349-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79349-X).
- (30) Beautrait, A. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine FAT de la kinase d'adhérence focale FAK. phdthesis, Université Henri Poincaré - Nancy I, 2008.
- (31) Bitencourt-Ferreira, G.; de Azevedo, W. F. Docking with SwissDock. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ***2019**, *2053*, 189–202. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_12).
- (32) Dar, A. M.; Mir, S. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. **2017**. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000356>.
- (33) Martz, F. Développement d'une nouvelle méthode de docking basée sur les mécanismes enzymatiques et guidée par des groupes prosthétiques. phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2014.

- (34) *Modélisation des interactions protéine-petites molécules: étude de la relation structure – fonction dans le cas des lipases.* <https://123dok.net/document/lzgl82qo-modelisation-interactions-proteine-petites-molecules-relation-structure-fonction.html> (accessed 2022-06-25).
- (35) Sun, J.; Sun, G.; Meng, X.; Wang, H.; Luo, Y.; Qin, M.; Ma, B.; Wang, M.; Cai, D.; Guo, P.; Sun, X. Isorhamnetin Protects against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity In Vivo and In Vitro. *PLOS ONE***2013**, *8* (5), e64526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064526>.
- (36) Sun, B.; Sun, G.-B.; Xiao, J.; Chen, R.-C.; Wang, X.; Wu, Y.; Cao, L.; Yang, Z.-H.; Sun, X.-B. Isorhamnetin Inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Activation of the Intrinsic Apoptotic Pathway in H9c2 Cardiomyocytes through Scavenging Reactive Oxygen Species and ERK Inactivation. *J. Cell. Biochem.***2012**, *113* (2), 473–485. <https://doi.org/10.1002/jcb.23371>.
- (37) Calderón-Montaña, J. M.; Burgos-Morón, E.; Pérez-Guerrero, C.; López-Lázaro, M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.***2011**, *11* (4), 298–344. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>.
- (38) Huang, J.-H.; Huang, C.-C.; Fang, J.-Y.; Yang, C.; Chan, C.-M.; Wu, N.-L.; Kang, S.-W.; Hung, C.-F. Protective Effects of Myricetin against Ultraviolet-B-Induced Damage in Human Keratinocytes. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA***2010**, *24* (1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.015>.
- (39) Chang, C. J.; Tzeng, T.-F.; Liou, S.-S.; Chang, Y.-S.; Liu, I.-M. Myricetin Increases Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Protein Expression and Decreases Plasma Lipids and Adiposity in Rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.***2012**, *2012*, e787152. <https://doi.org/10.1155/2012/787152>.
- (40) Formica, J. V.; Regelson, W. Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.***1995**, *33* (12), 1061–1080. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00077-1).
- (41) Rivera, L.; Morón, R.; Sánchez, M.; Zarzuelo, A.; Galisteo, M. Quercetin Ameliorates Metabolic Syndrome and Improves the Inflammatory Status in Obese Zucker Rats. *Obes. Silver Spring Md***2008**, *16* (9), 2081–2087. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.315>.
- (42) Pan, F.; Li, J.; Zhao, L.; Tuersuntuoheti, T.; Mehmood, A.; Zhou, N.; Hao, S.; Wang, C.; Guo, Y.; Lin, W. A Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Study on the Interaction between Cyanidin-3-O-Glucoside and Major Proteins in Cow's Milk. *J. Food Biochem.***2021**, *45* (1), e13570. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13570>.

- (43) Duran, T.; Minatovicz, B.; Bai, J.; Shin, D.; Mohammadiarani, H.; Chaudhuri, B. Molecular Dynamics Simulation to Uncover the Mechanisms of Protein Instability During Freezing. *J. Pharm. Sci.***2021**, *110* (6), 2457–2471. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.002>.
- (44) Saluz, H.-P.; Köhler, M.; Mejevaia, T. *Microsystem Technology: A Powerful Tool for Biomolecular Studies*; Birkhäuser, 2012.
- (45) Macpherson, J. A.; Theisen, A.; Masino, L.; Fets, L.; Driscoll, P. C.; Encheva, V.; Snijders, A. P.; Martin, S. R.; Kleinjung, J.; Barran, P. E.; Fraternali, F.; Anastasiou, D. Functional Cross-Talk between Allosteric Effects of Activating and Inhibiting Ligands Underlies PKM2 Regulation. *eLife***2019**, *8*, e45068. <https://doi.org/10.7554/eLife.45068>.
- (46) Sahihi, M. In-Silico Study on the Interaction of Saffron Ligands and Beta-Lactoglobulin by Molecular Dynamics and Molecular Docking Approach. *J. Macromol. Sci. Part B***2016**, *55* (1), 73–84. <https://doi.org/10.1080/00222348.2015.1125066>.
- (47) Zhan, F.; Ding, S.; Xie, W.; Zhu, X.; Hu, J.; Gao, J.; Li, B.; Chen, Y. Towards Understanding the Interaction of  $\beta$ -Lactoglobulin with Capsaicin: Multi-Spectroscopic, Thermodynamic, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Approaches. *Food Hydrocoll.***2020**, *105*, 105767. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105767>.
- (48) Sahihi, M.; Ghayeb, Y. An Investigation of Molecular Dynamics Simulation and Molecular Docking: Interaction of Citrus Flavonoids and Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin in Focus. *Comput. Biol. Med.***2014**, *51*. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2014.04.022>.
- (49) Liu, M.-Q.; Li, J.-Y.; Rehman, A. U.; Xu, X.; Gu, Z.-J.; Wu, R.-C. Laboratory Evolution of GH11 Endoxylanase Through DNA Shuffling: Effects of Distal Residue Substitution on Catalytic Activity and Active Site Architecture. *Front. Bioeng. Biotechnol.***2019**, *7*.



# Résumés



## Résumé

La conception d'un nouveau médicament est un processus basé sur une méthode quasiment expérimentale, long, coûtant très cher à l'industrie pharmaceutique (au moins 800 millions de dollars). Avec le développement de l'outil informatique, des méthodes de modélisation moléculaire *in silico*, telle que le docking moléculaire, ont pris une place capitale dans le processus du drug design. ce travail qui consiste en l'étude et l'analyse d'un article scientifique se rapportant à la question intitulé «**Molecular Simulation Study on the Interaction between Tyrosinase and Flavonoids from Sea Buckthorn** », réalisé par **Li et al 2021**. Le but de cet article est d'étudier les interactions de quatre ligands de petites molécules avec la tyrosinase en vue de son inhibition. Ce travail fait appel à la bioinformatique où l'étude *in silico* en utilisant l'amarrage « docking » moléculaire et la simulation de dynamique moléculaire. Isorhamnétine, kaempférol, myricétine et quercétine sont quatre types de métabolites secondaires, qui ont un large éventail d'activités biologiques. Les résultats de l'amarrage moléculaire ont indiqué que ces quatre petites molécules peuvent tous s'ancrer dans le centre actif de la tyrosinase, et en occupant le centre du site actif, ils peuvent empêcher la liaison au substrat, réduisant ainsi l'activité catalytique de la tyrosinase. L'analyse par simulation de dynamique moléculaire de la trajectoire a montré que tous les complexes tyrosinase-ligand atteignent un équilibre en moins de 100 ns. De plus, la quercétine a l'énergie de liaison la plus faible parmi ces quatre ligands, et le complexe avec la tyrosinase est le plus stable. Cette étude contribue à la découverte d'inhibiteurs naturels efficaces de la tyrosinase.

**Mots clés** : Docking moléculaire, inhibiteur, Tyrosinase, Simulation moléculaire, métabolites secondaires.

## **Abstract**

The design of a new drug is a process based on an almost experimental method, long and very expensive for the pharmaceutical industry (at least 800 million dollars). With the development of computer tools, in silico molecular modeling methods, such as molecular docking, have taken a central place in the drug design process. this work which consists of the study and analysis of a scientific article relating to the question entitled “Molecular Simulation Study on the Interaction between Tyrosinase and Flavonoids from Sea Buckthorn”, carried out by Li et al 2021. The purpose of this article is to study the interactions of four small molecule ligands with tyrosinase with a view to its inhibition. This work uses bioinformatics or in silico study using molecular docking and molecular dynamics simulation. Isorhamnetin, kaempferol, myricetin and quercetin are four types of secondary metabolites, which have a wide range of biological activities. Molecular docking results indicated that these four small molecules can all dock in the active center of tyrosinase, and by occupying the center of the active site, they can prevent substrate binding, thereby reducing catalytic activity. of tyrosinase. Molecular dynamics simulation analysis of the trajectory showed that all tyrosinase-ligand complexes reach equilibrium in less than 100 ns. Moreover, quercetin has the lowest binding energy among these four ligands, and the complex with tyrosinase is the most stable. This study contributes to the discovery of effective natural tyrosinase inhibitors.

**Keywords:** Molecular docking, tyrosinase inhibitor, molecular simulation, secondary metabolites.

## الملخص

تصميم دواء جديد هو عملية تعتمد على طريقة شبه تجريبية وطويلة ومكلفة للغاية لصناعة الأدوية (800 مليون دولار على الأقل). مع تطوير أدوات الكمبيوتر ، في طرق النمذجة الجزيئية السيليكو ، مثل الالتحام الجزيئي ، احتلت مكاناً مركزياً في عملية تصميم الدواء. هذا العمل الذي يتكون من دراسة وتحليل مقال علمي يتعلق بالسؤال المعنون "Molecular Simulation Study on the Interaction between Tyrosinase and Flavonoids from "Sea Buckthorn" ، تم إجراؤه بواسطة Li et al 2021. والغرض من هذه المقالة هو دراسة تفاعلات أربعة جزيئات صغيرة مع التيروسيناز بهدف تثبيطها. يستخدم هذا العمل المعلوماتية الحيوية أو دراسة السيليكو باستخدام الالتحام الجزيئي ومحاكاة الديناميات الجزيئية. Isorhamnetin و kaempferol و myricetin و quercetin هي أربعة أنواع من المستقبلات الثانوية ، والتي لها مجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية. أشارت نتائج الالتحام الجزيئي إلى أن هذه الجزيئات الأربعة الصغيرة يمكن أن ترسو جميعها في المركز النشط للتيروسيناز ، وباحتلالها مركز الموقع النشط ، يمكنها منع ارتباط الركيزة ، وبالتالي تقليل النشاط التحفيزي للتيروسيناز. أظهر تحليل محاكاة الديناميكيات الجزيئية للمسار أن جميع مجمعات tyrosinase-ligand تصل إلى التوازن في أقل من 100 نانوثانية. علاوة على ذلك ، يحتوي الكيرسيتين على أقل طاقة ربط بين هذه الروابط الأربعة ، والمركب الذي يحتوي على التيروسيناز هو الأكثر استقراراً. تساهم هذه الدراسة في اكتشاف مثبطات التيروسيناز الطبيعية الفعالة.

**الكلمات المفتاحية:** الالتحام الجزيئي ، مثبطات التيروسيناز ، المحاكاة الجزيئية ، المستقبلات الثانوية..



Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : CHELLIL Djoumana  
LFRADA Cheima

## Evaluation *in silico* de l'inhibition de la tyrosinase par les molécules bioactives des plantes

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Bioinformatique

### Résumé

La conception d'un nouveau médicament est un processus basé sur une méthode quasiment expérimentale, long, coûtant très cher à l'industrie pharmaceutique (au moins 800 millions de dollars). Avec le développement de l'outil informatique, des méthodes de modélisation moléculaire *in silico*, telle que le docking moléculaire, ont pris une place capitale dans le processus du drug design. ce travail qui consiste en l'étude et l'analyse d'un article scientifique se rapportant à la question intitulé «Molecular Simulation Study on the Interaction between Tyrosinase and Flavonoids from Sea Buckthorn », réalisé par Li et al 2021. Le but de cet article est d'étudier les interactions de quatre ligands de petites molécules avec la tyrosinase en vue de son inhibition. Ce travail fait appel à la bioinformatique où l'étude *in silico* en utilisant l'amarrage « docking » moléculaire et la simulation de dynamique moléculaire. Isorhamnétine, kaempférol, myricétine et quercétine sont quatre types de métabolites secondaires, qui ont un large éventail d'activités biologiques. Les résultats de l'amarrage moléculaire ont indiqué que ces quatre petites molécules peuvent tous s'ancrer dans le centre actif de la tyrosinase, et en occupant le centre du site actif, ils peuvent empêcher la liaison au substrat, réduisant ainsi l'activité catalytique de la tyrosinase. L'analyse par simulation de dynamique moléculaire de la trajectoire a montré que tous les complexes tyrosinase-ligand atteignent un équilibre en moins de 100 ns. De plus, la quercétine a l'énergie de liaison la plus faible parmi ces quatre ligands, et le complexe avec la tyrosinase est le plus stable. Cette étude contribue à la découverte d'inhibiteurs naturels efficaces de la tyrosinase.

**Mots-clefs :** Docking moléculaire, inhibiteur, Tyrosinase, Simulation moléculaire, métabolites secondaires.

### Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales (Université Frères Mentouri Constantine 1).

**Encadreur :** BELLIL Ines (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 1 :** GHERBOUDJ Amira (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2 :** BENCHIHEUB Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).