

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Amar Telidji -Laghouat
Faculté des Sciences
Département de Biologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

**Etude *in silico* de l'inhibition de la tyrosinase (EC 1. 14. 18. 1) par
quelques acides carboxyliques.**

Par :

M^{lle}. HADJADJ Myriam Widade

Devant le jury composé de :

LEBOUKH Mourad	MAA	Président
ZERROUKI Mohamed Houcine	MAA	Examineur
GOUZI Hicham	Prof	Promoteur

Année Universitaire 2022- 2023

Remerciements

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

Après un long parcours mon mémoire touche à sa fin.

Je tiens à remercier mon encadreur M. GOUZI Hicham, Professeur à l'Université de Ammar Téliidji de Laghouat pour m'avoir encadrée.

Durant toute la période de préparation du mémoire, pour tout le temps qu'il a consacré à me former, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi de ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à M. ZERROUKI Mohamed Houcine et M. LEBOUKH Mourad pour avoir fait l'honneur de participer au jury de ce mémoire.

Enfin, je remercie toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

La tyrosinase est une enzyme responsable du brunissement indésirable des fruits et légumes. Les acides carboxyliques inhibent cette enzyme en se fixant sur son site actif. Les résultats de docking moléculaire ont indiqué que l'acide benzoïque, l'acide

Pour une mémoire dans le domaine des sciences biochimie, je dédie ce travail :

A mes très chers parents, qui m'ont bien élevé et appris le droit chemin vers la réussite dans ma vie.

A mon oncle le Professeur HADJAJ Abdel Chafik, à qui je dois beaucoup de respect et de reconnaissance pour tous ses encouragements depuis le jour où j'ai commencé mes études.

A mon mari pour m'avoir supporté et soutenu durant de longues années d'étude.

A mon petit bébé d'amour qui m'ont porté bonheur.

A toute ma famille et tous mes amis.

A tous mes professeurs est surtout le Professeur GOUZI Hicham qui m'a aidé durant ce travail.

salicylique et l'acide citrique inhibent fortement la tyrosinase avec les scores de docking suivants : -4,14 kcal/mol, -4,26 kcal/mol et -5,15 kcal/mol. La visualisation des interactions entre l'acide citrique et la tyrosinase permet d'expliquer que la Met280 et l'Asn260 sont impliqués dans les interactions responsables de l'activité inhibitrice. L'acide citrique n'est pas toxique et peut être utilisé dans le domaine agro-alimentaire pour le contrôle du brunissement enzymatique des fruits et légumes.

Mots clés : Docking, inhibition, tyrosinase, acides carboxyliques.

Abstract

Dédicace..... I

Tyrosinase is an enzyme responsible for the undesirable browning of fruits and vegetables. Carboxylic acids inhibit this enzyme by binding to its active site. Molecular docking results indicated that benzoic acid, salicylic acid and citric acid inhibit strongly tyrosinase with the following docking scores: -4.14 kcal/mol, -4.26 kcal/mol and - 5.15 kcal/mol. The visualization of the interactions between citric acid and tyrosinase indicate that Met280 and Asn260 are involved in the interactions responsible for the inhibitory activity. Citric acid is not toxic and can be used in the food industry to control enzymatic browning of mushroom during its storage.

Keywords: Docking, inhibition, tyrosinase, carboxylic acids.

ملخص

التيروزيناز هو إنزيم مسؤول عن اللون البني غير المرغوب فيه للفواكه والخضروات. تمنع الأحماض الكربوكسيلية هذا الإنزيم من خلال الارتباط بموقع النشط. أشارت نتائج النمذجة الجزيئية إلى أن حمض البنزويك ، حمض الساليسيليك وحمض الستريك يثبطان بقوة التيروزيناز بعشرات من الأضعاف التالية: -4.14 كيلو كالوري / مول ، -4.26 كيلو كالوري / مول و -5.15 كيلو كالوري / مول. التصور تشرح التفاعلات بين حامض الستريك والتيروزيناز أن يشارك Met280 و Asn260 في التفاعلات المسؤولة عن النشاط المثبط. حمض الستريك غير سام ويمكن استخدامه في الزراعة الغذاء للسيطرة على اللون البني الإنزيمي للفواكه والخضروات.

الكلمات المفتاحية: النمذجة الجزيئية، النشط، تيروزيناز ، أحماض الكربوكسيلية.

Remerciements.....	II
Résumé.....	III
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	3
1. Généralités su la tyrosinase	25
1.1 Classification de la tyrosinase.....	
1.2 Mécanisme réactionnelle.....	
1.3 Le site actif.....	
1.4 Source, localisation et rôle.....	
1.4.1 Source et localisation.....	
1.4.2 Rôle	
1.5 Méthodes de détermination de l'activité tyrosinase.....	
2. Docking moléculaire.....	
2.1 Définition.....	
2.2 Etude in silico.....	
2.3 Les étapes de docking.....	
2.3.1 Le Docking	
2.3.2 Le Scoring.....	
2.4 Les types de docking moléculaire.....	
2.5 Ligand.....	
2.5 Récepteur.....	
2.6 Programmes.....	
2.8. Protocole général du docking.....	
Materiels et méthodes.....	
2- Matériels.....	
2.1 Micro-ordinateurs.....	
2.2 Les bases des données.....	
2.2.1 PDB (Protein Data Bank).....	
2.2.2 PubChem.....	
2.3. Les programmes.....	
3. Méthodes.....	
3.1 Préparation de l'enzyme : 2Y9X.....	
3.2 Repérage du site actif	
3.3 Les structure des acides carboxyliques.....	

3.4. Evaluation de logiciel de docking moléculaire.....

Résultats et Discussion.....

1. Analyse des performances de l'étape de docking.....

2. Evaluation de l'énergie d'interaction.....

2.1. Analyse des diagrammes d'interaction.....

2.1.1 Le complexe tyrosinase-acide benzoïque.....

2.1.2. Le complexe tyrosinase-acide citrique.....

2.1.3 Le complexe tyrosinase-acide oxalique.....

2.1.4 Le complexe tyrosinase-acide salicylique.....

2.1.5 Le complexe tyrosinase-tropolone.....

Conclusion.....

Références bibliographiques.....

INTRODUCTION

Introduction

Le champignon de Paris (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach) a une durée de conservation très courte. Ils perd sa valeur commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d'eau, l'attaque microbienne et le brunissement (Whitaker et Lee, 1995 ; Jolivet et al., 1998). Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables du champignon (Varoquaux, 1978 ; Martinez et Whitaker, 1995). La prévention de cette réaction constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires.

Le brunissement résulte de l'oxydation des phénols catalysée principalement par la tyrosinase (EC 1. 14. 18. 1) qui est métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995; Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

En présence de l'oxygène moléculaire, la tyrosinase est capable d'hydroxyler les monophénols en o-diphénols (activité crésolasique) et d'oxyder ces derniers en o-quinones (activité catécholasique). Ces derniers se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelé mélanine.

En raison de sa participation majeure aux effets indésirables du brunissement enzymatique, la tyrosinase est devenue l'objet de toutes les attentions des chercheurs traitant de l'agro-alimentaire. Les acides carboxyliques sont parmi les inhibiteurs de la tyrosinase les plus utilisés pour le contrôle du brunissement des fruits et des légumes (Pifferi et al., 1974). Leur mécanisme d'action à l'échelle moléculaire n'a pas été étudié.

L'utilisation des approches *in silico* dans le domaine d'enzymologie est devenue de plus en plus importante et est même désormais cruciale.

L'objectif de notre travail est :

- Dans un premier temps, de tester et d'évaluer la fiabilité de programme choisi « MOE » pour réaliser le docking moléculaire, en utilisant le test de RMSD.
- Dans un deuxième temps, d'évaluer le mécanisme moléculaire de l'inhibition de la tyrosinase par quelques acides carboxyliques (acide oxalique, acide citrique, acide benzoïque et acide salicylique) en utilisant l'amarrage moléculaire.

Introduction

Notre travail est organisé en deux parties. La première partie concerne un rappel bibliographique sur la tyrosinase et le docking moléculaire. Dans la deuxième partie, nous précisons le matériel et les méthodes utilisées pour l'obtention des structures des cibles étudiées et celles des ligands nécessaires pour effectuer le docking moléculaire par le logiciel MOE, tout en détaillant le protocole de docking ainsi que l'interprétation des résultats. Cette partie sera suivit par une conclusion générale.

Rappels bibliographiques

1. Généralités su la tyrosinase

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La tyrosinase (CE 1.14.18.1) est une enzyme contenant du cuivre qui catalyse l'hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation de l'o-diphénols (activité diphénolase), conduisant à la formation de pigments brun foncé. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont portées sur son rôle clé dans de la formation de la mélanine.

En fait, l'activité monophénolase et l'activité diphénolase de la tyrosinase sont de grande importance dans l'industrie alimentaire. D'une part, dans les fruits et légumes, tyrosinase est responsable du brunissement important qui se produit sur meurtrissures au stockage après la récolte. D'autre part, l'activité de la tyrosinase est souhaitée pour la production de propriétés organoleptiques distinctes comme dans les raisins secs, le cacao et feuilles de thé fermentées (Zawistowski et al., 1991).

1.1 Classification de la tyrosinase

La tyrosinase est une oxygénase oxydoréductase. La classification et la spécificité de cette enzyme demeure difficile a distingué et sont quelque peu ambiguës (Burton, 1994 ; Zawistowski et al., 1991). De nos jours, on accepte généralement que la tyrosinase (Tyr: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase; EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire: l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des o-diphénols aux o-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase) (Figure 1).

1.2 Mécanisme réactionnelle

En sachant que Le complexe tyrosinase renferme des structures capables de reconnaître et de s'associer avec : soit des glucanes, soit des peptidoglycanes soit encore des lipopolysaccharides provenant de micro-organismes et d'engendrer une cascade de réactions d'activation en réponse à cette association. Parmi les enzymes activées il y a une sérine protéase qui agira sur la tyrosinase et la

Chapitre 1

transformera en phénol oxydase dont l'activité est essentiellement dirigée vers l'oxydation de la tyrosine.

La spécificité dépend de la structure de l'enzyme et des substrats, mais également des conditions expérimentales.

La nature et la position des substituants sur les mono ou les o-diphénols sont déterminants pour la réactivité du substrat vis-à-vis de l'enzyme. L'affinité la plus faible est dirigée vers les substitutions en position méta (Mayer, 1987 ; Zawistowski et al., 1991).

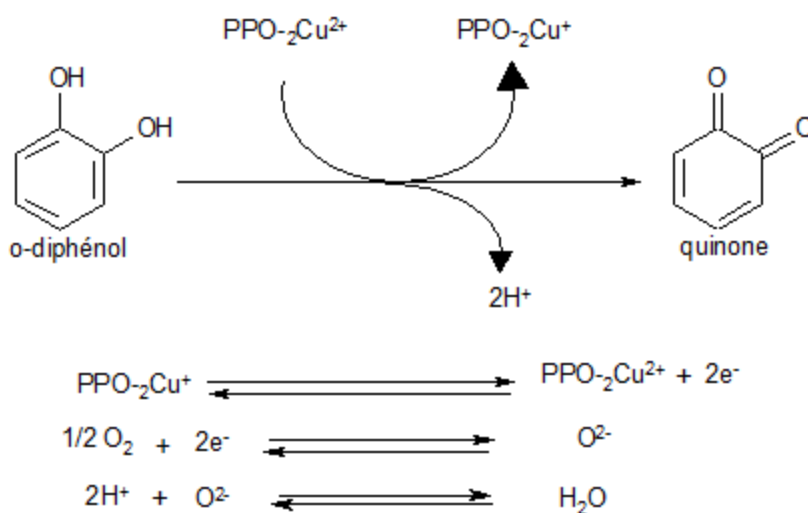


Figure 1. Les différentes réactions engendrées par les tyrosinases.

1.3 Le site actif

Dans la cavité catalytique de l'enzyme se trouve deux atomes de cuivre (site actif catalytique) entourés par quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7 ; Figure N°2). Ces deux ions sont entourés par d'autres hélices, α_1 et α_4 , et plusieurs coudes β . Le CuA est coordonné par les résidus His88, His109 et His118. Le résidu His88 est situé au milieu de l'hélice α_2 , tandis que His109 et His118 se situent au niveau de l'hélice α_3 . De son côté, le second cuivre catalytique, CuB, est coordonné par les résidus His240, His244 et His274 qui se trouvent au niveau des hélices α_6 et α_7 (Decker et Jaenicke, 2004).

Chapitre 1

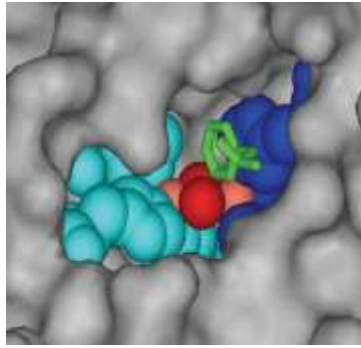


Figure 4 : Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke, 2004).



Figure 3. L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

1.4 Source, localisation et rôle

1.4.1 Source et localisation

Les tyrosinases ont été découvertes initialement dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris, les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (Burton, 1994; Whitaker, 1995; Claus et Decker, 2006). La localisation subcellulaire de la tyrosinase n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski et al., 1991 ; Mayer et Harel, 1979). Chez les plantes saines, la tyrosinase est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le

Chapitre 1

cytoplasme des fruits murs ou endommagées (Mayer et Harel, 1979; Zawistowski et al., 1991).

Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker, 2006). La distribution de la tyrosinase dans les différentes parties des fruits et légumes, peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble dépend de l'espèce, de l'âge, et dans les fruits ou les légumes, de la maturité (Vâmos-Vigyâzô, 1981). Le niveau de l'activité de la tyrosinase dans les plantes dépend de l'espèce, de la maturité, de l'âge et du stockage.

1.4.2 Rôle

Dans les plantes, les tyrosinases jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi, contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995). La tyrosinase est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Whitaker, 1995). Chez les insectes, la tyrosinase est impliquée dans la sciérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine. Elle peut induire, des modifications anti-nutritive des protéines végétales pour en faire des antinutritionnels, décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes. Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Vâmos-Vigy Zawistowski et al., 1991). L'activité tyrosinase joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel, 1991).

1.5 Méthodes de détermination de l'activité tyrosinase

L'activité de la tyrosinase peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. La vitesse de disparition du substrat peut être mesurer, par l'absorption de l'oxygène dissout par la technique de Warburg ou, par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Gauillard et al., 1993). La vitesse de formation du produit peut être déterminée, par méthode spectrophotométrique, en mesurant la densité optique des composés colorés (o-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la tyrosinase (Vâmos-Vigyâzô, 1981; Zawistowski et al., 1991). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple: le catéchol, le 4-

Chapitre 1

méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique (Vâmos-Vigyâzô, 1981).

2. Docking moléculaire

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*.

Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée.

2.1 Définition

Le docking ou l'amarrage moléculaire décrit un processus dans lequel une molécule (ligand) est placée dans le site actif d'une protéine cible dans un espace tridimensionnel (3D). Deux aspects sont importants : la prédiction de l'affinité du complexe ligand-protéine, et la prédiction de la position correcte du ligand dans le site actif de la protéine. La prédiction d'affinité est liée à différents ligands de la collection, certains conviennent mieux que d'autres. La prédiction de position est liée à la même molécule de ligand mais dans des orientations différentes. L'objectif du docking consiste généralement à déterminer la manière dont ces molécules s'arrangent les unes par rapport aux autres tout en prenant compte de l'environnement de leurs acides aminés.

2.2 Etude *in silico*

Par analogie avec les expressions *in vivo* et *in vitro*, le terme « *in silico* » a été introduit pour qualifier les méthodes numériques mises en œuvre pour traiter de tels systèmes. De par son nom, ce terme fait référence au silicium, matériel principal retrouvé dans les puces informatiques de tous les ordinateurs. *In silico* c'est un modèles biomathématiques utilisant des bases de données issues d'expérimentation *in vivo* ou *in vitro*, permettant d'analyser, grâce à des logiciels informatiques, les propriétés recherchées ou indésirables d'une substance en fonction de sa structure ou de sa réactivité, et de raccourcir les temps de recherche (Gallezot G, et al.2002).

2.3 Les étapes de docking

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

2.3.1 Le Docking : Le docking (ancrage ou amarrage) est l'expression donnée aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches chimique, physique et biologique sont combinées pour étudier au niveau atomique les interactions entre deux molécules est l'étape de sélection.

Le docking consiste 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.

2.3.2 Le Scoring : 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 proposées.

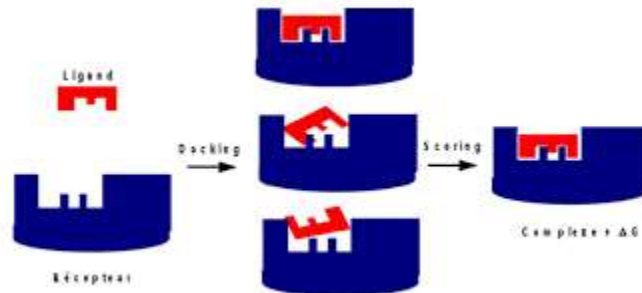


Figure 2 : Principe générale d'un programme de docking moléculaire.

2.4 Les types de docking moléculaire

Il ya trois types de docking moléculaire :

- Docking corporel rigide: docking de ligand flexible et docking flexible.
- Docking corporel rigide : où les récepteurs et les petites molécules sont traités comme ennuyeux.
- Docking de ligand flexible : où le récepteur reste rigide mais le ligand est considéré comme souple (flexible).
- Docking flexible : compte tenu de la flexibilité des récepteurs et des ligands.

Chapitre 1

2.5 Ligand

Un ligand est une molécule qui se lie de manière non-covalente et spécifique à une macromolécule ciblée, une protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel: stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal. Dans l'amarrage moléculaire, la sélection des ligands est une étape très importante.

Ce choix doit être pertinent car la spécificité du site actif d'intérêt évite les tests moléculaires inutiles car le ligand permet d'améliorer ce changement conformationnel. Par conséquent, cette modification structurelle peut moduler son état fonctionnel et son activité.

2.5 Récepteur

Un récepteur est une macromolécule, généralement une protéine spécialisée qui peut se lier spécifiquement et de manière réversible à une autre molécule appelée ligand. Les structures 3D que nous utilisons proviennent de la Protein Data Bank (PDB), un référentiel mondial d'informations sur les structures 3D des macromolécules biologiques : principalement des protéines et des acides nucléiques (ARN et ADN). Les structures tridimensionnelles (3D) sont issues principalement de l'analyse par diffraction des rayons X, par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par modélisation moléculaire. Les différentes conformations tridimensionnelles peuvent être téléchargées sous l'extension PDB, qui peut être lue par un logiciel de docking et contient diverses informations sur la protéine.

2.6 Programmes

Un logiciel est un ensemble de programmes qui permet à un ordinateur ou à un système informatique d'assurer une tâche ou une fonction en particulier, procédés et règles, et éventuellement de la documentation, relatifs au fonctionnement d'un ensemble de traitement de données (Par opposition au matériel). Un programme de docking moléculaire a pour but de prédire correctement le mode d'interaction entre deux entités chimiques, et de reconnaître parmi ceux –ci lequel est le meilleur. Il existe actuellement plusieurs programmes de docking moléculaire parmi ses programmes nous avons aptère pour le programme Avogadro.

Chapitre 1

Avogadro est un éditeur et un visualiseur avancé de molécules. Il est multi-plateformes et conçu pour le calcul scientifique en chimie, la modélisation moléculaire, la bio-informatique, la science des matériaux et autres champs de recherche connexes. Ses principales qualités sont un rendu flexible et un robuste système de plugins. Avogadro supporte la plupart des types de fichier de représentation moléculaire. Il peut ainsi servir à visualiser une structure en 3D comme JMol, mais il permet également de concevoir des molécules, atome par atome, sans se soucier de la structure, le logiciel ordonnant lui-même la molécule ainsi formée par calcul des champs de force.

La fonction de visualisation comprend beaucoup d'options : sphères, bâtonnets, fil de fer, ...etc. On peut également faire apparaître des informations comme le nom des atomes, leur taille, les distances inter-atomes, les angles, etc. La création de molécules est vraiment simplifiée par l'ergonomie du logiciel et est accessible à des élèves de collège.

Autant il existe pléthore de logiciels de visualisation moléculaire, qu'ils soient libres ou non libres ; autant Avogadro est l'un des seuls logiciels permettant de construire des molécules. Ce logiciel peut remplacer avantageusement les modèles moléculaires utilisés au collège et au lycée en chimie. La construction n'est pas limitée par le nombre d'éléments dans une boîte, ni le nombre de liaisons, et l'étape de calcul des champs de forces permet de mieux comprendre les géométries des molécules.

2.7. Les interactions récepteur-ligand

Les interactions protéine-ligand sont assez spécifiques ; même si de nombreux ligands potentiels entourent une protéine cellulaire à un moment donné, un seul ligand particulier peut se lier à cette protéine. De plus, un ligand ne se lie qu'à une zone dédiée à la surface de la protéine, connue sous le nom de site de liaison du ligand. La spécificité du site de liaison au ligand d'une protéine est déterminée par la disposition de sa chaîne d'acides aminés qui donne à la zone sa forme et sa réactivité chimique. Par conséquent, un site de liaison au ligand fournit une forme complémentaire à son ligand et maintient le ligand en place via des interactions chimiques. Ces interactions chimiques sont souvent non covalentes ; cependant, étant donné que ces interactions sont réversibles et faibles, bon nombre de ces interactions doivent se produire simultanément pour maintenir ensemble la protéine et le ligand. La recherche sur la

Chapitre 1

la liaison des ligands est importante pour comprendre les fonctions des protéines et la manière dont elles exécutent des processus cellulaires spécifiques à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques. En outre, cette recherche permet également aux scientifiques de concevoir des médicaments avec des interactions spécifiques et des effets secondaires minimes en ciblant le site de liaison au ligand d'une protéine impliquée. De nombreux types d'interaction non covalente, ont été mis en évidence dans les complexes protéine- ligand. Parmi les interactions qui peuvent exister entre le ligand et la protéine on cite celles de type polaire (liaisons hydrogène, liaisons ioniques) et celles de type hydrophobe qui résultent d'un contact entre des groupements hydrophobes.

2.8. Protocole général du docking

Les approches utilisées actuellement sont exclusivement calculatoires et évaluées par des outils de visualisation. Ces approches peuvent être décomposées en quatre à cinq phases successives : Choix du mode de représentation de la protéine (tous les atomes, pseudo-atome, grille), exploration conformationnelle (corp-rigide, position/orientation, du ligand et/ou flexible position/orientation/forme du ligand), minimisation de la fonction d'évaluation de l'énergie d'interaction (ou fonction de score) des conformations issues de l'exploration, regroupement par ressemblance et classification par évolution plus fine de score, accompagnée d'une étape non automatique d'évaluation visuelle des résultats lorsque le score ne permet pas de discriminer la conformation native des différentes conformations générées.

- Une étape optionnelle d'affinement des complexes sélectionnés par minimisation ou dynamique moléculaire.

Un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de mode de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison

MATERIELS ET METHODES

2- Matériels

2.1 Micro-ordinateurs

Dans cette étude, nous avons utilisé, un micro HP Pro 3500 avec une mémoire RAM 8 GO, un processeur intel(R) (Core(TM) i3-2120M CPU @ 3.30 GHz 3.30 GHz) et une carte graphique NVIDIA 2 GO (GeForce GT 610/PCIe/SSE2).

2.2 Les bases des données

2.2.1 PDB (Protein Data Bank)

La banque de données des protéines PDB (Protein Data Bank) est la principale source de données de biologie structurale, elle permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont principalement déterminées par la cristallographie à rayons X et la RMN.

2.2.2 PubChem

C'est une banque de données américaine de molécules chimiques gérée par le NCBI (National Center for Biotechnology Information), branche de la bibliothèque nationale de médecine des États-Unis sous l'autorité de la NIH (National Institute of Health) (Murray, 2001). Elle répertorie plusieurs millions de composés, principalement des petites molécules, mais également des molécules plus grandes telles que les nucléotides, les glucides, des lipides, des peptides et des macromolécules en mettant en ligne gratuitement leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques.

2.3. Les programmes

MOE (Molecular Operating Environment) : Le logiciel MOE 2015 (Chemical Computing Group Inc) est utilisé pour préparer la protéine et les ligands. Il permet également de prédire comment les ligands se lient avec le site actif de la tyrosinase.

Avogadro : Le logiciel Avogadro est utilisé pour réduire l'énergie des ligands et d'ajouter la charge électrique.

Schrödinger suite 2023-2 : Ce logiciel est utilisé pour visualiser les interactions des ligands avec le site actif de l'enzyme et de déterminer aussi le type de liaison et d'acide aminés.

3. Méthodes

3.1 Préparation de l'enzyme : 2Y9X

D'après la base de données PDB, il existe plusieurs structures et de différentes origines. Dans un premier temps, le choix a été fixé pour l'enzyme tyrosinase de champignon de paris, ce choix est justifié par la recherche de plusieurs ligand qui réagit avec le site actif de se dernier et surtout les acide carboxylique. La banque de données PDB nous à proposer plusieurs structures complexe cristallographiques différentes.

Partant de la séquence du complexe tyrosinase-tropolone, téléchargée a partir de la banque de données PDB sous l'extension (2Y9X.pdb), on a procédé d'abord à l'élimination des molécules d'eau et toutes les chaines peptidiques sauf la chaine A, puis la protonation de la structure en fixant les paramètres par défaut du logiciel, puis à l'opération de correction de la structure afin de réparer les cassures induites par la diffraction aux rayon X, pour arriver en fin à la dernière étape qui consiste à la minimisation de l'énergie de la structure. L'enzyme ainsi préparée a été enregistrée sous le format (.moe) (Figure 1).

3.2 Repérage du site actif

Dans le docking moléculaire, il est très important de savoir sur quel site actif de l'enzyme doit-on réaliser notre docking, c'est la raison pour laquelle on a choisi une enzyme en complexe avec son inhibiteur qui est la tropolone. La sélection de la molécule tropolone, initialement en complexe avec l'enzyme dans la structure 2Y9X, nous a permis de distinguer le site actif qui est composé de six résidus d'histidine ((His85, His61, His94, His259, His263 and His296), une zone hydrophobe (Val248, Phe264, Val283 et Pro284) et une zone hydrophyle (Glu189 et Arg268) (Figure 2).



Figure 1. Structure 3D du complexe tropolone-tyrosinase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*, 2Y9X) avec le tropolone.

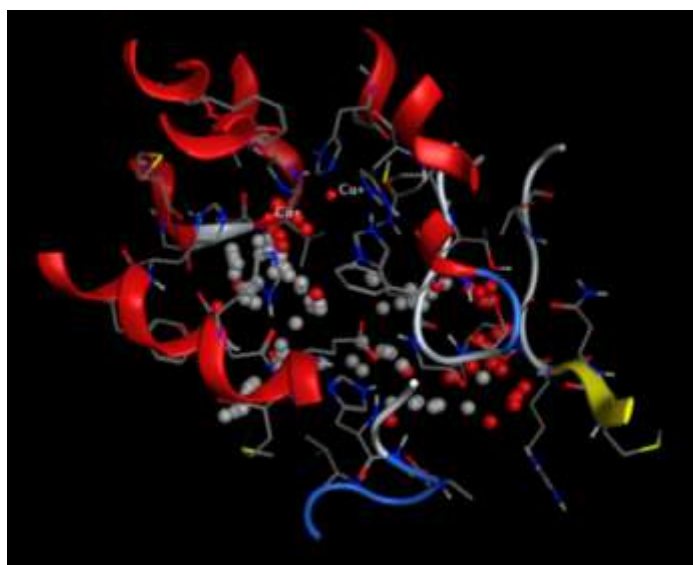
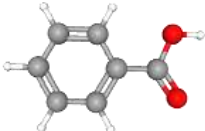
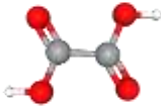
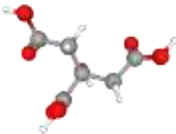
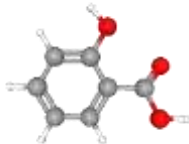


Figure 2. Structure du Site d'interaction de la tyrosinase avec les ligands.

3.3 Les structure des acides carboxyliques

Les structures 2D des 4 composés carboxyliques ont été préparé au format SDF de la base de donner Pubchem et convertis au format mol à l'aide du programme MOE pour l'amarrage moléculaire (Tableau 1).

Tableau 01 : structure 2D des quatre ligand et leur code en Pubchem.

Nom du ligand	Structure 2D	Code Pubchem CID
Acide benzoïque		CID : 243
Acide oxalique		CID : 971
Acide citrique		CID :31
Acide salicylique		CID:338

3.4. Evaluation de logiciel de docking moléculaire

Avant de docker les molécules étudiées comme des inhibiteurs de la tyrosinase, il est nécessaire de tester les performances de prédiction du modèle de docking que nous avons développé avec le logiciel MOE en calculant l'écart quadratique moyen ou RMSD. D'après Roselan et al. (2021) une pose dockée est acceptable lorsque la valeur RMSD est inférieure à 2.0 Å°.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyse des performances de l'étape de docking

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la tyrosinase par les acides carboxyliques et la tropolone, nous avons jugé utile d'évaluer tout d'abord la performance du programme MOE utilisé dans cette étude en faisant appel à l'écart quadratique moyen ou le RMSD (Root Mean Square Deviation) et l'analyse visuelle.

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par le programme de docking. Un seuil maximal de 2Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne d'une mauvaise position.

À la lumière des résultats du test RMSD et l'analyse visuelle, nous pouvons conclure que le programme MOE est performant et fiable pour simuler l'inhibition de la tyrosinase (Tableau 1).

Tableau 1 : Les valeurs du RMSD pour les meilleures poses de docking moléculaire entre les ligands et la tyrosinase obtenues à l'aide du programme MOE.

Ligand	RMSD (Å)
Acide benzoïque	1.55
Acide citrique	1.19
Acide salicylique	1.35
Acide oxalique	0.65
Tropolone	1.28

La gamme de valeurs RMSD des poses de plus basse énergie (tableau 7) s'étend de 0,65 à 1,55 Å. Notons toutefois que nous avons choisi seulement la conformation de la pose native ayant le plus petit RMSD.

2. Evaluation de l'énergie d'interaction

Afin d'étudier, à l'échelle moléculaire le mode d'interaction des acides carboxyliques et la tropolone comme standard avec le site actif de la tyrosinase, nous avons fait appel au docking moléculaire.

La deuxième étape essentielle du docking concerne l'estimation de l'énergie d'interaction des poses. Les poses natives doivent présenter une énergie d'interaction suffisamment favorable pour être distinguées de l'ensemble des poses générées. D'après les résultats regroupés dans le tableau 2, nous pouvons dire que l'ensemble des valeurs des énergies de liaisons obtenues par amarrage moléculaire des ligands testés avec la tyrosinase peuvent former de façon spontanément, des complexes binaires thermodynamiquement favorables.

D'après Roselan et al. (2021), l'énergie de liaison peut être définie comme la quantité d'énergie nécessaire pour séparer le ligand de son récepteur. Par conséquent, la tropolone et l'acide citrique sont les mieux combinées avec la tyrosinase avec des énergies d'interaction les plus faibles de -5,29 et -5,15 Kcal/mol, respectivement. Alors que les autres acides carboxyliques se lient avec des énergies libres de liaison plus faibles.

Tableau 1 : Résultats des énergies libre d'interaction des ligands avec la tyrosinase obtenues à l'aide du programme MOE.

Acides carboxyliques	Energie libre d'interaction (Kcal/mol)
Acide benzoïque	-4.14
Acide citrique	-5.15
Acide salicylique	-4.26
Acide oxalique	-3.06
Tropolone	-5.29

2.1. Analyse des diagrammes d'interaction

2.1.1 Le complexe tyrosinase-acide benzoïque

L'analyse visuelle montre que l'acide benzoïque forme une liaison hydrogène avec la Met280 du site actif de la tyrosinase (Figure 3). Il faut également souligner l'intervention des résidus His85, Val283 et le cuivre 400-401 dans la stabilité du complexe tyrosinase-acide benzoïque en s'impliquant dans la formation de nombreuses interactions de type hydrophobe.

2.1.2. Le complexe tyrosinase-acide citrique

L'analyse visuelle du complexe tyrosinase-acide citrique révèle la présence de 2 ponts hydrogène : le premier est formé entre l'hydrogène de la fonction carboxylique de l'inhibiteur et la Met280 (Figure 1). La deuxième liaison hydrogène est constatée entre une autre fonction carboxylique de l'inhibiteur et le résidu Asn260. La stabilité de l'acide citrique au sein du site actif de la tyrosinase est assurée également par de nombreuses interactions, ionique et hydrophobique faisant intervenir les résidus : Val283, Phe264, His85, His263 et Glu256.

2.1.3 Le complexe tyrosinase-acide oxalique

D'après le diagramme d'interaction (Figure 2), le complexe tyrosinase-acide oxalique est stabilisé grâce aux interactions hydrophobiques (His263 et Val283) et une seule liaison hydrogène forme entre la fonction acide de l'inhibiteur et le résidu Asn260.

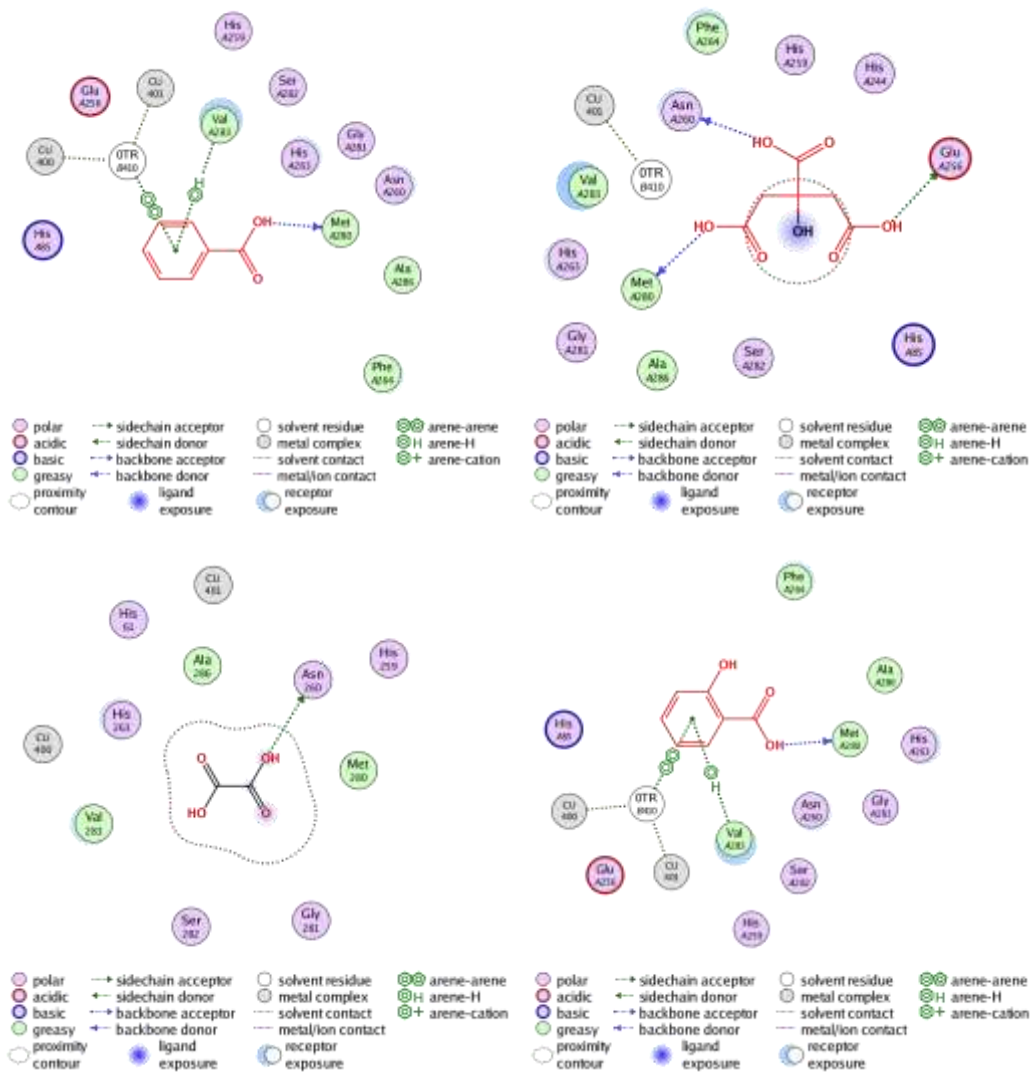
2.1.4 Le complexe tyrosinase-acide salicylique

L'analyse visuelle du complexe tyrosinase-acide oxalique montre la présence de deux ponts hydrogène : le premier est formé entre l'hydrogène de la fonction carboxylique de l'inhibiteur et la Met280 (Figure 1). La deuxième liaison hydrogène est constatée entre le cycle aromatique de l'inhibiteur et le résidu Val283. La stabilité de l'acide oxalique au sein du site actif de la tyrosinase est maintenue aussi à l'aide de nombreuses interactions, ionique et hydrophobique faisant intervenir les résidus d'acide aminés, His263, Val283, His85, Phe264, Asn260, et Glu256 et les ions Cu (400-401).

2.1.5 Le complexe tyrosinase-tropolone

Le tropolone est utilisé comme standard dans notre étude puisqu'il s'agit d'un inhibiteur puissant de la tyrosinase et se fixe aux acides aminés du site actif. L'analyse du diagramme d'interaction (Figure 1) indique la présence de deux liaisons hydrogène

entre le groupement hydroxyle et la partie cyclique de l'inhibiteur et les résidus Glu256 et Val283, respectivement. Le complexe tyrosinase-tropolone est stabilisé également par la participation des liaisons hydrophobes de la Val283, His263, Phe264, His85 et Asn260. La tropolone forme aussi une liaison hydrophobe avec le Cu401. De meme, Roslan et al. (2021) ont trouvé que le complexe de la tyrosinase-tropolone est stabilisé grâce aux interactions hydrophobes des acides aminés suivants : Asn260, Phe264, Gly281, Ser282, Val283, Ala286.



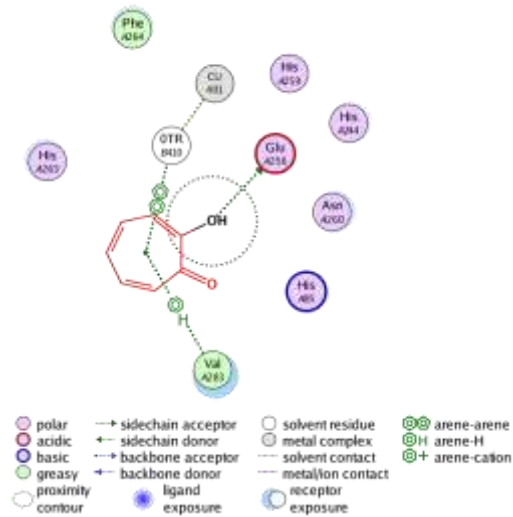


Figure 1. Digramme d'interaction entre les différents ligands étudiés et le site actif de la tyrosinase obtenu à l'aide du programme MOE.

Nos résultats, sont en parfaite concordance avec la littérature. Lima et al. (2014) suggèrent que le résidu Met280 joue un rôle crucial dans l'inhibition de la tyrosinase via des liaisons hydrogènes et des forces de van der Waals. Shang et al. (2018) ont signalé que la fixation de l'inhibiteur à la Met280 situé à proximité du résidu histidine qui est essentiel pour la catalyse, peut interférer avec la fixation du substrat de la tyrosinase.

Le site actif de la tyrosinase est constitué de trois régions. La première région est une poche de fixation du substrat qui contient six résidus histidine entourés par une paire de cuivre. La deuxième région est hydrophobe constituée par les résidus Val248, Phe264, Val283 et Pro284. La troisième région est exposée au solvant et constituée de Glu189 et Arg268.

La simulation par docking moléculaire révèle que les acides carboxyliques ainsi que la tropolone se fixent avec la première et la deuxième région du site actif de la tyrosinase. Par conséquent, les acides carboxyliques bloquent la fixation du substrat de la tyrosinase. Ce résultat est similaire à celui trouvé par Roselan et al. (2021).

CONCLUSION

L'étude d'amarrage moléculaire a été réalisée à l'aide de MOE pour prédire l'énergie de liaison et les interactions de liaison des acides carboxyliques contre la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus* (PDB ID : 2Y9X). D'après les valeurs du RMSD, ce programme est performant et fiable pour simuler l'inhibition de la tyrosinase.

Les résultats du docking moléculaire ont révélé que la tropolone et l'acide citrique sont les mieux combinées avec la tyrosinase avec des énergies d'interaction les plus faibles. Ces deux inhibiteurs se lient au site actif de la tyrosinase via des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes faisant appel aux résidus Met280, Val283, His263, His85 et Asn260.

L'acide citrique n'est pas toxique et pourra être utilisé comme agent de contrôle de brunissement du champignon de Paris pendant le stockage.

Comme perspective, il serait envisageable d'étudier l'effet de l'acide citrique *in vitro* sur la tyrosinase et de déterminer le mécanisme d'inhibition.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aurélien Grosdidier. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Sciences pharmaceutiques. 2007. dumas-01115990.
- Bernard P., Berthon J.Y. Resveratrol : an original mechanism on tyrosinase inhibition. *International Journal of cosmetic Science*. 2000; 22: 219-226.
- Briganti S., Camera E., Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*. 2003; 16: 101-110.
- Burton, SG. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*, 22: 459-487.
- Chen, L and Flurkey, W.H. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*. 5: 109-120
- Claus, H and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- Claus, H. and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- Decker, H. 2005. Copper proteins with dinuclear active sites. In: King, B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, II: 1159–1173.
- Decker, H., Jaenicke, E. 2004. Recent findings on the phenoloxidase activity and antibacterial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 673-687.
- Dong H., Liu J., Liu X., Yu Y., Cao S. Combining molecular docking and QSAR studies for modelling the anti-tyrosinase activity of aromatic heterocycle thiosemicarbazone analogues. *Journal of Molecular Structure*. 2017; 1151: 353-365.
- Eicken, C., Krebs, B and Sacchettini, J.C. 1999. Catechol oxidase-structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- EI-Bayoumi, MA., Frieden, E. 1957. A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications, 79: 4854-4858.

- Eve O. Les produits depigmentants. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier. France. 2011.
- Gauillard, F., Richard-Forget, F., Nicolas, J. 1993. New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*. 215: 59-65.
- Hamann J.N., Herzigkeit B., Jurgeleit R., Tuczek F. Small-molecule models of tyrosinase : From ligand hydroxylation to catalytic monooxygenation of external substrates. *Coordination Chemistry Reviews*. 2016; 334: 1-13.
- Hamil O Kara A, mémoire de fin d'étude Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la tyrosinase pour le traitement de l' hyperpigmentation de la peau.2018 Ketata.A.et,al 2008.
- Harel, E., Mayer, AM., Lerner HR. 1970. Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric*. 21: 542-544.
- Harel, E., Mayer, AM., Shain, Y. 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologica Plantarum*. 17: 921-930.
- Hu, W-J., Yan, L., Park, D., Jeong, H O., Chung, H Y., Yang, J-M., Ye, Z M.,Qian, G-Y. 2012. Kinetic, structural and molecular docking studies on the inhibition of tyrosinase induced by arabinose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50: 694-700.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res*. 102 : 1459-1483.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res*. 102 : 1459-1483.
- Klabunde T., Eicken Ch., Sacchettini J. C., Krebs B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature structural biology*. 1998; 5: 1084-1090.
- Lima C.R. , J.R.A. Silva, ´E. De T´assia Carvalho Cardoso, E.O. Silva, J. Lameira, J.L. M. Do Nascimento, D. Do Socorro Barros Brasil, C.N. Alves, Combined kinetic studies and computational analysis on kojic acid analogs as tyrosinase inhibitors, *Molecules* 19 (2014) 9591–9605.
- Martinez, M. V., Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 195–200.

- Mayer, A.M., Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- Mayer, AM. 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants—Recent progress. *Phytochemistry*. 26 : 11-20.
- Mayer, AM., Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*. 18: 193-215.
- Mayer, AM., Harel, E. 1994. Phenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. In: Food Enzymology. Volume II (Ed: Fox, PF) Elsevier Applied Science, London, 163-187.
- Mayer, AM., Harel, E., Ben-Shaul, R. 1966. Assay of catechol oxidase—A critical comparison of methods. *Phytochemistry*. 5: 783-789.
- McEvily, AJ., Iyengar, R., Otwell, WS. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 253-273.
- Pifferi, P.G., Baldassari, L., Cultrera, R. 1974. Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J Sci Food Agric.* 25: 263-270.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A and Sanjust, E. 2002. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 17: 207-218.
- Roselan, M. A., Zakaria, N., Faujan, N. H., Latif, M. A. M., Faudzi, S. M. M., Ab Hadi, H., & Ashari, S. E. (2021). In vitro cytotoxicity assay, mushroom tyrosinase inhibitory activity and release analysis of kojic monooleate nanodelivery system and in silico molecular docking study against 2Y9X target enzyme. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66, 102764.
- Shang, C. ZhangY. , You X, Guo N., WangY. , Y. Fan, W. Liu, The effect of 7,8,4'-trihydroxyflavone on tyrosinase activity and conformation: spectroscopy and docking studies, *Luminescence* 33 (2018) 681–691.
- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Van Gelder, CWG., Flurkey, WH., Wichers, HJ. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. 45 : 1309-1323.

- Varoquaux, P. 1978. Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse Univ. de Dijon, 134 p.
- Whitaker J., Lee, CY. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In Enzymatic browning and its prevention. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society, 2-7.
- Whitaker, JR. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) Food enzymes: Structure and Mechanism. New York: Chapman and Hall. 271-307.