

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمار ثليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

قسم البيولوجيا

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : S.N.V

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THEME

Etude in silico de l'inhibition de la Tyrosinase par la plante médicinale "Artimisia.L Compestris "

Présenté par :

Douik Hanina

Boudouda Wafa

Devant le jury composé de :

M., SIFI Ibrahim, MCA Université Amar Télidji

M. LEBOUKHE Mourad MAA, Université Amar Télidji

M. GOUZI Hicham, Professeur, Université Amar Télidji Mr.

Président

Examinatrice

Rapporteur

Année Universitaire : 2020 / 2021



Dédicaces

*Je remercie mon Dieu le tout puissant de
m'avoir aidé tout au long de mes années
d'études.*

*Et que nous a donné le pouvoir et le courage
pour élaborer ce travail.*

*Du fond de mon coeur et avec l'intensité de
mes émotion, je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents **Sassi & Ghazala** qui
ont toujours été là pour moi, et qui m'ont
enseigné la persévérance dans mes études.
J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute
ma reconnaissance et tout mon amour.*

*A mes aimables frères : Hamid ,
Radouane ,Younse.*

Ainsi que mes sœurs: Souade, Amina, Imane.

A Mon binôme : Wafa

A tous mes amis

A toute ma famille: Douik & Chérifi

*A Tous mes enseignants durant les années des
études.*

*A Que toute personne m'ayant aidé de près ou
de loin.*

Douik Hanina



Dédicaces

*Je remercie mon Dieu le tout puissant de m'avoir aidé
tout au long de mes années d'études.*

*Et que nous a donné le pouvoir et le courage pour
élaborer ce travail.*

*C'est avec profonde et sincère mots, que je dédie ce
modeste travail*

De fin d'études

A mes chers parents : Aouak & khedidja

A mes frères : Suleyman & Yahya

A mes très chère soeurs: Fatima, Saïda, Fatiha,

Tourkia

A ma petite soeur : Mebaraka

A ma binôme : Hanina

A Tous mes enseignants durant les années des études.

A Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin.

Boudouda Wafa





Remerciements

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

Après un long parcours notre mémoire touche à sa fin. Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre rapporteur Mr Gouzi.H. Maître assistant « A » à l'Université de Ammar Tlidji de laghouat1 pour nous avoir encadré durant toute la période de préparation du mémoire, pour tout le temps qu'il nous a consacré à nous former, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi de ce travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Monsieur Zerrouk.S. et Mr.Benaceaur Farouk à de nous avoir fait l'honneur de participer au jury de ce mémoire.

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

Liste des principales abréviations

Å : Angstrom.

EC 1.14.18.1 : classification de l'enzyme tyrosinase (Oxydoréductases)

EMBL : European Molecular Biology Laboratory

IC₅₀ : Inhibitory concentration 50.

KDa : Kilo Dalton.

L-DOPA : L-3, 4 Dihydroxyphénylalanine.

MOE: Molecular Operating Environment

NIH : National Institute of Health

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

PM : Poids moléculaire.

RMSD : Root Mean Square Deviation.

TYR : Tyrosinase.

VMD : Visual Molecular Dynamics.

2D : Deux dimensions.

3D : Trois dimensions.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des principales abréviations

Introduction..... 1

Chapitre 1. La tyrosinase

1. Historique et perspectives sur la tyrosinase..... 3

2. Définition, nomenclature et classification de la tyrosinase..... 3

 2.1 Définition..... 3

 2.2 Nomenclature..... 4

 2.3 Classification..... 4

3. Disribution de la tyrosinase..... 4

 3.1 Au niveaux moléculaires..... 4

 3.2 Au niveau structurale..... 5

4. Le site actif..... 5

5. Rôle physiologique de tyrosinase..... 6

6. Source, localisation de la tyrosinases..... 7

 6.1 Source..... 7

 6.2 La localisation..... 7

7. Biosynthèse de la tyrosinase et sa régulation..... 8

8. Mécanisme réactionnel..... 8

9. Généralité..... 9

10. Les inhibiteurs de la tyrosinase..... 10

 10.1 Les inhibiteurs naturels..... 11

 10.1.1 Les polyphénols..... 11

 10.1.2 Flavonoïdes..... 12

 10.1.3 L'hydroquinone et ses derives..... 12

 10.1.4 Arbutine..... 12

 10.1.5 Acide kojique..... 13

 10.1.6 La glabridine..... 13

 10.2 Les inhibiteurs synthétiques..... 14

 10.2.1 Tropolone..... 14

 10.2.2 4n-butylrésorcinol..... 14

 10.2.3 phenylethiourée..... 14

 10.2.4 Acide azélaïque..... 14

Chapitre 2 : la plante *Artemisia campestris*

1. Généralités..... 15

2. Description botanique..... 15

3. Systématique de la plante..... 16

4. Origine et distribution..... 16

5. Composition chimique..... 16

6. L'utilisation traditionnelle d'*Artemisa campestris*..... 18

Chapitre 3 : Le docking moléculaire	
1. La bioinformatique	19
1.1 Etude in silico.....	19
2. Doking moléculaire.....	19
3. Pricipe générale du docking.....	21
4. Les outils du docking moléculaire.....	21
4.1 Récepteur	21
4.2 Ligand.....	22
4.3 Les programmes.....	22
5. Le processus de docking.....	24
6. Etapes de Docking Moléculaire.....	24
7. Protocole Générale de Docking.....	25
Chapitre 4 : Matériels et Méthodes	
1. Matériels.....	27
1.1 Programmes MOE.....	37
2. Méthodes.....	37
2.1 Préparation des ligands et des protéines.....	37
2.2 Amarrage moléculaire.....	38
3. Règles de Lipinski.....	38
Chapitre 5. Résultats et Discussion	
1. Introduction.....	39
2. Etude des interactions entre les inhibiteurs et la Tyrosinase.....	39
3. Analyse visuelle	43
4. Les cinq meilleurs inhibiteurs sélectionnés	48
4.1. Interactions entre Isochlorogenic acid et le site actif	48
4.2 Interactions entre l'inhibiteur Afzelin et le site actif	49
4.3 Interactions entre l'inhibiteur Rutin et le site actif.....	49
4.4 Interactions entre l'inhibiteur Jaceosidin et le site actif.....	50
5. Résultat de la règles de Lipinski.....	50
Conclusion	52

Références bibliographiques**Annexes****Résumés**

Tableau N°1 : la Systématique de la plante <i>Artemisia campestris</i>	16
Tableau N°2: Principaux flavonoïdes rencontrés chez <i>Artemisia campestris</i>	17
Tableau N°3 : Principaux programmes de docking moléculaire	23
Tableau N°4 : Structure chimiques de l'amphotéricine B et ses dérivés.	28
Tableau N°5 : Valeurs seuils des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règle de Lipinski	38
Tableau N°6: Résultats des énergies et Rmsd d'interactions des 15 meilleurs inhibiteurs de la Tyrosinase	39
Tableau N°7 : Valeurs des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règle Lipinski.	51

Figure N°1 : Structure de la tyrosinase.	5
Figure N° 2 : Gène de la tyrosinase. Le gène de la tyrosinase	5
Figure N°3 : Site actif de la tyrosinase	6
Figure N°4 : Schéma des différentes réactions catalysées par Tyr	9
Figure N°5 : Synthèse de la mélanine	11
Figure N°6: Structures de la quercétine et le kaempferol	12
Figure N°7: Structure d'hydroquinone et monométhyléther d'hydroquinone	12
Figure N°8 : Structures de l'arbutine	13
Figure N°9 : Structure de l'acide kojique	13
Figure N°10: Structure de la glabridine	13
Figure N°11 : Structure de la tropolone	14
Figure N°12: Structure du 4-n-butylrésorcinol	14
Figure N°13: Structure du N- phenylethiourée	14
Figure N°14 : Structure de l'acide azélaïque	14
Figure N°15 : Photod' <i>Artemisiacampestris</i>	15
Figure N°16 : Représentation schématique du docking de deux molécules	20
Figure N°17 : principe générale d'un programme de docking	21
Figure N°18 : Étapes du Docking moléculaire [76].(LOUACHENI F. Développement d'un portail web pour le criblage virtuel sur la grille de calcul 2014.)	25
Figure N°19 : Protocole général de docking (Férey. N et al , 2008)	26
Figure 20 : Structure cristalline de la protéine cible, tyrosinase (PDB code :2y9x) liée avec la tropolone (ligand) (A) et (B) le site d'interaction.	27
Figure N°21 : : Le ligand Tropolone est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	44

Figure N°22 : : Le ligand Axillarin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	44
Figure N°23 : Le ligand Aromadendrin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	44
Figure N°24 : Le ligand Jaranol Kumatakenin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	44
Figure N°25 : Le ligand mearns est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	45
Figure N°26: Le ligand Casticin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	45
Figure N°27 : Le ligand Trimethoxyflavone est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	45
Figure N°28 : Le ligand Gardenin B est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	45
Figure N°29 : Le ligand Eupatorine est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	46
Figure N°30 : Le ligand selagin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	46
Figure N°31 : Le ligand Afzelin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	46
Figure N°32: Le ligand Jaceosidin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	46
Figure N°33 : Le ligand Isochlorogenic acid A est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	47
Figure N°34 : Le ligand Rutin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	47
Figure N°35 : Le ligand Isochlorogenic acid C est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr	47

Figure N°36 : Mode d'interaction de l'inhibiteur ICG acid A dans le site actif de la Tyr	47
Figure N°37 : Mode d'interaction de l'inhibiteur ICG acid C dans le site actif de la Tyr	48
Figure N°38 : Mode d'interaction de l'inhibiteur Afzelin dans le site actif de la Tyr	48
Figure N°39 : Mode d'interaction de l'inhibiteur Rutin dans le site actif de la Tyr	49
Figure N°40 : Mode d'interaction de l'inhibiteur Jaceosidin dans le site actif de la Tyr	50

Annexe 1 : Structure cristalline de la protéine cible, tyrosinase (PDB code :2y9x) liée avec la tropolone (ligand) (A) et (B) le site d'interaction.

Annexe 2 : Structure chimiques de l'amphotéricine B et ses dérivés.

Annexe 3 : Résultats des énergies et Rmsd d'interactions des 15 meilleurs inhibiteurs de la Tyrosinase

Annexe 4 : Résultats d'interaction des 15 phytoligands avec le site active de la tyrosinase

Annexe 5: Valeurs des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règleLipinski

Introduction

La tyrosinase (EC 1. 14. 18. 1) est une enzyme ubiquitaire ayant des rôles biologiques divers liés à la production de pigments. Cette enzyme catalyse la pigmentation de la peau, le brunissement des végétaux, la curation des blessures, et la formation de cuticule des insectes (Si *et al.*, 2011).

Le brunissement enzymatique des fruits et des végétaux provoque le plus souvent des détériorations significatives de la qualité de l'aliment, résultant d'une perte économique considérable dans l'agriculture et l'industrie alimentaire (Whitaker et Lee, 1995 ; Yoruk et Marshall, 2003). L'empêchement de la synthèse de mélanine par certains inhibiteurs de la tyrosinase pour combattre l'hyperpigmentation de la peau est une pratique dans le domaine de cosmétique. Comme le brunissement enzymatique des aliments et l'hyperpigmentation de la peau humaine sont beaucoup indésirables, un nombre de composés avec une forte capacité d'inhiber l'activité de la tyrosinase ont été découverts à partir des sources naturelles et la recherche des inhibiteurs naturels de la tyrosinase continue (Mayer, 2006).

Cependant, seulement peu d'inhibiteurs sont utilisés à l'heure actuelle à cause de leurs effets secondaires et leur activité faible, donc il est nécessaire d'identifier de nouveaux candidats qui inhibent efficacement la tyrosinase sans effets indésirable. Pour cela, les métabolites biosynthétisés par les plantes sont devenus une alternative potentielles par rapport aux analogues de synthèse (Zheng *et al.*, 2010 ; Sirat *et al.*, 2010).

Récemment, plusieurs inhibiteurs de la tyrosinase ont été identifiés comme l'acide kojique, les dérivés de l'acide ascorbique, l'acide oxalique (Yan *et al.*, 2011), la rutine (Si *et al.*, 2012a), l'hesperetine (Si *et al.*, 2012b), l'arbutine, l'arabinose (Hu *et al.*, 2012) et l'acide isophthalique (Si *et al.*, 2011). La plus part des inhibiteurs sont structurellement similaire par rapport à la tyrosine ou la L-dopamine.

La tyrosinase appartient à la famille des protéines type-3, avec deux ions cuivre liés par coordination avec trois résidus histidine au niveau du site actif. Ces cuivres participent directement dans l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) et dans l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase). Le mécanisme de la tyrosinase est complexe dans lequel l'enzyme catalyse des réactions multiples. La structure cristallographique de la tyrosinase a été récemment déterminées, ce qui permet d'étudier les changements de la structure globale de l'enzyme qui s'accompagnent durant la modulation de l'activité avec divers ligands.

L'objectif principal de notre travail est de mettre en évidence *in Silico* de l'effet inhibiteur des composés phénoliques de *Artemisia.L campestris* sur la tyrosinase. Les inhibiteurs trouvés peuvent être utilisés dans le contrôle du brunissement enzymatique des fruits et légumes ainsi que dans le traitement de l'hyperpigmentation de la peau.

Ce manuscrit comporte Cinq chapitres. Le premier chapitre est consacré à des généralités sur la tyrosinase, le deuxième *Artemisia.L campestris*, le troisième le docking moléculaire, le quatrième matériels et méthodes et les résultats trouvés seront discutés dans le dernier chapitre.

Chapitre 1 :
La tyrosinase

1. Historique et perspectives sur la tyrosinase

La tyrosinase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (Whitaker, 1995 ; Zawistowski et al., 1991 ; Vámos-Vigyázó, 1981). La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle de la tyrosinase de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981). La tyrosinase était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (Zawistowski et al., 1991 ; Robb, 1984 ; Escribano et al., 1989).

Depuis sa découverte, la tyrosinase a fait l'objet de recherches intensives. Ces recherches ont porté, d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieurs (Bonner, 1956).

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux tyrosinases de diverses sources comme : les truffes (Miranda et al., 1992 ; Miranda et al., 1996 ; Perez-Gilabert et al., 2001 ; Zarivi et al., 2003), les champignons (Frieden et Ottesen, 1959 ; Smith et Krueger, 1962 ; Duckworth et Coleman, 1970 ; Papa et al., 1994a,b ; Gouzi et Benmansour, 2007), la banane (Palmer, 1963 ; Ôba et al., 1992 ; Sojo et al., 1998 ; Thomas et Janave, 1986), les tubercules de pomme de terre (Patil et Zucker, 1965 ; Matheis, 1987a,b ; Pathak et Ghole, 1994 ; Cho et Ahn, 1999a,b ; Marri et al., 2003), les épinards (Golbeck et Cammarata, 1981), l'artichaut (Ziyan et Pekiyardimci, 2003), la poire (Ziyan et Pekiyardimci, 2004), le coing (Yağar et Sağıroğlu, 2002), la pêche (Wong et al., 1971), l'abricot (Chevalier et al., 1999), les feuilles de tabac (Shi et al., 2000) et la cerise (Kumar et al., 2008).

Bien que la tyrosinase ait été découverte et purifiée il y'a bien longtemps (**Keilin et Mann, 1938 ; Schoenbein, 1856**), c'est tout récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencé à émerger (**Jolivet et al., 1998**).

2. Définition, nomenclature et classification de la tyrosinase

2.1 Définition

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 (**Gouzi.H 2014**).

La tyrosinase est une enzyme cuivre dépendante Cet enzyme limitante de la mélanogénèse

dans les mélanocytes épidermiques, Elle est responsable de l'hydroxylation de la tyrosine en dopa et de l'oxydation de la dopa en dopaquinone qui est ensuite convertie en dopachrome. L'hydroxylation de la tyrosine est l'étape limitant de la mélanogénèse puisqu'elle nécessite de la L-Dopa comme cofacteur. (SanchezF et al., 1995).

Elle semble être universellement distribuée chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries.

2.2. Nomenclature

Plusieurs noms ont été associés à la tyrosinase, dont la polyphénol oxydase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est la tyrosinase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des *o*-quinones dans les deux cas. Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (Zawistowski et al., 1991 ; Burton, 1994 ; Rivas et Whitaker, 1973).

2.3. Classification

L'enzyme tyrosinase est une oxygénase oxydoréductase (Papa et al., 1994). La classification et la spécificité de cette enzyme demeure confuse et sont quelque peu ambiguës (Burton, 1994 ; Eicken et al., 1999).

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB), a mis à jour la nomenclature et a placé la tyrosinase dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1-monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC 1.10.3.2 *o*-diphénol : O₂ oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer, 1987 ; Zawistowski et al., 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la tyrosinase (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) (Cho et Ahn, 1999a).

3. Distribution de la tyrosinase :

3.1. Au niveaux moléculaires

Les études biochimiques et moléculaires ont permis de déterminer la structure de l'enzyme

tyrosinase . La molécule de tyrosinase code pour un polypeptide de 531 acides aminés, dont le poids moléculaire serait de 60 kDa. La protéine glycosylée a un poids moléculaire d'environ 70 kDa, encodée par un gène localisé sur le locus c du chromosome 11. (B.Bouchard1993).

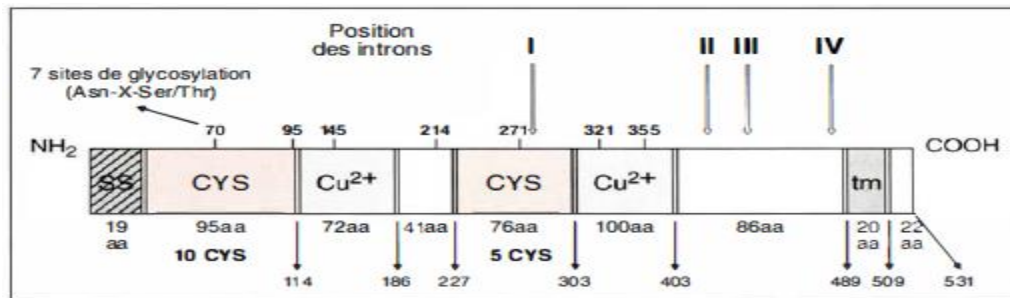


Figure N°1. Structure de la tyrosinase. La molécule de tyrosinase code pour un polypeptide de 531 acides aminés, dont le poids moléculaire serait de 60 kDa. La protéine glycosylée a un poids moléculaire d'environ 70 kDa. tm : domaine transmembranaire. SS : séquence signal.

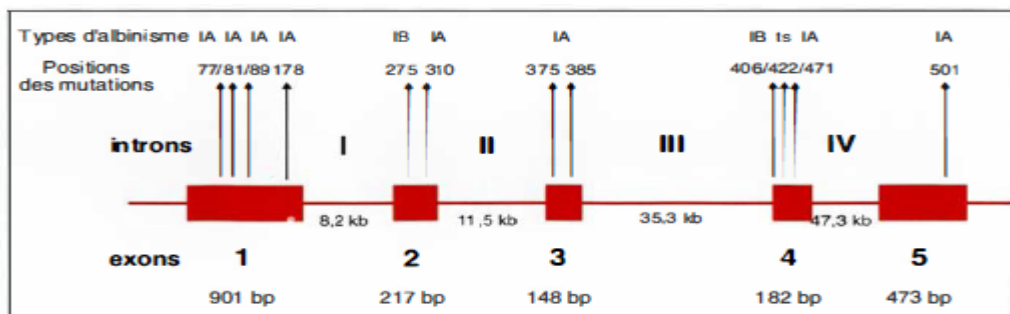


Figure N°2. Gène de la tyrosinase. Le gène de la tyrosinase est situé sur le chromosome 11 (1 1q 14-2 1 J chez l'homme et sur le chromosome 7 chez la souris, dans des régions synténiques.

3.2. Au niveau structurale

Est une métalloprotéine formée de 4 sous-unités, la TYR peut être subdivisée en trois domaines : Le domaine N-terminal, le domaine C-terminal et le domaine central où se trouvent six résidus histidine conservés ainsi que les ions oxydants CuA et CuB. Il est à signaler que la structure secondaire de cette enzyme est principalement α -hélicoïdale.

4. 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 (Soussou A 2016). 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 $\alpha 6$ et $\alpha 7$ (KlabundeTetal., 1998).

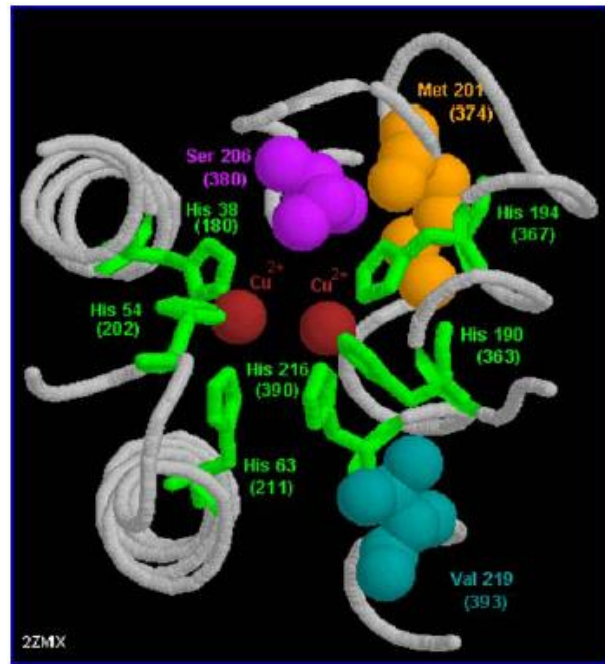


Figure N°3 : Site actif de la tyrosinase

(Source: <http://jean-jacques.auclair.pagesperso-orange.fr/tyrosinase/site%20actif.htm>).

5. Rôle physiologique

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 : (Hamann J., et al 2016)

□ L'hydroxylation de la L-tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) ; il s'agit de l'activité monophénol hydroxylase

□ L'oxydation de la L-DOPA en Dopaquinone ; dans ce cas on parle d'une activité catéchol oxydase.

□ L'oxydation de la 5,6-dihydroxyindole (DHI) en indole quinone (Hamil.O Kara .A 2018).

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 (Ketata.A.et,al 2008) Ainsi, l'inhibition de la TYR peut considérablement corriger le taux des mélanines dans les cas précités.

□ 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).

□ Chez les insectes, les tyrosinases sont impliquées dans le processus de sclérotisation (durcissement de la chitine) et dans les mécanismes de défense. (Okombi.s 2005)

□ Dans l'agroalimentaire, la tyrosinase est connue comme l'enzyme responsable du changement de la couleur des fruits et de certains végétaux (brunissement). Ce phénomène est dû à l'oxydation de composés diphénoliques en quinone (Okombi.s 2005)

6. Source et localisation

6.1. Source

Les PPOs 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 .

6.2. La localisation

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 cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Anderson, 1968 ; Vaughn et Duke, 1984 ; Mayer et Harel, 1979 ; Zawistowski et al., 1991. Whitaker et Lee, 1995). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker, 2006).

Les meilleures préparations des tyrosinases, sont issues à partir de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*). Le champignon commun de couleur blanchâtre *Agaricus bisporus*, est reconnu comme étant la source naturelle majeure de la tyrosinase (Chen et Flurkey, 2002 ; Burton, 1994). La tyrosinase est présente dans les différentes parties du champignon avec des proportions variables (Zhang et Flurkey, 1997). La localisation intracellulaire de la tyrosinase d'*Agaricus bisporus* n'a pas encore été établie avec certitude (Jolivet et al., 1998). Bonner (1955), a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. Van Gelder et al. 1997 ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol. La distribution de la tyrosinase dans les différents 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 (Vámos-Vigyázó, 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. Dans certains cas, cette activité peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables. Cette activité est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer et Harel, 1991).

7. Biosynthèse et régulation

La tyrosinase est une protéine transmembranaire de type I possédant potentiellement sept sites de N-glycosylation. Après une transcription de son gène en ARNm et une traduction de ce dernier, elle va s'insérer dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle subira une glycosylation initiale et un début de maturation. La maturation de la tyrosinase dans le RE nécessite la présence d'une protéine chaperone la calnexine, qui augmente son temps de rétention au niveau du RE, temps au cours duquel interviennent son repliement et sa liaison avec le cuivre. Suite à cette première période de maturation dans le RE (réticulum endoplasmique), elle entrera dans l'appareil de Golgi où elle poursuivra son développement. A la fin de son développement elle va atteindre son organite cible le mélanosome par un système de transport vésiculaire.

8. Mécanisme réactionnel

La tyrosinase peuvent se trouver sous trois états fonctionnels différents, représentés dans la figure. La forme Met représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif passe alors sous forme Désoxy dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite. Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme Oxy. Cette dernière forme peut prendre en charge aussi bien les mono que les o-diphénols.

Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des six atomes d'azote des résidus histidine et le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme Désoxy). Ces phénomènes sont liés à de légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse. En ce qui concerne l'activité monophénolasiq, l'étape préliminaire à la formation des quinones consiste en l'hydroxylation des monophénols. Or la forme Oxy est quasi absente dans les extraits enzymatiques et l'ajout d'un faible pourcentage d'odiphénols dans le milieu réactionnel est nécessaire pour modifier l'état fonctionnel des PPO et initier la réaction d'hydroxylation. Pour accélérer cette étape généralement lente, l'ajout d'agents réducteurs tel que l'acide ascorbique et le dithiothréitol est préconisé. Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme Oxy semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des PPO pour les mono-phénols. Dans tous les cas, l'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le phénol-substrat, la réaction se produit donc selon un mécanisme séquentiel ordonné. (D. Regal, 2001).

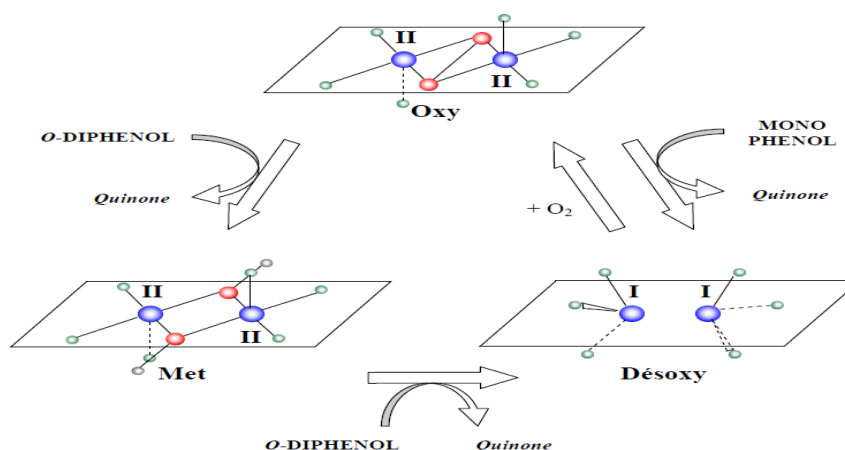


Figure N°4 : Schéma des différentes réactions catalysées par les tyrosinases.

9. Généralité

Le contrôle de l'activité de la PPO, est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits (Jolivet et al., 1998; Qiu et al., 2009). L'inhibition de la TYR s'effectue par le biais des petites molécules de nature chimique très diverse, devenus des constituants importants des produits cosmétiques et dermatologiques ayant pour cible les hyperpigmentations cutanées. De ce fait, la recherche de molécules naturelles, d'origine végétale, inhibitrices de tyrosinase s'est considérablement développée, car les plantes constituent une source importante de molécules bioactives souvent exemptes d'effets secondaires, ces inhibiteurs sont aussi de synthèse ou bien héli-synthèse.

Ils inhibent sélectivement l'enzyme Tyr afin d'abaisser le taux des mélanines chez les

patients souffrants d'une hyperpigmentation (Okombi.S2005) Donc ces inhibiteurs, ont été employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la PPO sont censés avoir de larges applications dans les industries médicales (Mosher et Pathak, et Fitzpatrick, 1983) et cosmétiques (Maeda et Fukuda, 1991). En plus du mécanisme d'inhibition, le pouvoir inhibiteur est un critère essentiel d'un inhibiteur. Le pouvoir d'un inhibiteur est habituellement exprimé par la valeur IC50, qui est la concentration d'un inhibiteur requise pour diminuer l'activité enzymatique par moitié (Chang, 2009). Les inhibiteurs de la TYR sont de petites molécules de synthèse, hémi-synthèse ou naturels. Ils inhibent sélectivement cette enzyme afin d'abaisser le taux des mélanines chez les patients souffrants d'une hyperpigmentation[3].

10. Les inhibiteurs de la tyrosinase

La peau constitue l'organe le plus grand du corps humain représentant 16 % de son poids total. Composée de plusieurs couches de tissus, elle forme une barrière de protection de l'organisme contre le milieu extérieur, mais assure également d'autres fonctions vitales. La peau peut être endommagée lorsqu'elle est exposée aux rayonnements UV, provoquant ainsi des pathologies importantes, telles que les cancers de la peau et l'hyperpigmentation. Cette dernière pathologie s'installe suite à un dérèglement de la production des mélanines par les mélanocytes suivant la mélanogénèse.

Il s'agit d'un processus impliquant une série de réactions enzymatiques dont la TYR (Okombi S 2005 et Li Q et al., 2018). Les inhibiteurs de la TYR sont de plus en plus utilisés en cosmétique médicamenteuse afin de régler le taux de l'eumélanine et la phéomélanine au niveau de la peau (Briganti S et al 2003 et Ortiz-Ruiz V et al 2015). Pour lutter contre l'hyperpigmentation de la peau, les médecins font habituellement appel aux traitements par agents chimiques dépigmentants ainsi que la thérapie par laser.

La mélanine est le produit final d'un processus biochimique complexe. La biosynthèse de mélanine est initiée soit par l'hydroxylation de L-phénylalanine en L-tyrosine, soit directement à partir de L-tyrosine. La L-tyrosine est ensuite hydroxylée en L-dihydroxyphénylalanine (LDOPA). La L-DOPA sert de précurseur à la formation de mélanine. L'étape d'oxydation de la L-DOPA en dopaquinone est commune à la formation d'eumélanine et de phéomélanine (Figure 1) (Slominski et al., 2004; N. Wang and Hebert, 2006 ; Kvam and Tyrrell, 1999; Wenczl et al., 1998).

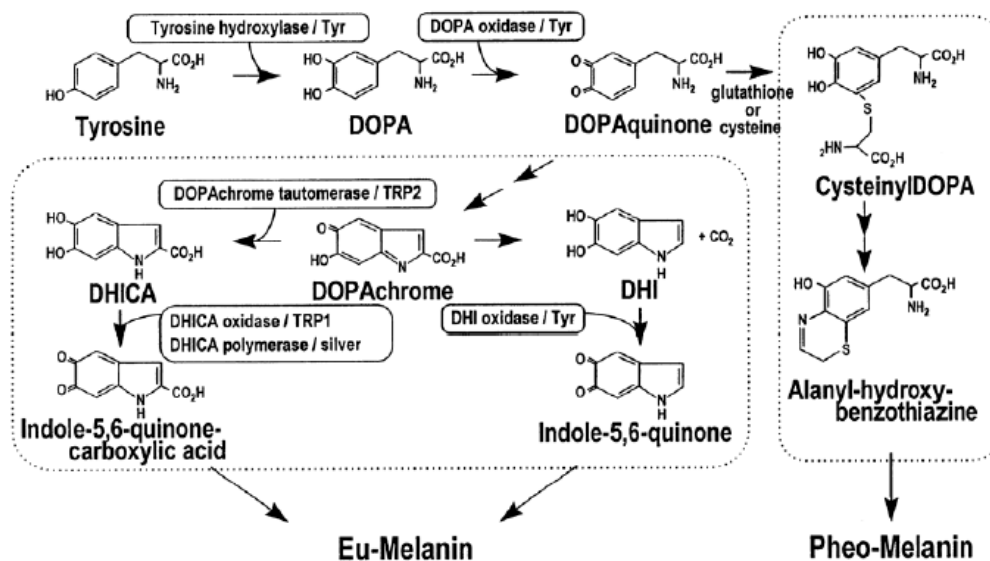


Figure N°5 : Synthèse de la mélanine

(Source : <http://www.freepatentsonline.com/6579848.html>)

▪ Les troubles pigmentaires

Les désordres pigmentaires sont soit :

o un excès de pigmentation :

- hypermélanose: consiste en un excès de mélanine.

- surcharges pigmentaires non mélaniques : pigmentations indépendantes des pigments mélaniques. Les causes de ces hyperpigmentations peuvent être des dépôts de fer, de bilirubine, de carotène, d'argent, d'or et de cuivre. Ces hyperpigmentations n'étant pas mélaniques, les agents dépigmentants n'ont un effet que si le processus d'hyperpigmentation est mixte (lorsque le système mélanique est également stimulé)

o une diminution de la pigmentation appelée hypomélanose ou hypochromie ;

o une absence totale de pigmentation appelée achromie..(Migan.N 2014).

10.1. 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 :

10.1.1 Les polyphénols

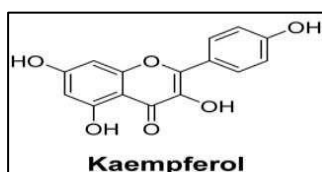
Les polyphénols représentent divers groupes de composés contenant des fonctions phénoliques multiples et sont largement distribués dans la nature. Les polyphénols sont aussi un large groupe d'inhibiteur de la tyrosinase jusqu'à présent.

Plusieurs polyphénols sont considérés comme des substrats de la tyrosinase. La présence et la position d'un substituant supplémentaire au niveau de leurs structure peuvent les rendre

comme étant des inhibiteurs de l'enzyme.(Jkeidel.A 2012)

10.1.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes occupent la plus grande partie dans les inhibiteurs de TYR naturels



Nouvellement découverts. Une étude réalisé par Nakashima et al (2010) à mis en évidence l'activité anti-TYR de certains flavonoïdes, tels que la quercétine et le kaempférol avec des IC₅₀ respectives de 15μM et 25μM .

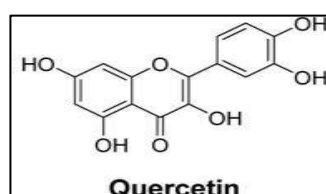


Figure N°6:Structures de la quercetine et lekaempferol.

10.1.3 L'hydroquinone et ses derives

,L'hydroquinone et le monométhyléther d'hydroquinone (méquinol) sont des dérivés phénoliques possédant une activité dépigmentante. Depuis 1961l'hydroquinone est utilisé pour le traitement des hypermélanosomes (Eve O., et al. 2011). Par la suite, il a été prouvé que cette molécule inhibe d'une manière compétitive le site actif dela TYR en bloquant la synthèse des mélanines (Lee S.Y.,et al. 2016).avec un IC₅₀ égal à 4500 μM(Bernard P .,et al 2000).

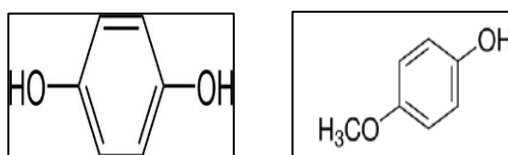


Figure N°7:Structure d'hydroquinone et monométhyléther d'hydroquinone

L'hydroquinone et ses dérivés sont des inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase. Ils ont une structure analogue aux précurseurs mélanogéniques comme la tyrosine et la DOPA.

10.1.4 Arbutine

Largement utilisé en cosmétique, l'arbutine est un promédicament de l'hydroquinone inhibant la synthèse des mélanines en bloquant le site actif de la TYR avec un IC₅₀ égal à 17000 μM(Bernard P ., et al 2000). 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 (Eve O. et al 2011).

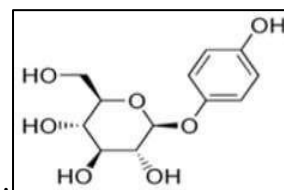


Figure N°8 : Structures de l'arbutine

10.1.5 Acide kojique

L'acide Kojique est un inhibiteur fongique de la TYR agissant particulièrement comme un chélateur des ions cuivrique du site actif de la tyrosinase. Ce métabolite est utilisé en cosmétique sous forme de pommades pour blanchiment de la peau . Ce composé est largement utilisé dans la recherche scientifique comme étant un inhibiteur de référence de la TYR. Sa valeur d'IC₅₀ est égale à 17.94 µM(Dong H et al 2017)

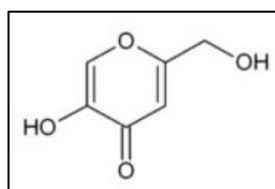


Figure N°9 :Structure de l'acide kojique.

10.1.6 La glabridine

La molécule appartient à la classe des inhibiteurs de tyrosinase, mais chimiquement sa structure se complexifie et s'en éloigne. D'origine Naturelle Extraire de racines de Réglisse(*Glycyrrhizaglabra L*),

Il inhibe l'activité monophénolase et diphénolase de la tyrosinase .(Nerya O et al., 2003).La glabridine influence la pigmentation en inhibant la synthèse de la mélanine et en inhibant l'activité de la tyrosinase de manière dose-dépendante .(JP et al.,2009).

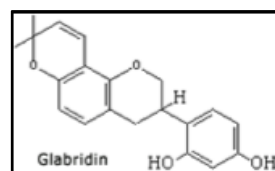


Figure N°10: Structure de la glabridine.

10.2. Les inhibiteurs synthétiques

10.2.1 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_{50} égal à $0,5 \mu M$ (Haudecoeur R et al., 2011).

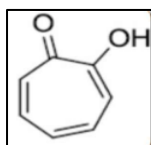


Figure N°11 : Structure de la tropolone.

10.2.2 4-n-butylrésorcinol

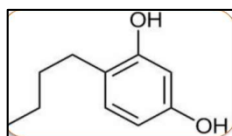


Figure N°12: Structure du 4-n-butylrésorcinol.

Le 4-n-butylrésorcinol connu sous le nom commercial de Rucinol® est un inhibiteur des voies de synthèse de la mélanine. Il inhibe la TYR, réduisant ainsi la quantité de mélanines produites (Eve O.2011) avec un IC_{50} égal $13.5 \mu mol/L$ (Pillaiyar T et al., 2017)

10.2.3 phenylethiourée

Le N- phenylethiouré se présente comme l'un des meilleurs inhibiteurs compétitifs de la TYR avec un IC_{50} égal à $1.5 \mu M$ (Pillaiyar Tet al 2017).

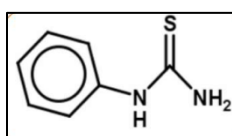


Figure N°13: Structure du N- phenylethiourée.

10.2.4 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 (Eve O.2011, Boumehdi A.2017).

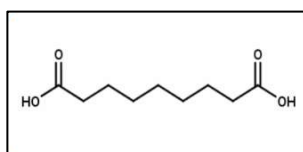


Figure N°14 : Structure de l'acide azélaïque

Chapitre 2 :

Artemisia.L campestris

1. Généralités

Le genre *Artemisia.L* appartient à la famille des Astéracées: ,c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces (Mucciarelli and Maffei., 2002).

Il a été rapporté que le genre *Artemisia.L* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquinic, les coumarines, les huiles essentielles, les stéroïdes et les acétylènes (Kundanet Anupam., 2010).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia.L.L* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mirjalili et al., 2007).

2. Description botanique

Artemisia.L.L campestris est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia.L campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures bipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (David, Hervé., 1994 ; Ozenda, 1983; Quezel et Santa., 1962).



Figure N°15: Photo d'*Artemisia.L campestris*.

[arobase]preservons-la-nature.fr De senteursduquercy.com

3. Systématique de la plante

Selon Caratini (1971), la plante *Artemisia.L campestris* est classée dans:

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermatophyta</i>
Sous embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Sous famille	<i>Asteroideae</i>
Tribu	<i>Anthemideae</i>
Sous Tribu	<i>Artemisiinae</i>
Genre	<i>Artemisia.L</i>
Espèce	<i>Artemisia.LcampestrisL.</i>

Tableau N°1 : la Systématique de la plante *Artemisia.L campestris*

4. Origine et distribution

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia.L* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi-arides et le bassin méditerranéen, et s'étendent jusqu'à l'Himalaya (Vernin *et al.*, 1995),

dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud, d'après Kyeong (2007), *Artemisia.L campestris* est originaire de l'Asie.

5. Composition chimique

L'utilisation des solvants à polarité différente, suivie par des étapes de fractionnements et l'emploi de différentes techniques de chromatographie permettent d'extraire, séparer et identifier les différents composés présents dans les extraits de plantes.

De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia.L campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (Joao *et al.*, 1998; Juteau *et al.*, 2002).

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré (Bruneton, 1999), elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, hauteur, direction du vent, heures de soleil, etc.), et selon la phase de développement de la plante (Jerkovic *et al.*, 2003).

Plusieurs études (Akrouit et al., 2001 ; Juteau et al., 2002) ont rapporté la composition des huiles essentielles d'*Artemisia.L campestris*, l'huile essentielles alysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), Juteau et al(2002)ont identifié dans une espèce de Camargue (Marseille, France) 51composéset caractérisés, les plus abondants sont : γ -terpinène,capillène,1-phenyl-2,4-pentadiyne,spathulenol,methyleugenol, p-cymèneet β -pinène.

D'après Akrouitetal(2001)les constituants les plus abondants d'une espèce de Tunisieont: β -pinène(24,2-27,9%), p-cymène(17.4–22.3%) et α -pinène(4.1–11.0%), cesconstituants représentent plus de45 % de l'huile totale.

Le contenu phénolique total, les flavonoïdes, les dérivés hydroxycinnamiques, les dérivés hydrox benzoïques de l'extrait éthanolique (80%) de la partie aérienne d'*Artemesia campestris* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques (Tab. I).

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia.L campestris* sont: flavone (apéginie), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Tab. II) (Valant et al., 2003).

Les feuilles d'*Artemisia.L campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, des saponines.(Nailiet al.,2010).

Flavonoïdes	Références
- Flavanone: 5,8,4'-trihydroxyflavanone.	Rauter et al., 1989.
- Acétophénone: 3-acetyl-4-hydroxyacétophénone.	Hurabielle et al.,1982.
- Flavones: 5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone.	Ferchichietal.,2006.
- Flavonol: Kaempférol-7méthyl.	Valant-V etal.2003.
- Dihydroflavonol: 7-methylaromadendrin.	Hurabielle et al. 1982.

Tableau N°2: Principaux flavonoïdes rencontrés chez *Artemisia.L campestris*

6. L'utilisation traditionnelle d'*Artemisa campestris*

Artemisia.L campestris est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies:

En usage local *Artemisia.L campestris* est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles (Dob et al., 2005). Elle est également utilisée dans le traitement de diabète (Sefi et al., 2010).

La partie aérienne est utilisée dans le traitement de brûlures, de la diarrhée, les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme, elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux (Ben Sassi et al., 2007).

Selon Saoudi et al (2010) la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des tiges et feuilles d'*A. campestris* permet de réduire les symptômes digestifs.

En plus de leurs utilisations traditionnelles, *Artemisia.L campestris* possède de nombreuses propriétés biologiques, tels que les activités antioxydants et activités antibactérienne...etc

Chapitre 3 :
Docking moléculaire

1. La bioinformatique

La biologie computationnelle ou bio-informatique (BILAMI .Y et al ,2015) est un domaine scientifique interdisciplinaire de sciences informatiques et de la biologie (YANG B. et al .2014). Elle s'intéresse particulièrement au rapport entre la structure, la dynamique des macromolécules et leur fonction biologique , qui recouvre l'ensemble des technologies et des méthodes permettant de collecter, de stocker, d'analyser et d'interpréter les données biologiques . (LaribiA ,Rabahi K , 2017)

La bioinformatique actuelle se concentre surtout sur l'étude des séquences d'ADN et sur le repliement des protéines, donc travaille surtout au niveau moléculaire . Il s'agit d'une discipline récente, qui prend ses origines au début des années 1980 lorsque le laboratoire européen de biologie moléculaire (EMBL : EuropeanMolecularBiologyLaboratory) et le département américain de la santé (NIH : National Institute of Health) ont créé les banques de données EMBL et GENBANK pour répertorier les séquences d'ADN découvertes par les biologistes. La bioinformatique donc rend plus simple le tri des molécules à tester et réduit fortement le temps de recherche et de mise au point des nouveaux médicaments (Delgrange O, et al.2009).

1.1 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.Doking moléculaire

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques. Connaître la façon dont les protéines interagissent avec d'autres entités biochimiques est une étape essentielle pour comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées. (makhloufi K 2019).

Le docking moléculaire in-silico a pour but de prédire la structure d'un complexemoléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en oeuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales in vitro (Chaouche A et al., 2014). Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand).

La modélisation moléculaire peut être précieuse dans l'identification de cibles thérapeutiques, typiquement des récepteurs protéiques dont le rôle spécifique dans une pathologie est caractérisé. (Vincent.L,2006). En effet, avec le développement de l'outil informatique, la modélisation moléculaire (assemblage ou arrimage moléculaire) a rapidement investi dans le domaine de la recherche en biologie pour y devenir un outil incontournable, (Beautrait A , 2008)(El Hadj Said. K.2016).

Il est étudié des interactions non-liantes intervenant lors de la formation de complexes (figure II.3) moléculaires telle que : les interactions VDW, les interactions électrostatiques, les interactions Hydrogènes. (Merzoug A, 2012)

Le plus souvent, le récepteur est une protéine qui possède un ou plusieurs sites actifs spécifiques, plus ou moins accessibles selon les cas. Le ligand est généralement une molécule flexible étrangère de petite taille. La liaison entre le ligand et le récepteur introduit un signal biologique qui peut avoir diverses formes (Boutrif C et al., 2014)

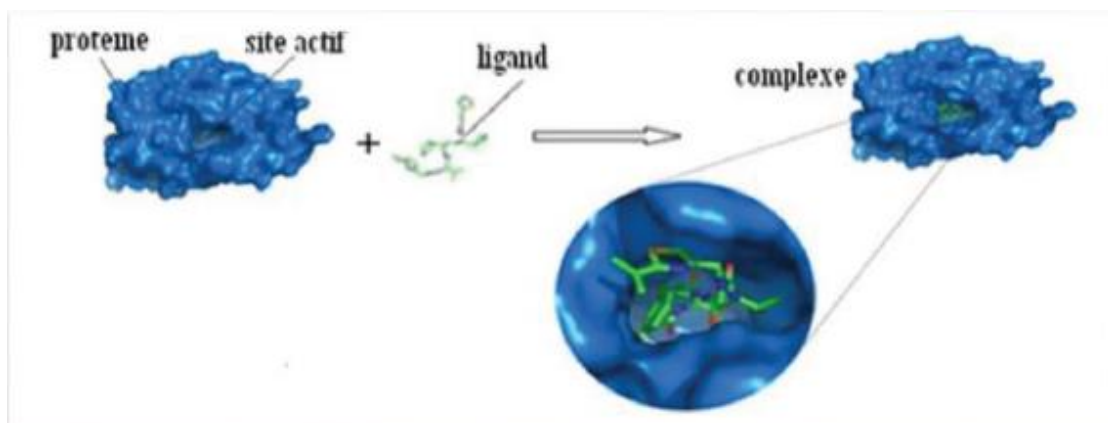


Figure N°16 : Représentation schématique du docking de deux molécules

Etape n°1 : le docking 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.

Etape n°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 (El hadj saidK ,2016).

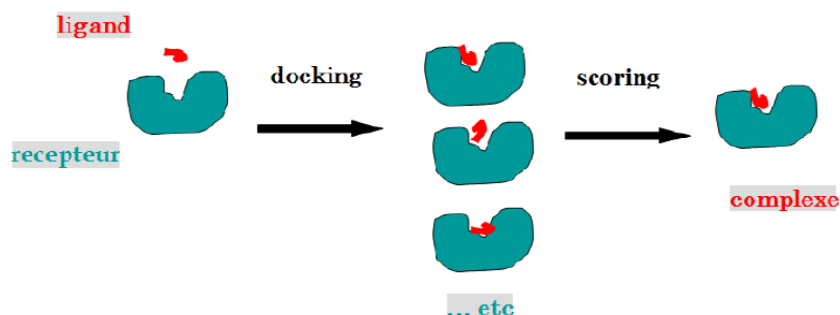


Figure N°17: principe générale d'un programme de docking

3. Principe général du docking

Le principe général est, considérant une cible de géométrie donnée, d'essayer de placer le ligand en interaction avec la protéine de la façon la plus favorable possible. Lors du docking, la protéine cible est généralement figée alors qu'une certaine flexibilité est attribuée au ligand (angle de torsion).

Il existe de nombreux logiciels de docking, qu'on peut répartir en deux catégories selon la méthode utilisée : la simulation de trajectoire et l'ajustement de fragments. A partir d'une position initiale aléatoire, la simulation de trajectoire consiste à explorer plusieurs positions (avec différentes conformations du ligand) par évaluation de l'énergie d'interaction ligand/protéine. La meilleure position est celle qui est la plus basse en énergie, donc correspond au complexe ligand/protéine le plus stable. La seconde approche, ajustement de fragments, est basée sur la complémentarité des formes. (Mohamed Dit.M,2016).

4. Les outils du docking moléculaire

4.1 Récepteur :

La disponibilité de la structure des protéines est l'un des éléments essentiels à considérer avant de réaliser un docking. En général, les sources d'information de ces structures proviennent majoritairement de la cristallographie aux rayons X et de la RMN.

Cette technique est responsable de la majorité des structures issues d'une base de données de structures accessibles gratuitement appelée la «Protein Data Bank» (PDB).

Plus de 117 000 structures protéiques ont été résolues et injectées dans la PDB grâce à la cristallographie aux rayons X. La RMN fournit, quant à elle, environ 11 000 structures, contre seulement 1500 dans le cas de la microscopie électronique . Lorsque la structure 3D d'une protéine n'a pas encore été résolue expérimentalement, des méthodes de prédiction par homologie de séquence peuvent être mises en œuvre.

4.2 Ligand

Pour obtenir la structure chimique tridimensionnelle d'un ligand, il existe deux méthodes:

La première souvent d'aspect commercial, est constituée de bases de données de structures chimiques appelés chimiothèques ou espaces chimique.

Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et sauvegarder dans différents formats (pdb, mol, mol2....etc) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que ChemDraw, Arguslab, Titan ou Sybyl .

4.3. Programmes de docking les plus cites:

Plus de 30 logiciels de docking sont actuellement disponibles. Parmi ces programmes d'amarrage moléculaire on peut trouver : comme GOLD, FlexX, DOCK, AutoDock, MOE ou bien UCSF Chimera et Molegro Virtuel Docker (MVD). L'utilisation des programmes de docking a conduit à de nombreux succès dans le domaine de la découverte de nouvelles molécules bioactives [18].

Nom	Editeur	Site Internet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrodinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html

Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

Tableau N°3: Principaux programmes de docking moléculaire[19]

Le docking moléculaire est une technologie difficile à mettre en oeuvre car elle doit être appliquée et constamment adaptée en fonction du contexte dans lequel le projet se place. Il est néanmoins possible de fournir des guides en fonction du type de protéine, site actif et ligand(s) à ancrer (Merzoug A. 2012).

Les principales causes d'erreurs sont :

- Site actif dénué de cavité ;
- Flexibilité de la protéine ;
- Influence de l'eau ;
- Imprécision des fonctions d'évaluations ;
- Interactions non usuelles ;
- Flexibilité du ligand ;
- Pseudosymétrie du ligand ;
- Mauvais jeux de coordonnées (protéine) ;
- Mauvais types atomiques (ligand, protéine) (ROGNAN D).

5. Le processus de docking:

- Les méthodes du docking cherchent à assembler les protéines afin de construire un complexe.
- Le processus de docking consiste à faire interagir une petite molécule organique avec le récepteur, généralement de nature protéique (A. May et al , 2003). L'objectif étant de parvenir à déterminer comment ces molécules vont s'agencer les unes par rapport aux autres (figure). Le problème posé est donc celui-ci: étant données deux molécules de structure connue, quelle sera la structure du complexe moléculaire résultant de leur association (J. Dréo.et al , 2003)
- Les structures 3D ont été définies par cristallographie par rayons X. La diversité des ligands cristallisés dans la protéine est une information précieuse qui nous permet d'observer d'une part les résidus clé de l'interaction mais également les variabilités structurales 3D de la protéine d'une molécule à l'autre. Le docking est capable de confronter deux entités telles que le ligand et le récepteur. L'avantage est de pouvoir prendre en compte un environnement complexe d'acides aminés dans lequel va évoluer le ligand. Toutefois, un point faible du docking est d'omettre la variabilité structurale de la protéine lors de la fixation du ligand.

6. Etapes de Docking Moléculaire:

Deux approches sont principalement employées pour la modélisation du système protéine-ligand., La première étape consiste au téléchargement des structures chimiques des cibles à traiter (Enzyme dans notre cas), pour cela il est nécessaire d'aller directement à la Bank PDB (<http://www.pdb.org>) et déterminer où sont déposées les structures de ces cibles.

En suite, la PDB contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayons X), soit par RMN. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la Bank, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée.

Après le téléchargement de la cible (PDB), nous utilisons un logiciel de visualisation pour voir avec quels ligands l'enzyme est Co-cristallisé (eau, ligands, ion,...).

La deuxième étape, concerne les structures du (ou des) ligand(s) utilisé(s) lors du docking moléculaire. Il y a deux grandes bases de données de structures chimiques des ligands. La première représente ces structures par les programmes d'informatique de modélisation moléculaire, où les différentes structures sont générées par optimisation de géométrie. Ces

structures sont gouvernées par les lois de la chimie quantique. Dans le deuxième cas, elles sont obtenues à partir des bases de données comme Pub Chem Project ou autres bases de données des structures. Ces dernières ont différentes extensions comme PDB (Protein Data Bank), SDF, ...ect. (el hadj said .K ,2016)



Figure N°18 : Étapes du Docking moléculaire [76].(LOUACHENI F. Développement d'un portail web pour le criblage virtuel sur la grille de calcul 2014.)

7. Protocole Générale de 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 (figure 1) :

- Choix du mode de représentation des protéines (tout atome, pseudo-atome, grille, etc.),
- Exploration conformationnelle (corps-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 ressemblances et classification par évaluation plus fine du 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 modes 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. (el hadj said .K ,2016)

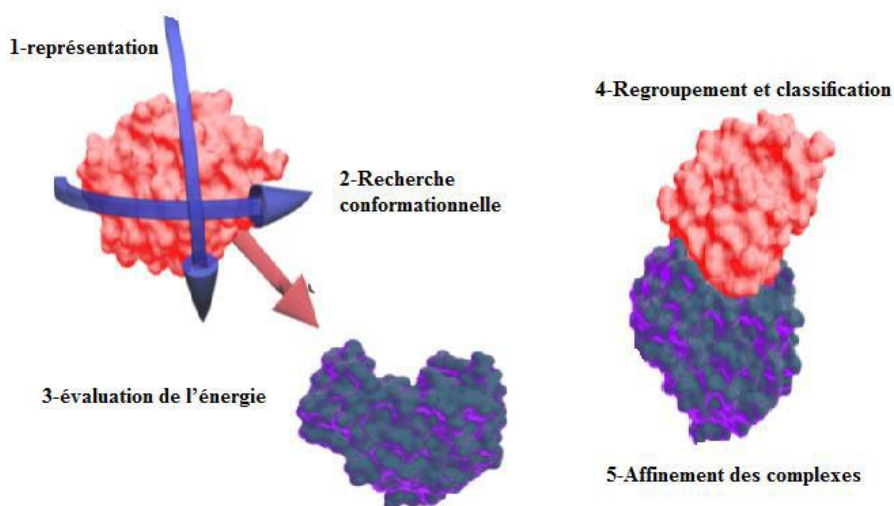


Figure N°19: Protocole général de docking (Férey. N et al , 2008)

Chapitre 4 :
Matériels et méthodes

1. Matériels

Le téléchargement de la protéine cible, tyrosinase (PDB :)a été fait à partir de la base de données Bookhaven Protéine Data Bank (www.rcsb.org/pdb) (Figure 1).

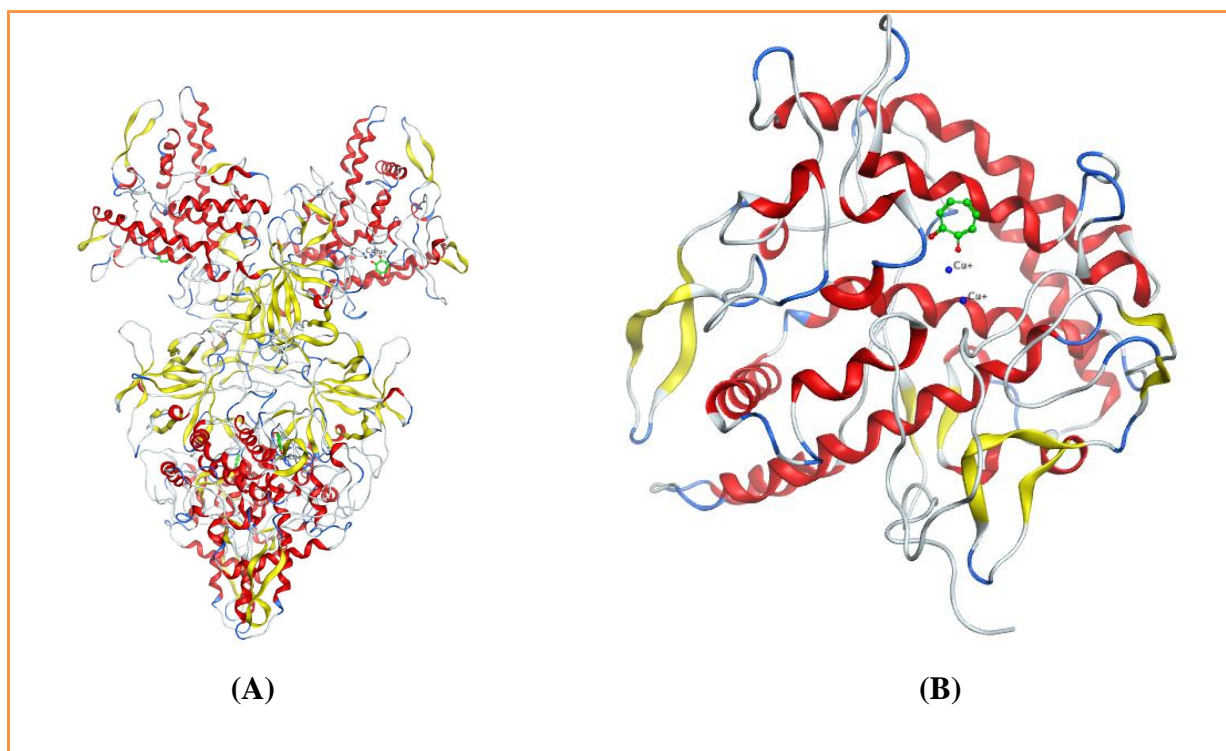


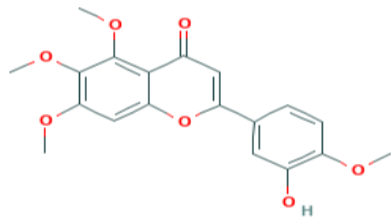
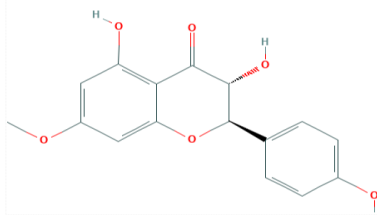
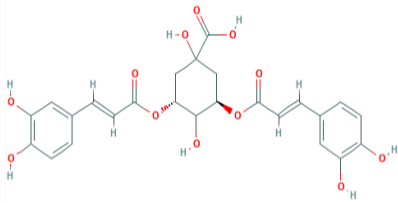
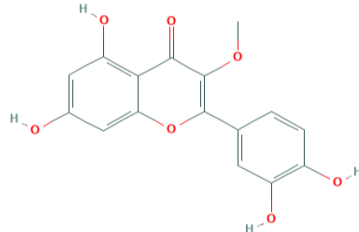
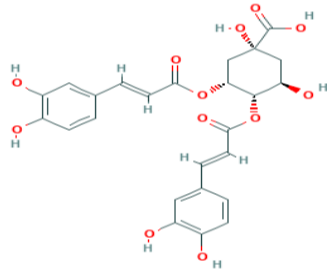
Figure 20 : Structure cristalline de la protéine cible, tyrosinase (PDB code :2y9x) liée avec la tropolone (ligand) (A) et (B) le site d'interaction.

Les structures des composés phénoliques (phytoligands) seront téléchargés à partir des bases de données suivantes (Tableau 5) :

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<https://zinc.docking.org/>

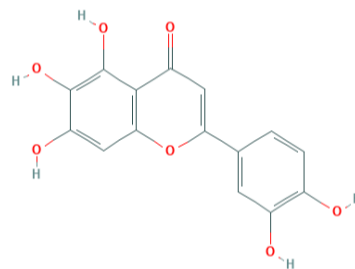
La minimisation de l'énergie globale des ligands et l'addition des atomes d'hydrogène à l'aide du programme Avogadro Version 1.1.1.

Nom	Code	Structure
3'-Hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone (Eupatorine)	PubChem CID : 7020615	
3,4',5-Trihydroxy-7-methoxyflavanone (Aromadendrin)	PubChem CID : 181132	
3,5-Dicaffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid A)	PubChem CID : 6474310	
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-methoxy-4H-chromen-4-one (3-O-Methylquercetin)	PubChem CID : 5280681	
4,5-Di-O-caffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid C)	PubChem CID : 6474309	

**5,6,7,3',4'-
Pentahydroxyflavone**

PubChem CID : 5281642

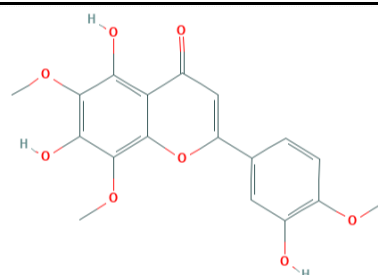
(6-Hydroxyluteolin)



**3',5,7-Trihydroxy-4',6,8-
trimethoxy flavone**

PubChem CID : 177696

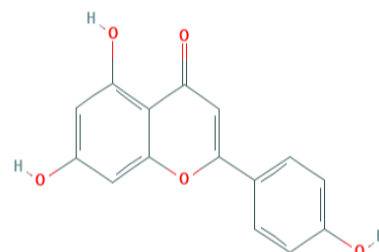
(Acerosin)



**5,7-Dihydroxy-2-(4-
hydroxyphenyl)
chromen-4-one**

-4H-
PubChem CID : 5280443

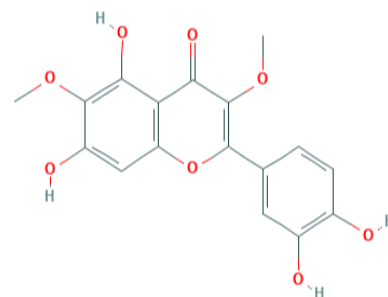
(apigenin)



3,6-Dimethoxyquercetagenin

PubChem CID : 5281603

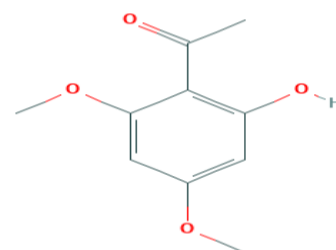
(Axillarin)



**2'-Hydroxy-4',6'-
dimethoxyacetophenone**

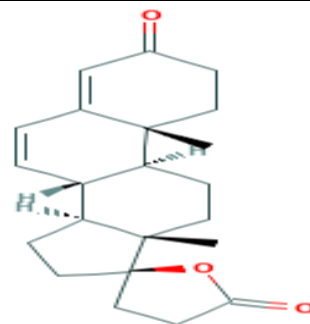
PubChem CID : 66654

(Xanthoxilin)



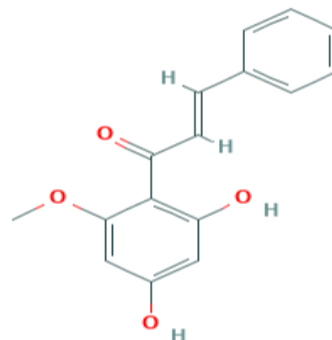
Aldadiene
(Canrenone)

PubChem CID : 13789



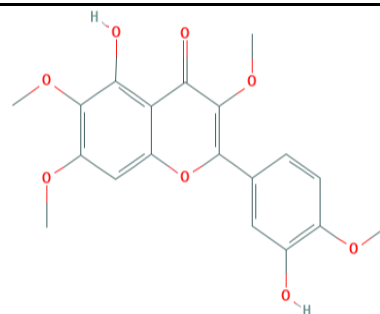
Dihydroxymethoxychalcone
(Cardamonin)

PubChem CID : 641785



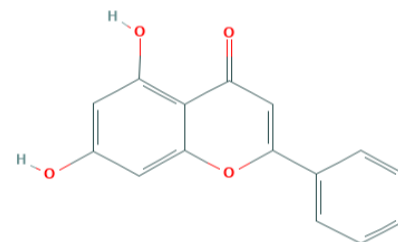
Quercetagein 3,6,7,4'-tetramethyl ether
(Casticin)

PubChem CID : 5315263



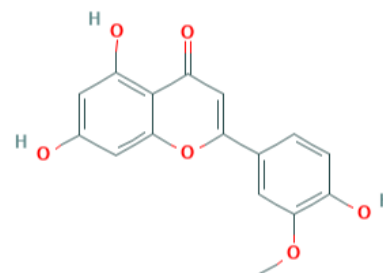
5,7-Dihydroxyflavone
(Chrysin)

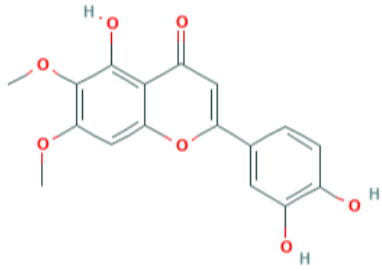
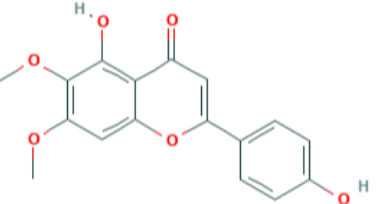
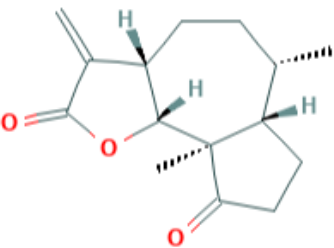
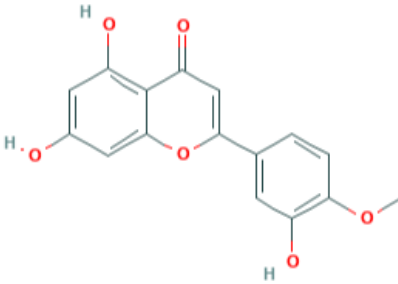
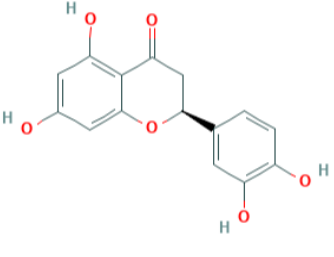
PubChem CID : 5281607

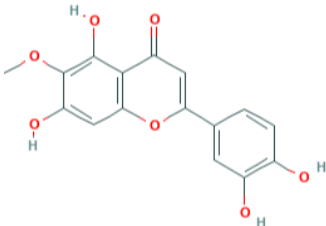
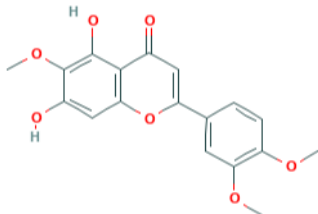
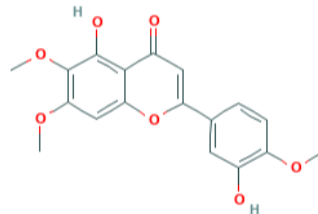
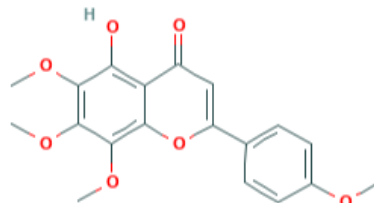
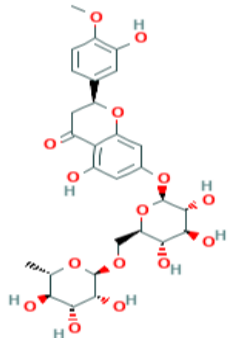


3'-Methoxyapigenin
(Chrysoeriol)

PubChem CID : 5280666



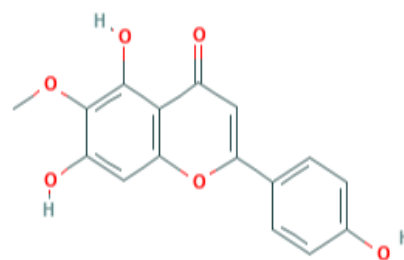
<p>3',4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavone (Cirsiliol)</p>	<p>PubChem CID : 160237</p>	
<p>4',5-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone (Cirsimaritin)</p>	<p>PubChem CID : 188323</p>	
<p>dihydro-Dihydroambrosin (Damsin)</p>	<p>PubChem CID : 14631</p>	
<p>Luteolin 4'-methyl ether (Diosmetin)</p>	<p>PubChem CID : 5281612</p>	
<p>(S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-4-benzopyrone (Eriodictyol)</p>	<p>PubChem CID : 440735</p>	

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-methoxy-4H-chromen-4-one (Eupafolin)	PubChem CID : 5317284	
5,7-Dihydroxy-3',4',6-trimethoxyflavone (Euptailin)	PubChem CID : 5273755	
855-96-9 3',5-Dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavone (Eupatorin)	PubChem CID : 97214	
5-hydroxy-6,7,8-trimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one (Gardenin B)	PubChem CID : 96539	
Hesperidin (Cirantin)	PubChem CID : 10621	

4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavone

(Hispidulin)

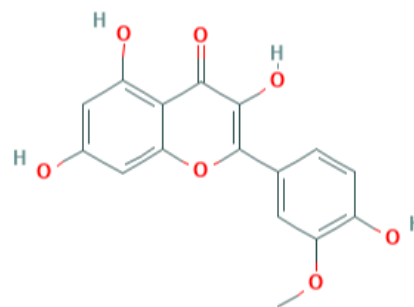
PubChem CID : 5281628



3-Methylquercetin

(Isorhamnetin)

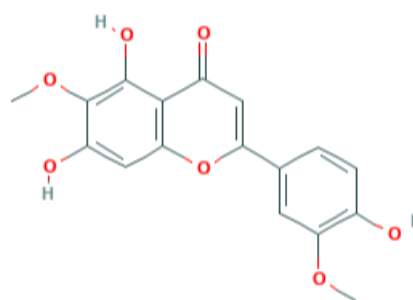
PubChem CID : 5281654



4',5,7-Trihydroxy-3',6-dimethoxyflavone

(Jaceosidin)

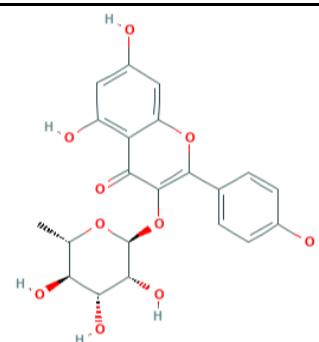
PubChem CID : 5379096

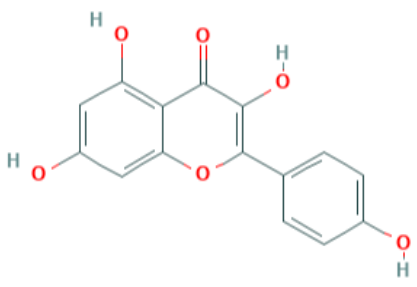
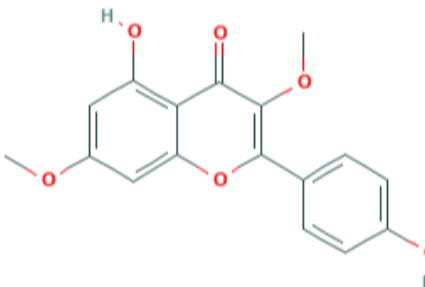
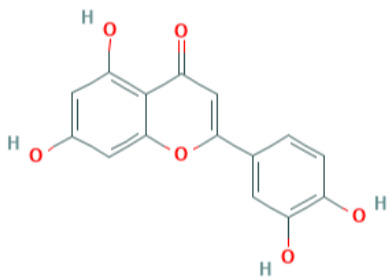
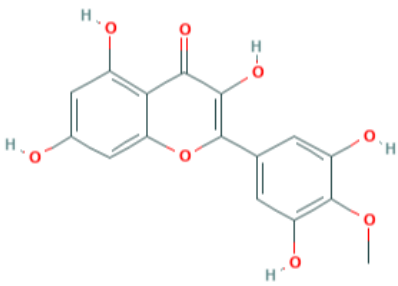
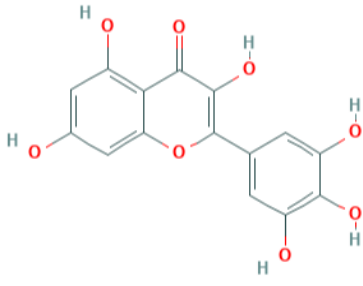


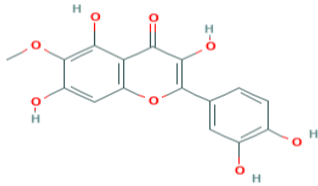
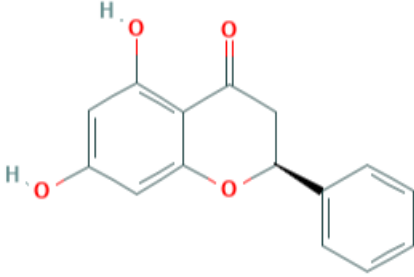
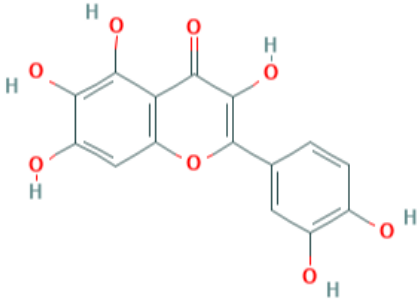
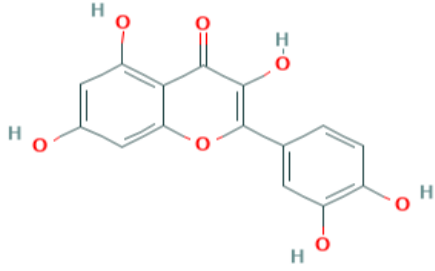
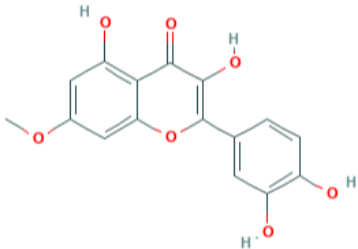
kaempferol-3-rhamnoside

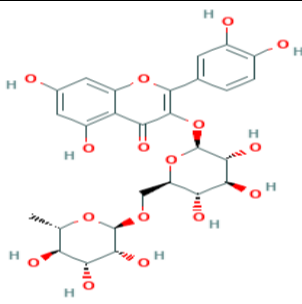
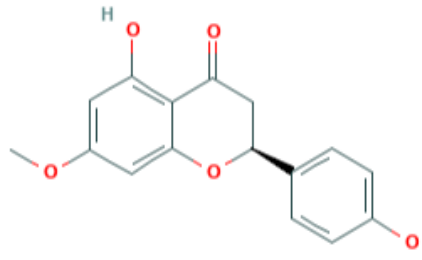
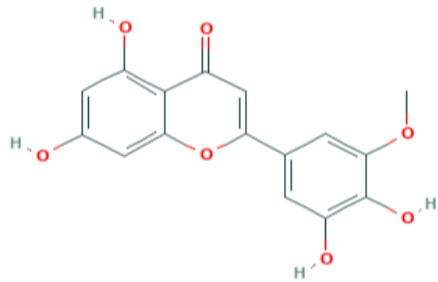
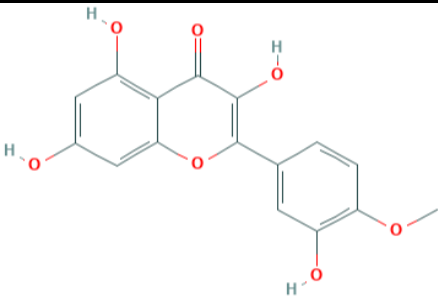
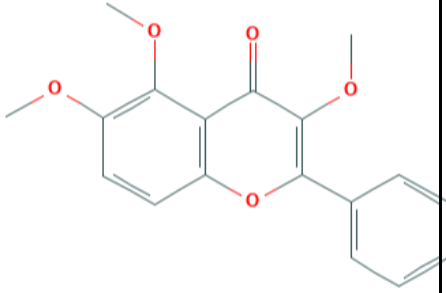
(Afzelin)

PubChem CID : 5316673



Kaempferol (Robigenin)	PubChem CID : 5280863	
Jaranol (Kumatakenin)	PubChem CID : 5318869	
3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone (luteolin)	PubChem CID : 5280445	
2-(3,5-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one (mearnsetin)	PubChem CID : 10359384	
3,5,7-Trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one (myricetin)	PubChem CID : 5281672	

Patuletin 6-Methoxyquercetin	PubChem CID : 5281678	
Pinocembrin 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-, (2S)-	PubChem CID : 68071	
Quercetagetin 6-Hydroxyquercetin	PubChem CID : 5281680	
(Quercetin) Xanthaurine	PubChem CID : 5280343	
beta-Rhamnocitrin Rhamnetin	PubChem CID : 5281691	

Quercetin 3-rutinoside (Rutin)	PubChem CID : 5280805	
(S)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxychroman-4-one (Sakuranetin)	PubChem CID : 73571	
3'-O-methyltricetin (selagin)	PubChem CID : 11267045	
4'-Methoxyquercetin (Tamarixetin)	PubChem CID : 5281699	
3,5,6-trimethoxy-2-phenylchromen-4-one (Trimethoxyflavone)	PubChem CID : 53666501	

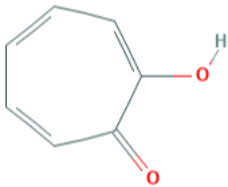
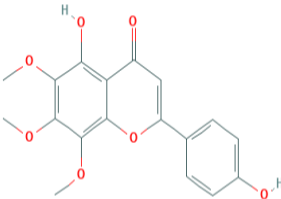
2-Hydroxycyclohepta-2,4,6-trienone (Tropolone)	PubChem CID : 10789	
4',5-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (Xanthomicrol)	PubChem CID : 73207	

Tableau N°4 : Structure chimiques de l'amphotéricine B et ses dérivés.

1.1 Programmes MOE

MOE a été sélectionné pour l'amarrage parmi les diverses ressources disponibles car il possède une interface graphique conviviale. Il représente une bonne vue graphique des résultats en montrant les résidus de liaison au ligand et au récepteur avec leurs positions et interactions. Dans le MOE, les affinités de liaison récepteur-ligand avec toutes les géométries de liaison possibles sont hiérarchisées sur la base d'une valeur numérique appelée S-score. Le MOE a des applications multidisciplinaires, telles que la conception basée sur la structure, la conception basée sur les fragments, la découverte de pharmacophores, les applications de chimie médicinale, les applications biologiques, la modélisation des protéines et des anticorps, la modélisation et les simulations moléculaires, la chimie et QSAR, ainsi que le développement et le déploiement de méthodes . Le MOE identifie les ponts salins, les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes, le soufre-LP, le cation- π et l'exposition aux solvants, et donne le score S. Les interactions des inhibiteurs avec les protéines réceptrices sont prédites sur la base du score S. (Syed A et al 2019)

2. Méthodes

2.1 Préparation des ligands et des protéines

La préparation de la protéine cible, la tyrosinase utilisée dans cette étude a été réalisé à l'aide du programme BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020 (v20. 1.0.19295). En utilisant ce programme, les molécules d'eau seront éliminées à partir de la structure cristalline de la tyrosinase (PDB: 2y9x) lié avec son ligand (tropolone).

La deuxième étape de préparation, consiste à l'addition des atomes d'hydrogène et la charges Kollman ceci à l'aide du programme MOE 2015 (Molecular Operating Environment) (Version

2016. 02) et par la suite les ligands seront enregistrés en format PDB. Pendant la préparation l'énergie des phytoligands est minimisée par l'algorithme Gasteiger.

2.2 Amarrage moléculaire

L'analyse de l'amarrage moléculaire est réalisée par l'outil MOE 2015 pour déterminer l'énergie d'interaction entre les ligands et les protéines cibles.

Le même programme est utilisé aussi pour obtenir le grid box en 3D pour la simulation du docking dans lequel le box d'une taille de 40x40x40, et 0,742 Å est créé et centré à (x = 13.544, y = 12.198, z = 67.681) autour des résidus du site actif de la protéine cible 6lu7. De plus, le grid box de la protéine spike est centré à (x=-36.921, y = 30.66, z = 2.967) avec un espacement de 0.503 Å de dimensions de 40 x 84 x 40, pour couvrir le site actif avec les résidus essentiels du site d'interaction.

Les sites d'interaction entre les phytoligands et la tyrosinase seront déterminés par le programme MOE 2015.

3. Règles de Lipinski

Chaque médicament éventuel doit se conformer à plusieurs critères de base, tels son faible coût de production, être soluble, stable mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité. Ainsi, en 1997, Lipinski et al .proposent ce qu'on appelle couramment la « règle de Lipinski » ou la « règle de 5 » permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure 2D. Selon cette règle un composé possède toutes les chances d'être absorber par voie orale s'il respecte au moins 3 des 5 critères représentés dans le tableau N°6

Tableau N°6: Valeurs seuils des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règle de Lipinski

Propriétés Physico-Chimiques	Règle de Lipinski
Poids moléculaire (PM) en Daltons	≤ 500
Lipophile (LogP)	$-2 \leq \log P \leq 5$
Nombre de donneurs de liaisons hydrogène (DLH)	≤ 5
Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (ALH)	≤ 10
Le nombre de liaisons flexibles	≤ 15

Chapitre 5 :
Résultat et discussion

1. Introduction

Dans cette étude, nous avons exploré plusieurs outils de docking moléculaire pour leur application *in silico* dans le cadre de l'inhibition du Tyrosinase par une plante médicinale. Nous avons étudié les modes d'interactions des inhibiteurs de la Tyr par le logiciel MOE puis dans un deuxième temps. ont été développés la règle de Lipenski

Les composées qui sont fait des interactions avec les résidus d'acides aminées (GLU322 et THR324) de la tyrosinase ou bien ne possédants pas une action sur le centre active (Cu^{2+}) de la tyrosinase dont une potentielle d'inhibition importante sur l'enzyme Tyr (Ya-Li et al., 2018), telle que la rutine. aussi les ligand qui sont fait des interaction avec les résidus His61, His85, His94, and His259, His263, His296 ont une capacité d'nhibition efficace de la Tyr (Suat S 2019)0. telle que : Tropolone, Axillarin, Jaranol, Aromadendrin, Casticin, mearnsetin.....etc.

Des phytoligands présente des interaction avec les résidus d'acides aminées Gly281, Ser282, Met280, His 263, Phe292, Val283, His61, Ala286, His85, His259, Phe264, Asn260, Met257 du site active de la Tyr ont une potentielle d'inhibition de l'enzyme (State et al., 2017), tel que: mearnsetin, casticine, aromadendrine.....etc.

2. Etude des interactions entre les inhibiteurs et la Tyrosinase

Dans le but d'étudier l'interaction des ligands dans le site actif de la TYR, nous avons choisi les 15 meilleurs inhibiteurs parmi 47 phytoligands testé dont l'énergie d'interaction calculée par le logiciel MOE.

CID	Ligands	S (Kcal/mol)	RMSD	Don. D'atome H	Les acides aminés d'interaction
10789	Tropolone		1,96	HIS 85	HIS 85 ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256

5281603	Axillarin	-5,95	1,45	/	ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256
5318869	Jaranol	-5,97	0,72	/	ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256 VAL 283
181132	Aromadendrin	-5,98	0,99	/	GLU 322 ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256
5315263	Casticin	-6,03	0,84	/	ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256 VAL 283
					THR 84 HIS 85

10359384	mearnsetin	-6,11	1,79	/	GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256 HIS 85
53666501	Trimethoxyflavone	-6,16	1,70	/	THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256
96539	Gardenin B	-6,23	1,94	/	THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256 VAL 283
7020615	Eupatorine	-6,24	1,79	/	ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256 HIS 85

11267045	Selagin	-6,26	1,84	SER 282	SER 282 ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256
5316673	Afzelin	-6,43	1,83	MET 257	MET 257 ASN 260 HIS 263 MET 280
5379096	Jaceosidin	-6,50	1,96	SER 282	SER 282 ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256
5280805	Rutine	-6,74	1,88	GLU 322 MET 257 MET 257	GLU 322 MET 257 MET 257 THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256 VAL 283
					THR 84 HIS 85

6474309	Isochlorogenica cid C	-6,90	1,88	/	GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256
6474310	Isochlorogenica cid A	-6,96	1,722	/	THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280

Rmsd: Root mean square deviation. S: Energie d'interaction

Tableau N°6 : Résultats des énergies et Rmsd d'interactions des 15 meilleurs inhibiteurs de la Tyrosinase

3. Analyse visuelle

La conformation des ligands dockés est visualisée à l'aide de logiciel MOE qui permet de visualiser les fichiers au format PDB, dans l'analyse visuelle nous avons basé sur deux paramètres ; le nombre de liaison, et le nombre d'acide aminé entre le site actif de récepteur Tyr et les inhibiteurs.

Analyse visuelle montre la tropolone à une énergie d'interactions de -4.22; en établissent deux liaisons l'un formé entre l'atome d'oxygène du cycle aromatique de ligand et l'atome de cuivre du site actif de la Tyr séparer par une distance de 2.66 Å et l'autre former entre l'atome OH et le résidu His 85 du site actif avec une distance 2.92 Å. Le complexe est stabilisées par des interactions métalliques avec les résidu , ASN 260, HIS 263, MET 280, THR 84, HIS 85 GLU 256. ces résultats relativement similaire para port à des résultats trouvées par (Meihui et al., 2017).

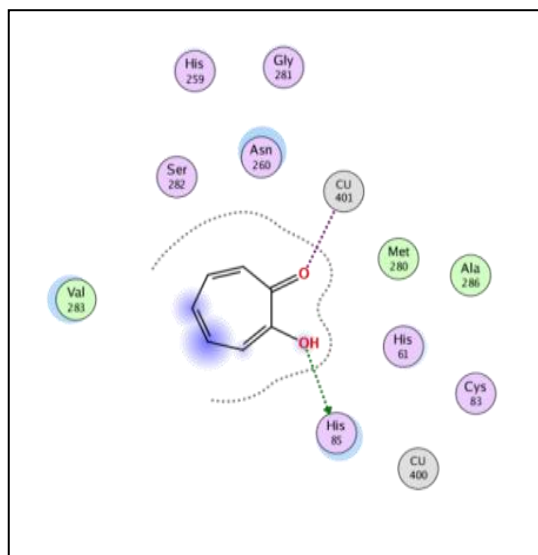


Figure 21 : Le ligand **Tropolone** est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

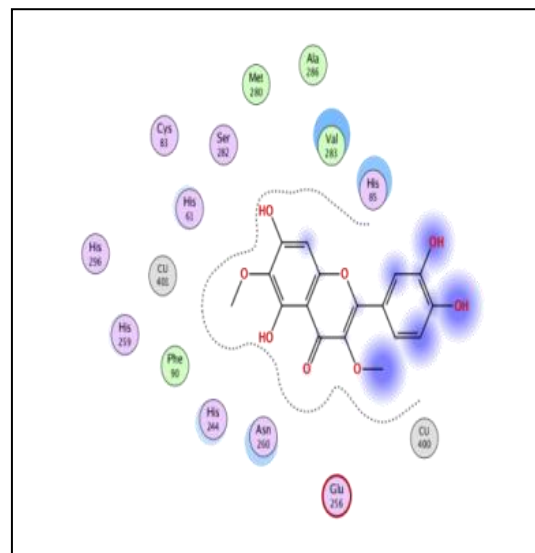


Figure 22 : Le ligand **Axillarinet** est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

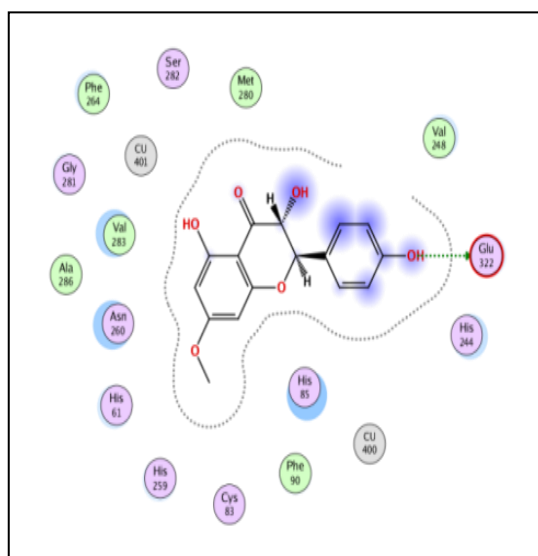


Figure 23 : Le ligand **Aromadendrin** est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

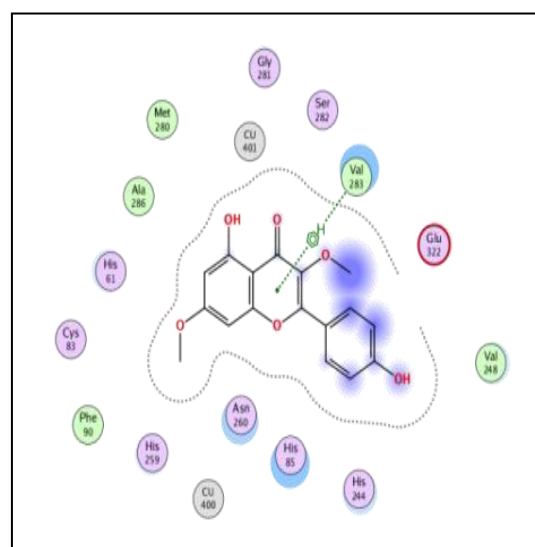


Figure 24 : Le ligand **Jaranol Kumatakenin** est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

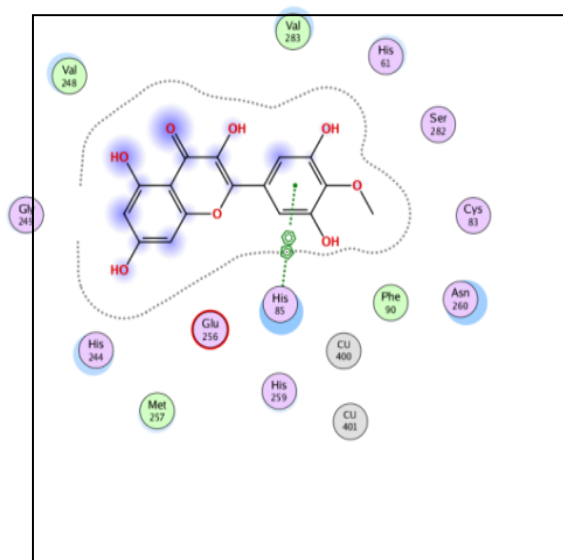


Figure 25 : Le ligand **mearnest** visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

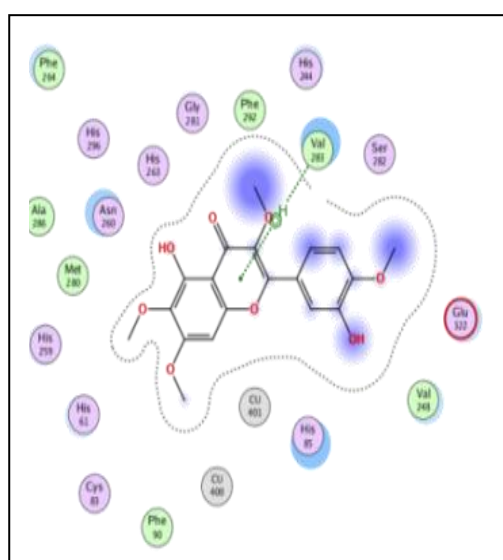


Figure 26 : Le ligand **Casticinest** visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

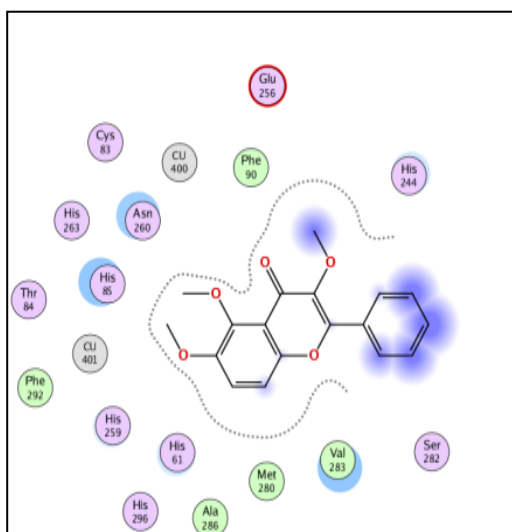


Figure 27 : Le ligand **Trimethoxyflavoneest** visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

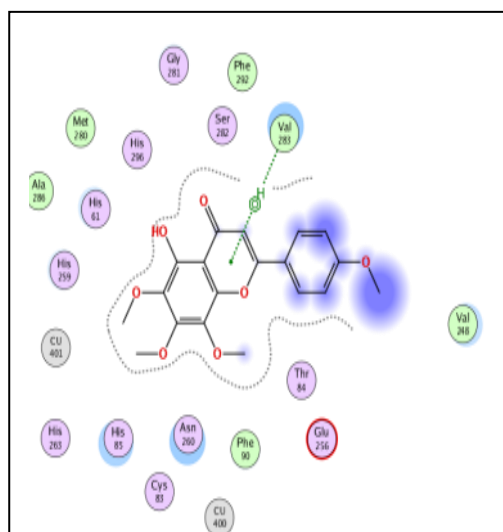


Figure 28 : Le ligand **Gardenin Best** visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

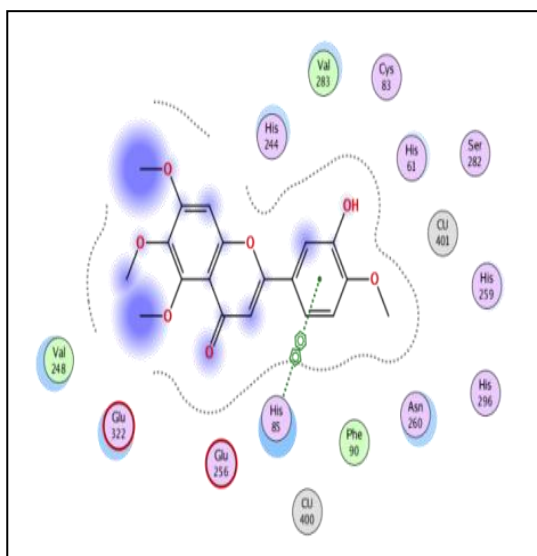


Figure 29 : Le ligand **Eupatorine** est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

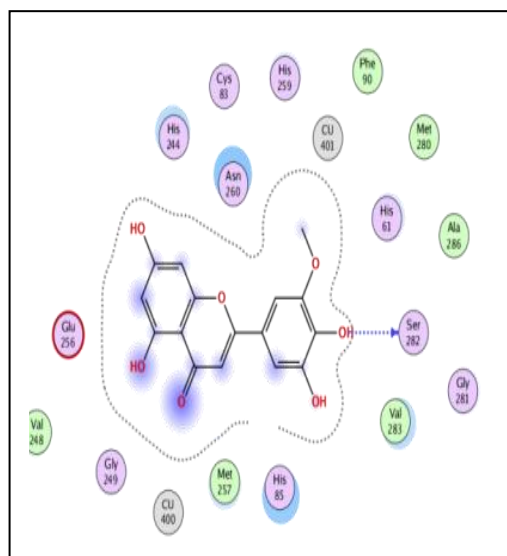


Figure 30 : Le ligand **selaginest** visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

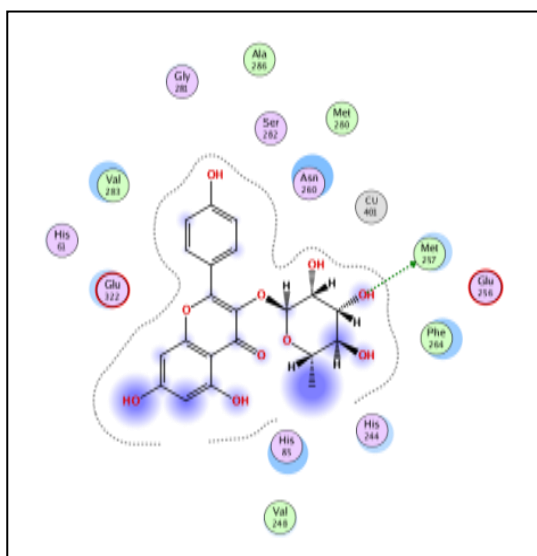


Figure 31 : Le ligand **Afzelinest** visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

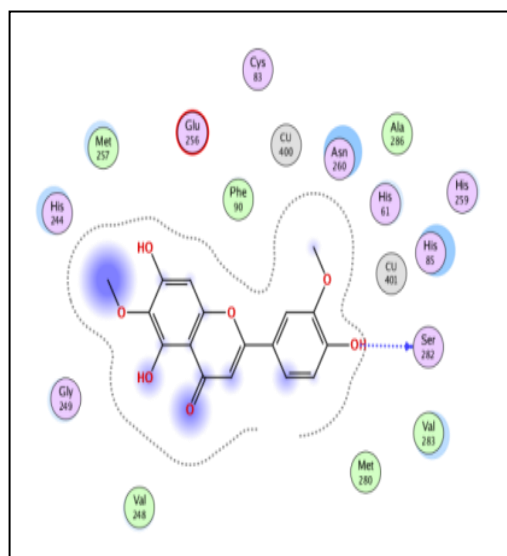


Figure 32 : Le ligand **Jaceosidin** est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

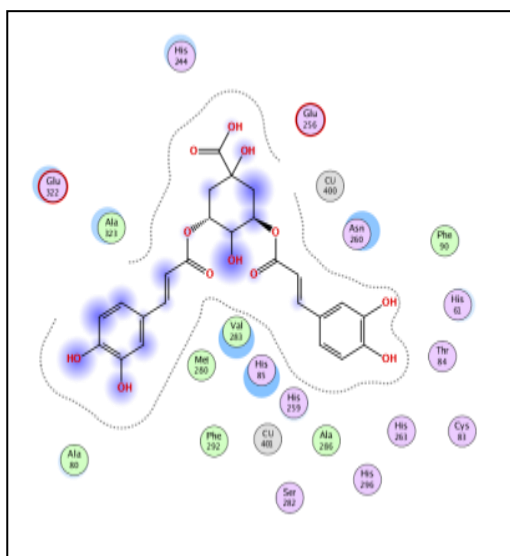


Figure 33: Le ligand Isochlorogenic acid est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

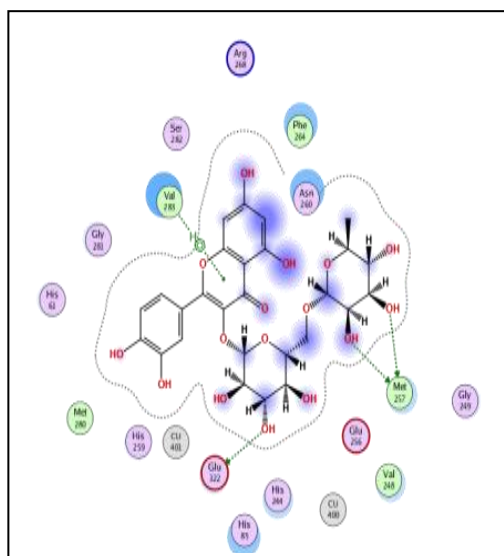


Figure 34 : Le ligand Rutin est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

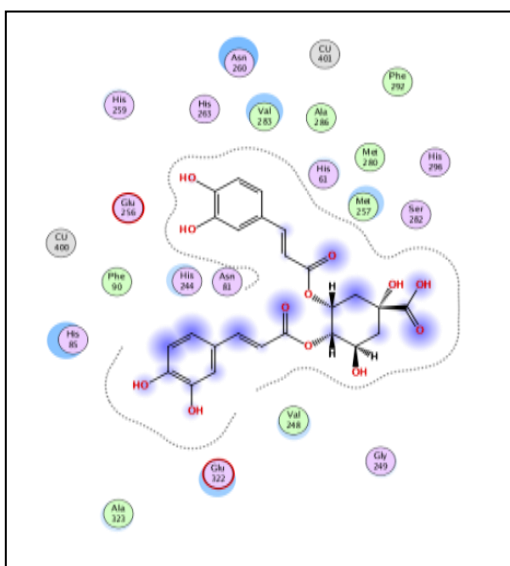


Figure 35 : Le ligand Isochlorogenic acid est visualisé avec le logiciel MOE dans le site actif de la Tyr

4. Les cinq meilleurs inhibiteurs sélectionnés

4.1 . Interactions entre Isochlorogenic acid et le site actif

Le Isochlorogenicacid A et C sont une classe prédominante d'acide phénolique présent dans le café (Jasmin, 2015). L'énergie d'interaction pour les deux inhibiteurs calculée par MOE est égale successivement : -6,96 et -6,90 kcal/mole .

L'analyse visuelle réalisée montre que l'inhibiteur Isochlorogenicacid A est bien placée dans le site actif de la Tyr où il est stabilisé par de nombreuses liaison grâce à 6 acides aminés suivant : THR 84, HIS 85, GLU 256, ASN 260, HIS 263, MET 280.

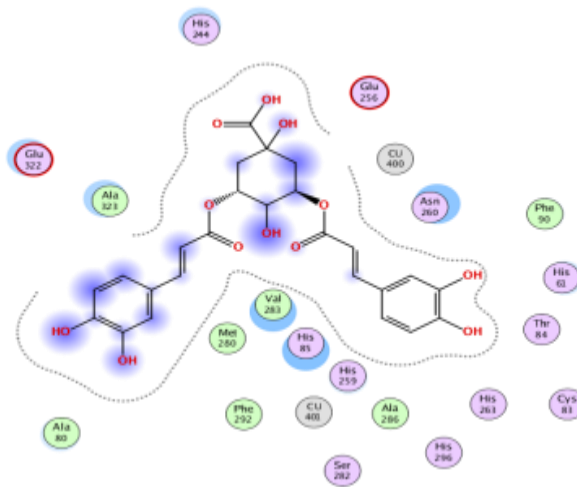


Figure 36 : Mode d'interaction de l'inhibiteur ICG acidA dans le site actif de la Tyr Et aussi l'interaction du Tyr avec l'inhibiteur Isochlorogenicacid C qui fait par 7 AA qu'ils sont : THR 84, HIS 85, GLU 256, ASN 260, HIS 263, MET 280, GLU 256.

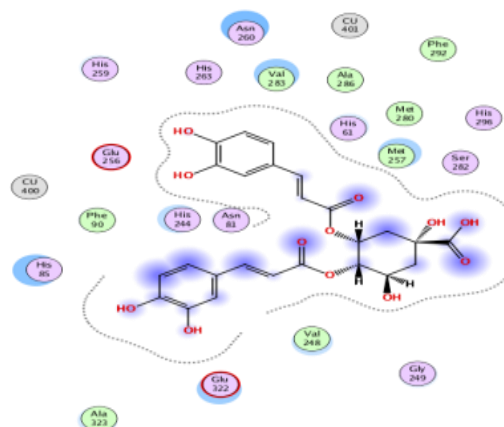


Figure 37 : Mode d'interaction de l'inhibiteur ICG acidC dans le site actif de la Tyr

4.2 Interactions entre l'inhibiteur Afzelin et le site actif

L'énergie d'interaction calculée par MOE est égale à -6,4350 kcal/mole, l'analyse visuelle réalisée montre que cet inhibiteur est placé dans le site actif de la Tyr où il est stabilisé par de nombreuses liaisons grâce à 4 acides aminés suivant : ASN 260, MET 257, HIS 263, MET 280 avec l'acide A MET 257 comme donneur d'hydrogène.

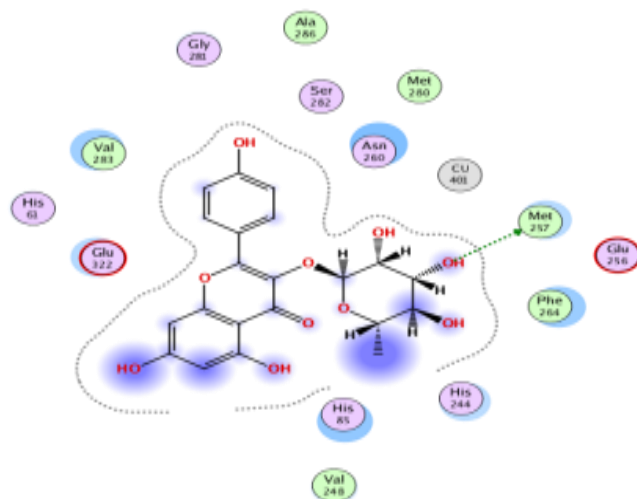


Figure 38 : Mode d'interaction de l'inhibiteur Afzelin dans le site actif de la Tyr.

4.3 Interactions entre l'inhibiteur Rutin et le site actif

L'énergie d'interaction calculée par MOE est égale à -6,74kcal/mole, l'analyse visuelle réalisée montre que cet inhibiteur est placé dans le site actif de la Tyr où il est stabilisé par de nombreuses liaisons grâce à 11 acides aminés suivant : GLU 322, MET 257, MET 257, THR 84, HIS 85, GLU 256, ASN 260, HIS 263, MET 280, GLU , 256 VAL 283 avec les acides A GLU 322, MET 257, MET 257 comme des donneurs d'hydrogène.

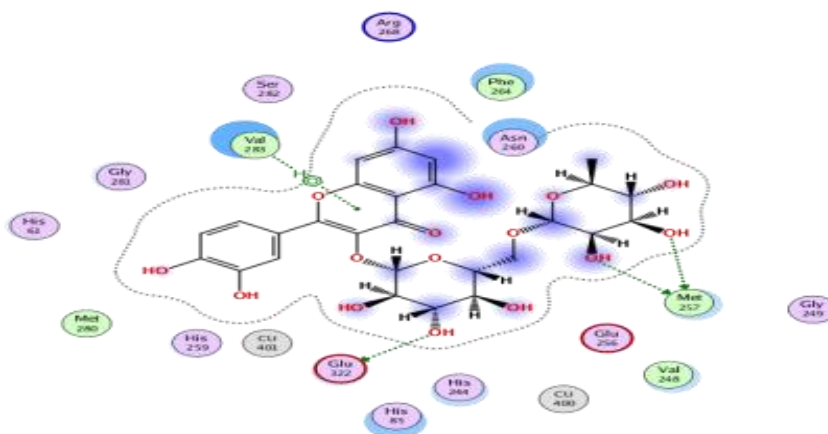


Figure 39 : Mode d'interaction de l'inhibiteur Rutin dans le site actif de la Tyr

4.4 Interactions entre l'inhibiteur Jaceosidin et le site actif

L'énergie d'interaction calculée par MOE est égale à **-6,5050** kcal/mole, l'analyse visuelle réalisée montre que cet inhibiteur est placé dans le site actif de la Tyr où il est stabilisé par de nombreuses liaisons grâce à 11 acides aminés suivant : **SER 282, ASN 260, HIS 263, MET 280, THR 84, HIS 85, GLU 256, GLU 256**, avec l'acides A **SER 282** comme donneur d'hydrogène.

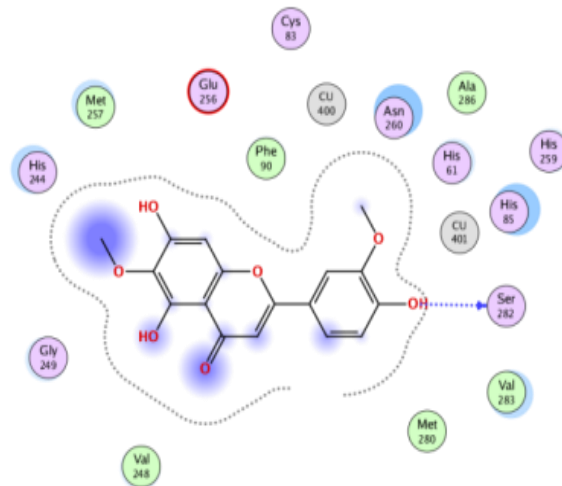


Figure 40 : Mode d'interaction de l'inhibiteur **Jaceosidin** dans le site actif de la Tyr.

5. Résultat de la règle de Lipinski

Avant de proposer les composés **Isochloroge-nicacid A, Isochloroge-nicacid C, Rutin, Jaceosidin et Afzelin** comme étant des inhibiteurs plus puissants de la Tyr, il était indispensable de compléter leur étude par l'application de la règle de 5 de Lipinski afin de savoir si ces composés peuvent être administrés par voie orale. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

Ligands	log p	Mw	noN	noHNH	lip_violation
Isochloroge- nicacid A	2.7290	516.4550	10	8	3
Isochloroge- nicacid C	2.4807	516.4550	10	8	3
Rutin	-1.1130	610.5210	15	10	3
Jaceosidin	2.4400	330.2920	6	3	0
Afzelin	1.0760	432.3810	9	6	1

Mw :poids moléculaire ;

nOH, NH : nombre de donneurs de liaisons H ;

nO, N : nombre d'accepteurs de liaisons H ;

logP : logP ou coefficient de partition calculé

Tableau N°7 : Valeurs des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règleLipinski.

On peut avoir à travers le Tableau (1) que tous les ligands ont des nombres accepteurs d'hydrogene inferieurs à <10 sauf le rutine et le nombre donneurs d'hydrogene inferieurs à 5. Le poids moléculaire de tous les ligands sont à <500 D ainsi ils peuvent facilement passer à travers la membrane cellulaire. A l'exception la rutine son PM 610.52 Da . Tous les ligands présentés dans le tableau ayant les valeurs de la *logP* inférieure à 5. Donc ils sont une bonne solubilité dans l'eau, une meilleure tolérance gastrique et une élimination efficace par les reins et une bonne perméabilité à travers la membrane cellulaire. Ensuite, quand sa valeur de nombre de violations est égale n=1 ou n<0 signifie les ligands facilement lier au récepteur.

À l'issu de ce test, les composés **Afzelin, Jaceosidin, Rutin, Isochloroge-nicacid C, Isochloroge-nicacid A** se présentent comme étant des inhibiteurs théoriques de la Tyr, pouvant être administrés par voie orale, ce conformément à la règle de Lipinski. Cependant, la **Rutin** n'est pas considéré comme candidat potentiel car ne validant pas cette règle.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont orientés vers la recherche d'une molécule à une capacité d'inhiber la tyrosinase. Afin d'atteindre cet objectif nous sommes passés par plusieurs étapes :

Dans une première étape nous avons appliqué un criblage, basé sur une simulation de docking moléculaire, sur 47 phytoligands afin d'étudier leurs mode d'interaction vis à- vis de notre cible d'intérêt biologique (entre la Tyr) et la structure tridimensionnelle de cette enzyme est obtenue à partir de la banque des données PDB avec l'identifiant 2y9x lié avec le tropolone comme inhibiteur standard. Le processus du docking est assisté par le programme Molecular Operating Environment (MOE). L'étude a révélé que les ligands Isochlorogenic acid A et C, Afzelin, Rutin et Jaceosidin sont les meilleurs complexes, ceci justifier par la présence des différents types d'interactions et en plus ces ligands possèdent les plus basses énergies de score par rapport aux autres.

Suite à cette étude nous avons pu élucider les mécanismes d'interaction entre Tyr et ces ligands par visualisation des différents types des interactions mis en jeu.

Les résultats de docking ont indiqué que les meilleurs des complexes ont montré des interactions de liaison hydrogène avec His85, Ser282, Met257, Glu322.

Il serait également très intéressant de poursuivre ce travail en mesurant l'effet inhibiteur in vitro des meilleurs ligands sur l'activité de la tyrosinase et de déterminer le mécanisme d'inhibition.

*Références
bibliographique*

Abdallah Chaouche Med Larb, mémoire de Master 2 en Biochimie. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des alcaloïdes dans l'inhibition de la télomérase par docking moléculaire .Université Constantine 1 , (2014).

Anderson, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*. 7: 1973-1988.

Aurélien Grosdidier. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Sciences pharmaceutiques. 2007. dumas-01115990

B.Bouchard 1993 :chargé de recherche a l'inserme. Inscrm I. 312, opitale henry-mondor, 51, avnuc du maréchal-de-lattrc-2-Tassigny, 94010 Créteil, France 1993).

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.

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.

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 Sacchetti, J.C. 1999. Catechol oxidase-structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.

Eve O Pharmacochimie des aurones pour la modulation d'enzymes. Thèse d'université : Chimie-Biologie. Paris : Université de Grenoble. France. 2011. 258 p.

Eve O. Les produits depigmentants. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier. France. 2011. 79 p.

Grenoble :Université Joseph Fourier. hypermélanosomes (Eve O. Les produits depigmentants. thèse de doctorat en pharmacie. France. 2011. 79 p.)

Hamann J.N., Herzigkeit B., Jurgeleit R., Tuczec 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

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.

JP et al. Mechanisms regulating skin pigmentation : the rise and fall of complexation coloration. *Ebanks Int J Mol Sci*, 10(9):4066 – 4087. 2009.

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.

Krid Y. Conception in silico de nouveaux flavonols inhibant potentiellement l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine pour le traitement de l'hypertension artérielle. Mémoire de Master en Biochimie Moléculaire et Santé, Université des Frères Mentouri, Constantine. Algérie. 2013. 51 p.

Kuntz ID., Blaney JM., Oatley SJ., Langridge R., Ferrin TE. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* 161 : 269–88.

Lee S.Y., Baek N., Nam T.G. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016; 31: 1-13)

Les produits depigmentants. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier. France. 2011. 79 p.

Levinthal C., Wodak SJ., Kahn P., Dadivanian A.K. 1975. Hemoglobin interaction in sickle cell fibers. I. Theoretical approaches to the molecular contacts. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 72 : 1330–34.

Li Q., Yang H., Mo J., Chen Y, Wu Y., Kang C. Identification by shape-based virtual screening and evaluation of new tyrosinase inhibitors. PeerJ. 2018; 6: 4206.

Mayer, A.M and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. Phytochemistry. 18: 193-215.

Mayer, A.M. 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants—Recent progress. Phytochemistry. 26 : 11-20.

Mayer, AM. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A

Meihui Fana, Guowen Zhanga,□, Xing Hua, Ximing Xub, Deming Gongac, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, 235 Nanjing East Road, Nanchang 330047, China b Institute of Bioinformatics and Medical Engineering, School of Electrical and Information Engineering, Jiangsu University of Technology, 1801 Avenue of Zhongwu, Changzhou 213001, China

Meihui Fana, Guowen Zhanga,□, Xing Hua, Ximing Xub, Deming Gongac,

Melle EL HADJ SAID kenza .Diplôme de master en chimie . Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire, université de Tlemcen, (2016).

MERZOUG Amina, thèse de magistère, Étude in silico de l'inhibition de la peptide déformylase , Université Mentouri Constantine ,(2012).

Nathalie Migan. Étude des agents dépigmentants et de leur utilisation détournée dans la dépigmentation volontaire. Sciences pharmaceutiques. 2014.dumas-00948541

Nerya O et al. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. J Agric Food Chem. 51(5):1201-1207. 2003.

Okombi S. Recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. Thèse de doctorat en Chimie organique. Grenoble : Université Joseph Fourier Grenoble 1. France. 2005. 171 p.

Okombi S. Recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. Chimie organique. Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2005. Français.tel-00846562

Ortiz-Ruiz V., Garcia-Molina., Tudela J., Tomas V., Garcia-Canovas F. Discrimination between alternative substrates and inhibitors of tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63: 2162-2171.

Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. 1994a. *Agaricus bisporus* tyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221

Pillaiyar T., Manickam M., Namasivayam V. Skin whitening agents : medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017; 32: 403–425

Qian, G-Y., Park, Y-D. 2011. Computational simulations integrating inhibition kinetics of tyrosinase by oxalic acid. *International research of Pharmacy and Pharmacology*, 1: 126-

Qian, G-Y., Yin, S-J., Park, Y-D. 2012a. Effect of hesperetin on tyrosinase: Inhibition kinetics integrated computational simulation study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50: 257- 262.

review. *Phytochemistry*. 67: 2318-2331.

Rivas, N.D.J and Whitaker, J.R. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol.* 52: 501-507. 1973.

Si, Y-X., Wang, Z-J., Park, D., Chung, H Y., Wang, S-F., Yan, L., Yang, J-M.,

Soussou A. Étude des propriétés structurales, morphologiques et électrochimiques de couches minces de nanocomposites hybrides de type hydroxyde double lamellaire (HDL) /biomolécules : Application aux biocapteurs de polyphénols. Thèse de doctorat d'université : Physique, Laser, Matière et Nanosciences. Bordeaux : Université de Bordeaux. France . 2016. 189 p.

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, 235 Nanjing East Road, Nanchang 330047, China b Institute of Bioinformatics and Medical Engineering, School of Electrical and Information Engineering, Jiangsu University of Technology, 1801 Avenue of Zhongwu

Syed Awais Attique 1 , Muhammad Hassan 1, Muhammad Usman 1, Rana Muhammad Atif 2,3 , Shahid Mahboob 4 , Khalid A. Al-Ghanim 4, Muhammad Bilal 5 and Muhammad Zohaib Nawaz 1,3,* , 2019

Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.

Vaughn, K.C and Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.

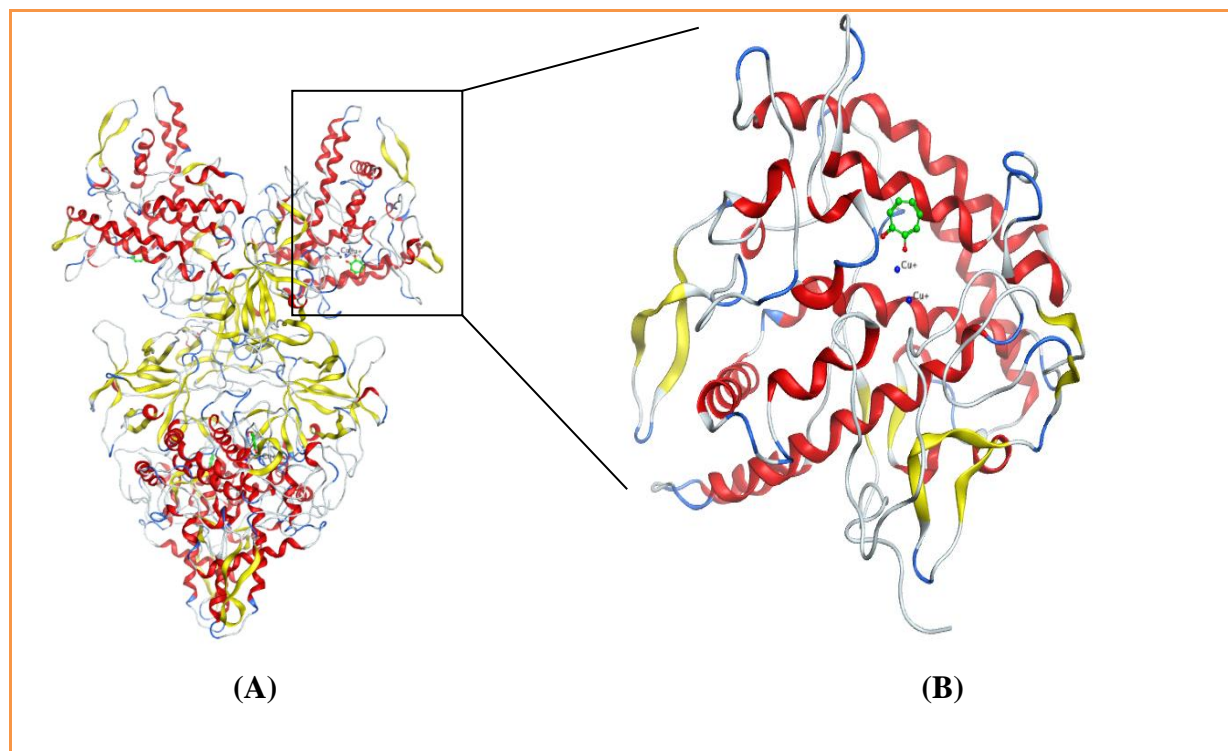
Whitaker J., Lee C. Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.

Yan, L., Yin, S-J, Park, D., Si, Y-X., Wang, Z-J., Chung, H Y., Yang, J-M.,

Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.

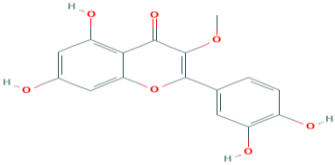
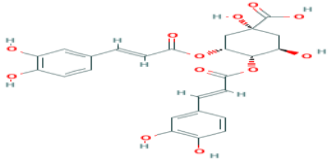
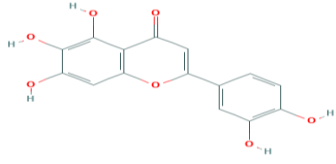
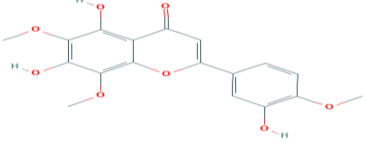
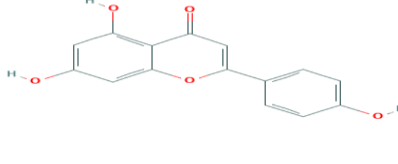
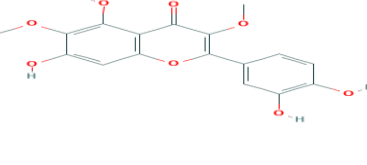
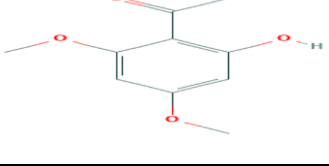
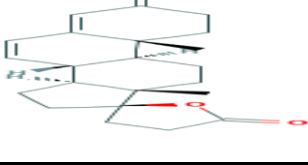
Annexes

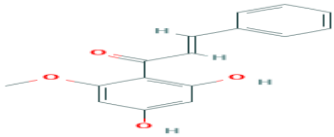
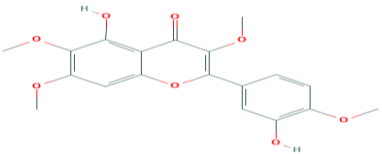
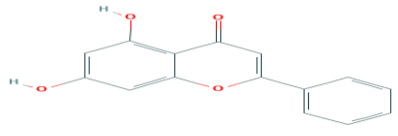
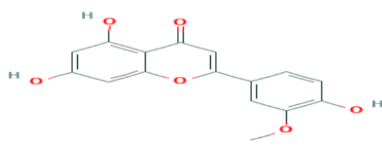
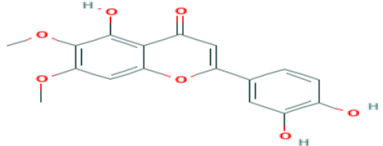
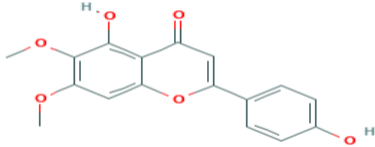
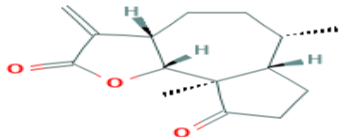
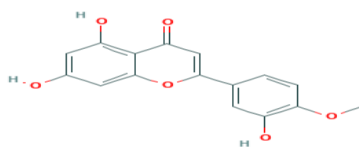
Annexe 1 : Structure cristalline de la protéine cible, tyrosinase (PDB code :2y9x) liée avec la tropolone (ligand) (A) et (B) le site d'interaction.

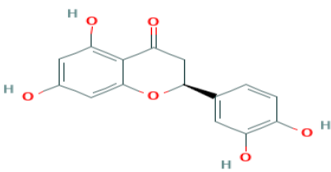
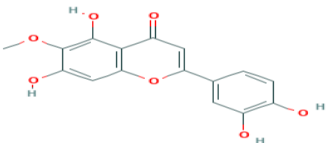
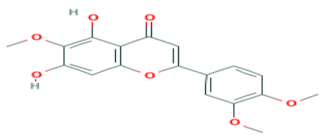
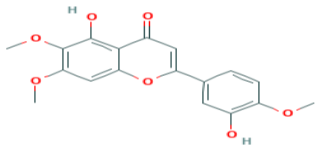
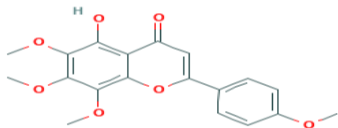
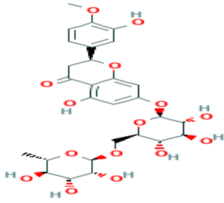
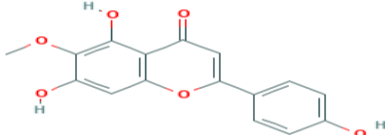


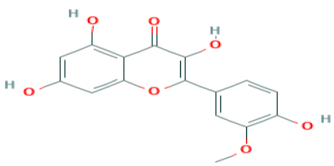
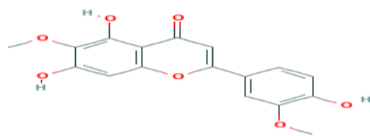
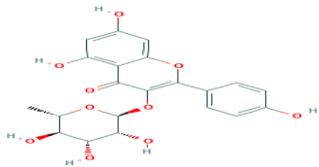
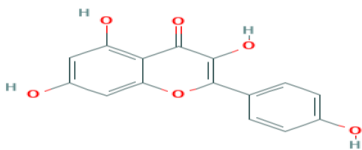
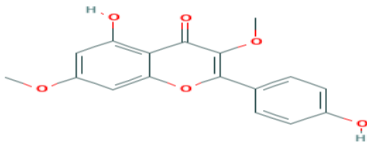
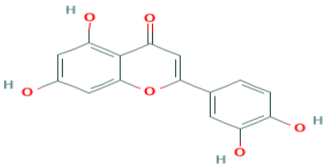
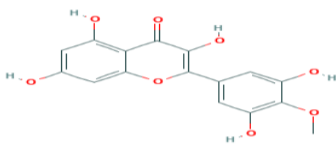
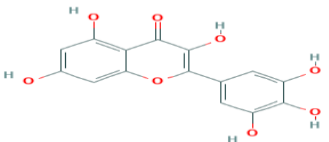
Annexe 2 : Structure chimiques de l'amphotéricine B et ses dérivés.

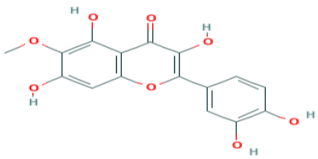
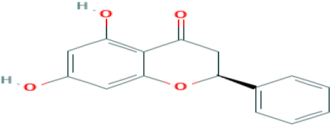
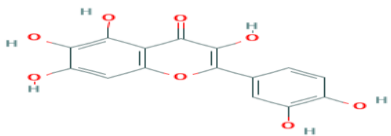
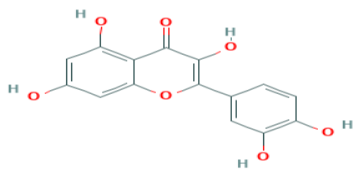
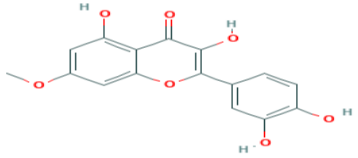
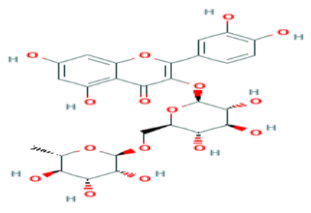
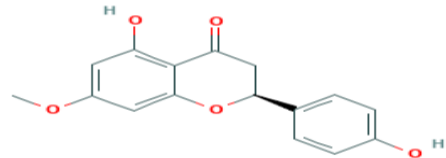
Nom	Code	Structure
3'-Hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone (Eupatorine)	PubChem CID : 7020615	
3,4',5-Trihydroxy-7-methoxyflavanone (Aromadendrin)	PubChem CID : 181132	
3,5-Dicaffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid A)	PubChem CID : 6474310	

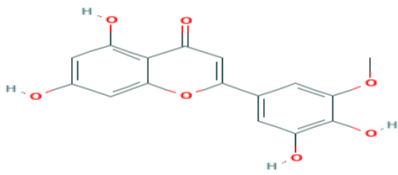
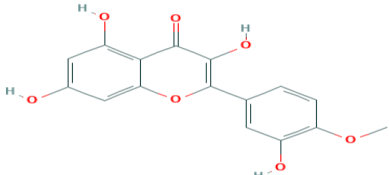
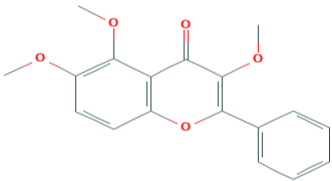
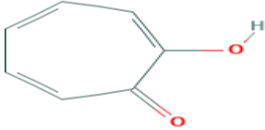
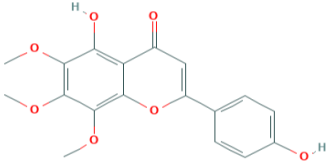
<p>2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-methoxy-4H-chromen-4-one (3-O-Methylquercetin)</p>	<p>PubChem CID : 5280681</p>	
<p>4,5-Di-O-caffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid C)</p>	<p>PubChem CID : 6474309</p>	
<p>5,6,7,3',4'-Pentahydroxyflavone (6-Hydroxyluteolin)</p>	<p>PubChem CID : 5281642</p>	
<p>3',5,7-Trihydroxy-4',6,8-trimethoxy flavone (Acerosin)</p>	<p>PubChem CID : 177696</p>	
<p>5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one (apigenin)</p>	<p>PubChem CID : 5280443</p>	
<p>3,6-Dimethoxyquercetagenin (Axillarin)</p>	<p>PubChem CID : 5281603</p>	
<p>2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxyacetophenone (Xanthoxilin)</p>	<p>PubChem CID : 66654</p>	
<p>Aldadiene (Canrenone)</p>	<p>PubChem CID : 13789</p>	

Dihydroxymethoxychalcone (Cardamonin)	PubChem CID : 641785	
Quercetagenin 3,6,7,4'- tetramethyl ether (Casticin)	PubChem CID : 5315263	
5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin)	PubChem CID : 5281607	
3'-Methoxyapigenin (Chrysoeriol)	PubChem CID : 5280666	
3',4',5-Trihydroxy-6,7- dimethoxyflavone (Cirsiliol)	PubChem CID : 160237	
4',5-Dihydroxy-6,7- dimethoxyflavone (Cirsimaritin)	PubChem CID : 188323	
dihydro-Dihydroambrosin (Damsin)	PubChem CID : 14631	
Luteolin 4'-methyl ether (Diosmetin)	PubChem CID : 5281612	

(S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-4-benzopyrone (Eriodictyol)	PubChem CID : 440735	
2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-methoxy-4H-chromen-4-one (Eupafolin)	PubChem CID : 5317284	
5,7-Dihydroxy-3',4',6-trimethoxyflavone (Euptailin)	PubChem CID : 5273755	
855-96-9 3',5-Dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavone (Eupatorin)	PubChem CID : 97214	
5-hydroxy-6,7,8-trimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one (Gardenin B)	PubChem CID : 96539	
Hesperidin (Cirantin)	PubChem CID : 10621	
4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavone (Hispidulin)	PubChem CID : 5281628	

3-Methylquercetin (Isorhamnetin)	PubChem CID : 5281654	
4',5,7-Trihydroxy-3',6-dimethoxyflavone (Jaceosidin)	PubChem CID : 5379096	
kaempferol-3-rhamnoside (Afzelin)	PubChem CID : 5316673	
Kaempferol (Robigenin)	PubChem CID : 5280863	
Jaranol (Kumatakenin)	PubChem CID : 5318869	
3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone (luteolin)	PubChem CID : 5280445	
2-(3,5-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one (mearnsetin)	PubChem CID : 10359384	
3,5,7-Trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one (myricetin)	PubChem CID : 5281672	

Patuletin 6-Methoxyquercetin	PubChem CID : 5281678	
Pinocembrin 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-, (2S)-	PubChem CID : 68071	
Quercetagetin 6-Hydroxyquercetin	PubChem CID : 5281680	
(Quercetin) Xanthaurine	PubChem CID : 5280343	
beta-Rhamnocitrin Rhamnetin	PubChem CID : 5281691	
Quercetin 3-rutinoside (Rutin)	PubChem CID : 5280805	
(S)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxychroman-4-one (Sakuranetin)	PubChem CID : 73571	

3'-O-methyltricetin (selagin)	PubChem CID : 11267045	
4'-Methoxyquercetin (Tamarixetin)	PubChem CID : 5281699	
3,5,6-trimethoxy-2-phenylchromen-4-one (Trimethoxyflavone)	PubChem CID : 53666501	
2-Hydroxycyclohepta-2,4,6-trienone (Tropolone)	PubChem CID : 10789	
4',5-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (Xanthomicrol)	PubChem CID : 73207	

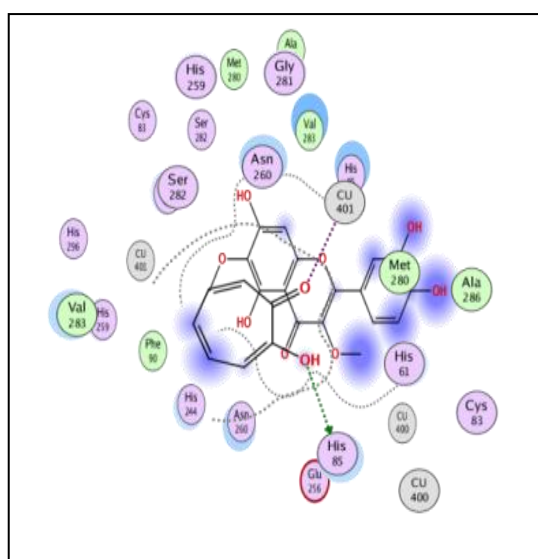
Annexe 3 : Résultats des énergies et Rmsd d'interactions des 15 meilleurs inhibiteurs de la Tyrosinase

CID	inhibiteur	s	RMS D	Don. Du H	Les acides amines d'interaction
10789	Tropolone	-4,22	1,96	HIS 85	HIS 85 ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256
5281603	Axillarin	-5,95	1,45	/	ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256
5318869	Jaranol Kumatakenin	-5,97	0,72	/	ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256 VAL 283
181132	Aromadendrin	-5,98	0,99	/	GLU 322 ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256
5315263	Casticin	-6,03	0,84	/	ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256 VAL 283
					THR 84

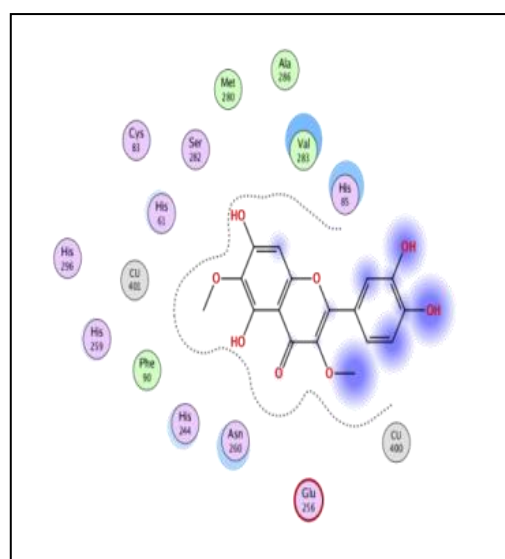
10359384	mearnsetin	-6,11	1,79	/	HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256 HIS 85
53666501	Trimethoxyflavone	-6,16	1,70	/	THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256
96539	Gardenin B	-6,23	1,94	/	THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256 VAL 283
7020615	Eupatorine	-6,24	1,79	/	ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256 HIS 85
11267045	selagin	-6,26	1,84	SER 282	SER 282 ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256 GLU 256
5316673	Afzelin	-6,43	1,83	MET 257	MET 257 ASN 260 HIS 263 MET 280
5379096	Jaceosidin	-6,50	1,96	SER 282	SER 282 ASN 260 HIS 263 MET 280 THR 84 HIS 85 GLU 256

					GLU 256
5280805	Rutin)	-6,74	1,88	GLU 322 MET 257 MET 257	GLU 322 MET 257 MET 257 THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256 VAL 283
6474309	Isochlorogenicacid C	-6,90	1,88	/	THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280 GLU 256
6474310	Isochlorogenicacid A	-6,96	1,722	/	THR 84 HIS 85 GLU 256 ASN 260 HIS 263 MET 280

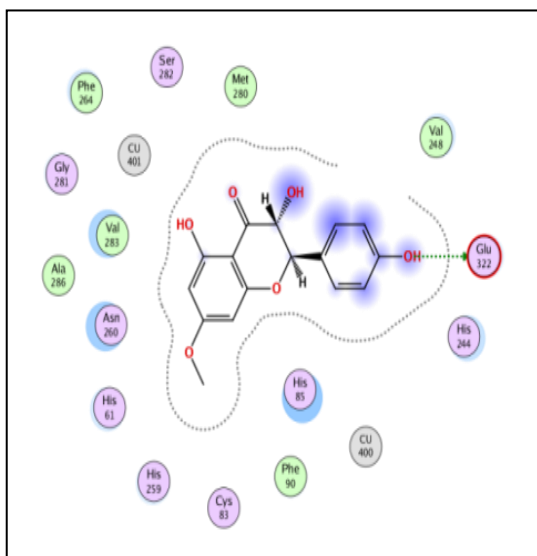
Annexe 4 : : Résultats d'interaction des 15 phytoligands avec le site active de la tyrosinase



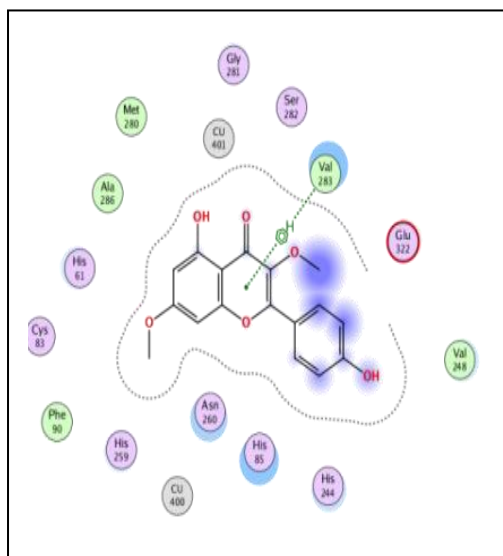
ligand Tropolone- site actif de la Tyr



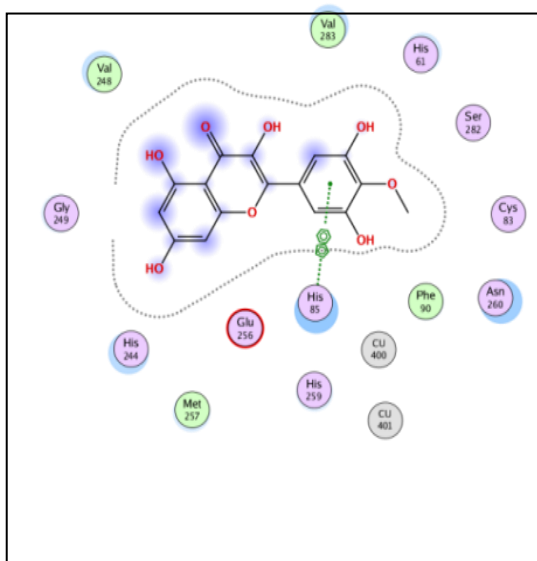
Axillarin -site actif de la Tyr



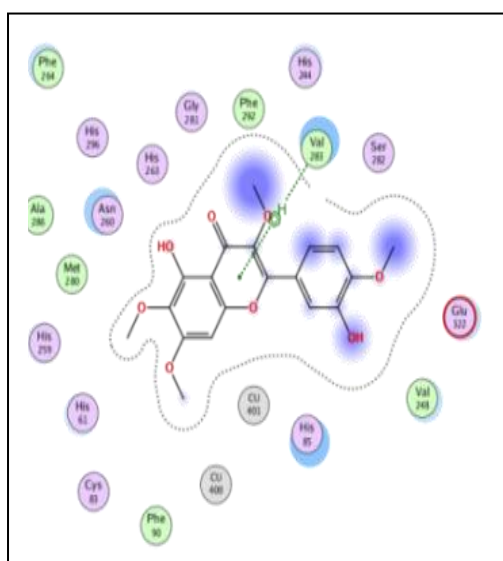
Aromadendrin - site actif de la Tyr



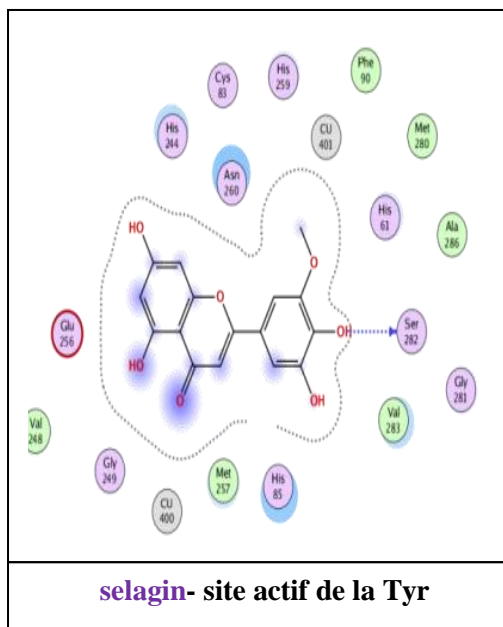
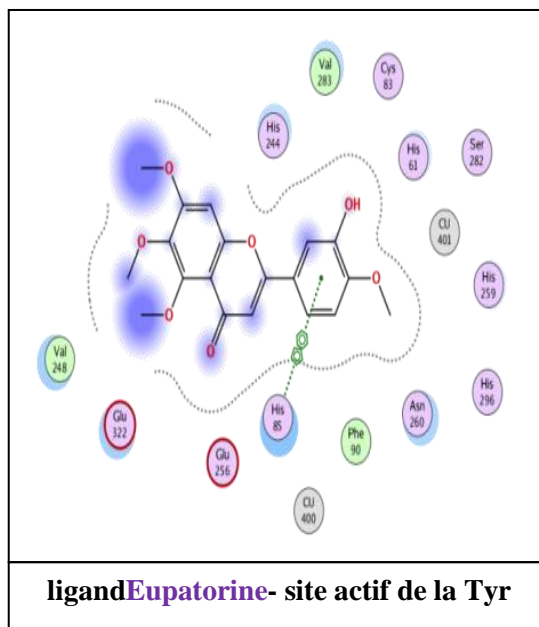
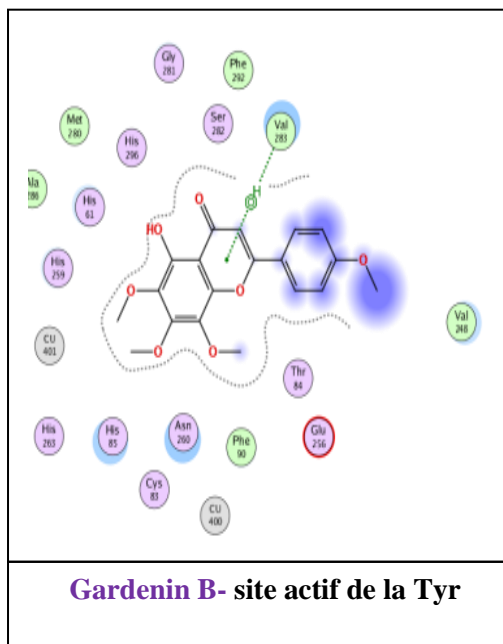
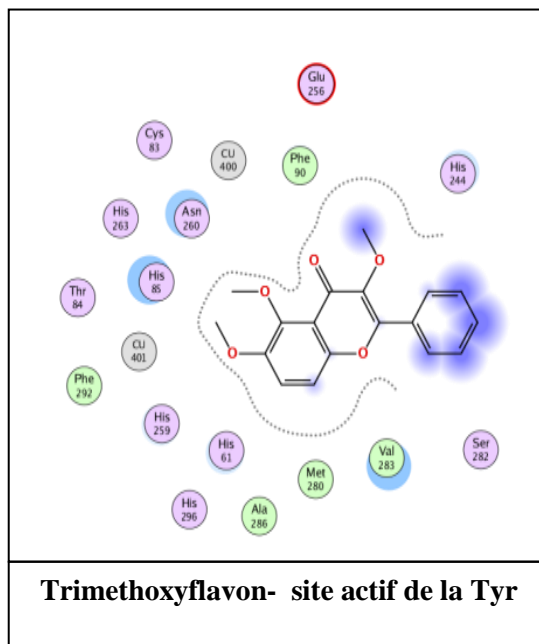
Kumatakenin - site actif de la Tyr

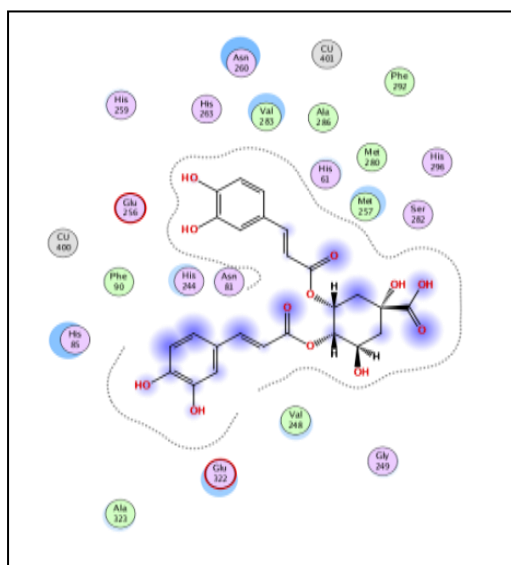


mearns - site actif de la Tyr



Casticin - site actif de la Tyr





Isochlorogenic acid -site actif de la Tyr

Annexe5: Valeurs des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règleLipinski.

Ligands	log p	Mw	noN	noHNH	lip_violation
Isochloroge- nicacid A	2.7290	516.4550	10	8	3
Isochloroge- nicacid C	2.4807	516.4550	10	8	3
Rutin	-1.1130	610.5210	15	10	3
Jaceosidin	2.4400	330.2920	6	3	0
Afzelin	1.0760	432.3810	9	6	1

Résumé

Résumé

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'effet inhibiteur des principaux constituant d'une plante aromatiques *Artemisia campestris* sur la tyrosinase à l'aide du criblage moléculaire. Le logiciel MOE est utilisé pour faire le docking moléculaire de tous les ligands. Sur les 47 molécules testées, seulement quatre ligands ce sont avérés les plus efficaces sur l'enzyme Afzelin, Jaceosidin, Isochloroge-nicacid A, et l'Isochlorogenic acide C avec des énergies d'interaction comprise entre: -6,43 et -6,9052kcal/mole.

Mots clés : Docking moléculaire ,Tyrosinase, *Artemisia campestris*, MOE, Energie de réaction

Summary

The main objective of this study is to evaluate the inhibitory effect of the main constituents of an aromatic plant *Artemisia campestris* on tyrosinase using molecular screening. MOE software is used for molecular docking of all ligands. Of the 47 molecules tested, only four ligands were found to be the most effective on the enzyme Afzelin, Jaceosidin, Isochloroge-nicacid A, and Isochlorogenic acid C with interaction energies between: -6.43 and -6.9052kcal /mole.

Keywords: Molecular docking, Tyrosinase, *Artemisia campestris*, MOE, Reaction energy

المخلص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم التأثير المثبط للمكونات الرئيسية للنبات العطري *Artemisia campestris* على التيروسيناز باستخدام الفحص الجزيئي. يستخدم برنامج MOE للالتحام الجزيئي لجميع الروابط. من بين 47 جزيئاً تم اختبارها ، تم العثور على أربعة فقط من الروابط الأكثر فعالية على الانزيم Afzelin و Jaceosidin و Isochloroge-nicacid A وحمض Isochlorogenic C مع طاقات التفاعل بين -6.43 و -6.9052 كيلو كالوري / مول.

الكلمات المفتاحية : الالتحام الجزيئي ، التيروسيناز ، الشيح الحقلي ، MOE ، طاقة التفاعل