



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCEN-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la
Terre et l'Univers

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté par

BENLADGHEM Meryem et HADJADJ AOUL Abir Narimane

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

PH-20, cible pour une contraception non hormonale

Soutenu le :

devant le jury composé de :

Présidente	TABET-HELAL Sana	Maître de conférences A	Université TLEMCEN
Examinatrice	BEREKSI REGUIG Selma	Maître de conférences B	Université TLEMCEN
Encadrante	BERRAHOUI Samira	Maître de conférences B	Université TLEMCEN

Année universitaire 2022/2023

REMERCIEMENTS

Avant tout nous remercions Allah le tout puissant qui nous a aidé et nous a donné la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre encadrante, Mme BERRAHOUI Samira, maitre de conférences au département de biologie, pour son soutien, sa grande disponibilité, ses encouragements, sa gentillesse et ses précieux conseils.

Nous tenons également à remercier, Madame TABET-HELAL Sana, maitre de conférences au département de biologie, et Madame BEREKSI REGUIG Selma, maitre de conférences au département de biologie, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Leurs remarques et critiques nous seront précieuses et enrichissantes.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude et nos remerciements sincères à Mr CHERRAK Sabri, maitre de conférences au département de biologie qui nous a aidés pour la réalisation de notre travail pratique. Nous le remercions pour sa disponibilité constante et pour nous avoir fait bénéficier de ses connaissances dans le domaine de docking moléculaire.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous nos enseignants du département de biologie à la faculté des sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout

Et que dieu leur accorde une longue vie.

Mes frères et Mes sœurs : **Assia ; Othmane ; khadidja** et **Abed EL illah.**

Mes chères amies : **Ahlem ; Nour El houda ; Saléha ; Chaimaa**

Je n'oublie pas de remercier et de dédier à toute ma famille

En fin je dédie tous ceux connu moi de près ou de loin.

MERYEM

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout

Et que dieu leur accorde une longue vie.

Mon frère : **MOUAAD**

Mes chères amies : **MAROUA ...**

Je n'oublie pas de remercier et de dédier à toute ma famille

En fin je dédie tous ceux connu moi de près ou de loin.

ABIR

Résumé

PH-20, une protéine du spermatozoïde, est indispensable pour la reconnaissance spécifique de la zone pellucide et la fusion avec l'ovocyte ; en son absence, la fécondation ne peut pas se faire.

Par docking moléculaire, nous avons recherché parmi les médicaments approuvés par la FDA, des inhibiteurs potentiels, susceptibles d'interagir avec PH-20. L'objectif est d'empêcher la fécondation par une approche contraceptive non hormonale.

Les résultats de l'amarrage moléculaire ont permis de ressortir 11 molécules susceptibles de se lier avec PH-20 avec une forte affinité de liaison.

Des études *in vitro* et *in vivo* seront nécessaires pour tester l'efficacité de ces molécules à faible dose afin d'éviter leurs effets secondaires.

Mots clés : PH-20, fécondation, contraception non hormonale, docking moléculaire.

Abstract

PH-20, a protein of sperm, is essential for specific recognition of the zona pellucida and fusion with the oocyte; in its absence, fertilization cannot take place.

Using molecular docking, we searched among FDA-approved drugs for potential inhibitors that could interact with PH-20. The goal is to prevent fertilization through a non-hormonal contraceptive approach.

Molecular docking results revealed 11 molecules likely to bind with PH-20 with high binding affinity.

In vitro and *in vivo* studies will be necessary to test the effectiveness of these molecules at low doses in order to avoid their side effects.

Keywords: PH-20, fertilization, non-hormonal contraception, molecular docking.

ملخص

PH-20 ، هو أحد البروتينات المكونة للحيوانات المنوية. من الضروري التعرف على المنطقة الشفافة والاندماج مع البويضة ؛ في غيابه ، لا يمكن أن يحدث الإخصاب.

باستخدام الالتحام الجزيني ، بحثنا بين الأدوية المعتمدة من إدارة الغذاء والدواء عن مثبطات محتملة يمكن أن تتفاعل مع PH-20. الهدف هو منع الإخصاب من خلال نهج منع الحمل غير الهرموني.

كشفت نتائج الالتحام الجزيني عن 11 جزيء يحتمل أن يرتبط ب PH-20 مع تقارب ارتباط عالٍ.

ستكون الدراسات في المختبر وفي الجسم الحي ضرورية لاختبار فعالية هذه الجزيئات بجرعات منخفضة من أجل تجنب آثارها الجانبية.

الكلمات المفتاحية: PH-20، الإخصاب ، منع الحمل غير الهرموني ، الالتحام الجزئي .

Liste des abréviations

RA : Réaction Acrosomique

ZP : Zone Pellucide

SPAM1 : Sperm Adhesion Molecule 1

PH-20 : Protéine Hyaluronidase 20

EMC : Matrice Extra Cellulaire

(rSPAM-1): SPAM 1 recombinant

AAS: Anticorps Anti-Spermatozoïdes

VC : Vaccin Contraceptif

AH : Acide Hyaluronique

FDA: Administration of Food Drug

PDB: Protéine Data Bank

GPI: GlyosylphosPhatidylInositol

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone

FSH: Follicule Stimulating Hormone

LH: Luteizing Hormone

HCG : Hormone Chronique Gonadotrophique

CSC : Cellule Souches du Cancer

PDGER: Platelet Derived Growth Factor Receptor

Shh: Sonic hedgehog

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

RMSD: Route Mine Scwer Diviage

Liste des figures

Figure 1: Schéma d'un ovocyte ovulé et du cumulus oophorus	3
Figure 2: Représentation schématique du spermatozoïde	4
Figure 3: Mécanisme de l'interaction spermatozoïde-ovule	6
Figure 4: Orientation chromosomique des gènes de la hyaluronidase	7
Figure 5: Modèle structurel de la hyaluronidase PH-20 humaine	9
Figure 6: Interaction spermatozoïde-ovule	9
Figure 7: Modèle schématique indiquant diverses cibles explorées pour le développement d'un vaccin contraceptif	10
Figure 8 : Les cibles immuno-contraceptives	12
Figure 9 : Structure 3D de la protéine PH-20	14
Figure 10 : Structure modélisée de PH-20 humain	15
Figure 11 : Diagramme 2D de l'interaction Paritaprevir – PH-20	28
Figure 12 : Diagramme 2D de l'interaction Pazopanib– PH-20	30
Figure 13 : Diagramme 2D de l'interaction Erismodegib– PH-20	31
Figure 14 : Diagramme 2D de l'interaction Daclatasvir– PH-20	32

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les meilleurs scores ΔG révélés par le screening moléculaire par <i>PyRx</i>	25
Tableau 2 : Les meilleurs scores ΔG révélés par le criblage moléculaire par <i>Chimera</i>	26

Sommaire

REMERCIEMENTS

DEDICACE

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Sommaire

Introduction 1

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Fécondation

1. Gamètes 3

1.1. Ovocyte 3

1.2. Spermatozoïde 3

3. Maturation des spermatozoïdes 4

2. Mécanisme de la fécondation 4

4. Protéine PH-20 6

Chapitre II : Contraception non hormonale

1. Immuno-contraception 10

2. Vaccin de sperme 11

3. PH-20 dans l'immuno-contraception 12

Chapitre III : Docking moléculaire 13

Matériel et Méthodes

1. Récepteur	14
2. Ligands	15
3. Interaction ligand-récepteur	16
3.1. Préparation du récepteur	20
3.2. Préparation du ligand	21
4. Docking moléculaire	22

Résultats et Discussion

1. Screening moléculaire	25
2. Docking moléculaire	26
3- Type de liaisons engagées dans l'interaction Recepteur PH-20/ligands	27

Conclusion	33
-------------------	----

Références bibliographiques	34
------------------------------------	----

Introduction

Introduction

Bien qu'il existe de nombreuses méthodes de contraception telles que la stérilisation chirurgicale, les pilules contraceptives et les préservatifs, le taux d'avortement et de grossesses non désirées continue d'augmenter de façon spectaculaire (**Shibahara et al., 2020**).

De nouvelles méthodes contraceptives sont développées, dont l'immuno-contraception. Cette approche nouvelle consiste à administrer un vaccin pour rendre l'animal infertile temporairement (**Kirkpatrick et al., 2011**). L'immuno-contraception promet de nombreux avantages par rapport aux méthodes de contraception actuellement disponibles pour un usage humain, notamment une spécificité de cible élevée, une action à long terme mais non permanente, relativement peu coûteuse, ainsi que l'absence d'effets secondaires endocriniens ou métaboliques. Elle est facile à utiliser et ne nécessite pas l'insertion d'un implant ou dispositif et ne nécessite pas d'intervention chirurgicale (**Naz, 2011**).

Plusieurs cibles ont été évaluées pour la production de vaccin contraceptif (VC), notamment les antigènes de la zone pellucide et du sperme (**Joonè et al., 2017 ; Naz, 2017**). La stimulation du système immunitaire contre les spermatozoïdes et les antigènes de la zone pellucide induit une infertilité réversible chez les deux sexes, qui n'a pas d'effets secondaires (**Naz, 2005**).

Des anticorps anti-spermatozoïdes (AAS) peuvent entraîner un échec de la fécondation par plusieurs mécanismes, notamment la prévention de l'adhésion spermatozoïde-ovule, la pénétration des spermatozoïdes, la mobilité des spermatozoïdes, la capacitation des spermatozoïdes, la réaction acrosomique (**Chamley et Clarke, 2007**).

Certaines protéines des spermatozoïdes impliquées dans la fonction ou dans l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte pourraient donc être utilisées pour développer un VC, dont PH-20 qui est exprimée dans les testicules et l'épididyme et se trouve également dans le sperme et le liquide luminal de l'épididyme (**Li et al., 1997**).

La contraception non hormonale peut être plus attrayante pour les hommes car elle évite les implications négatives associées à l'utilisation de stéroïdes anabolisants et est plus facile à administrer par voie orale que les suppléments de stéroïdes, qui sont généralement administrés par injection (**Jacques et al., 2013**).

L'objectif de notre travail est d'envisager une contraception non hormonale en ciblant la protéine PH-20 afin d'empêcher le sperme de se fixer à l'ovule, inhibant ainsi la fécondation.

Par une approche *in silico*, nous avons tenté de repositionner des molécules connues et commercialisées pour cibler la protéine PH-20.

Synthèse
Bibliographique

Chapitre I

Fécondation

1. Gamètes

1.1. Ovocyte

L'ovocyte est une cellule reproductrice femelle, qui n'a pas terminé sa maturation nucléaire et qui reste entourée de ses enveloppes. Très différente du gamète mâle, c'est une grosse cellule qui ne contient plus aucune réserve dans son cytoplasme mais est très proche en structure des œufs comportant des réserves. L'ovocyte est entouré d'une couche de glycoprotéines, la zone pellucide (ZP), et de cellules granuleuses (des cellules folliculaires), qui constituent la corona radiata (Mihajlovic et al., 2018) (figure 1).

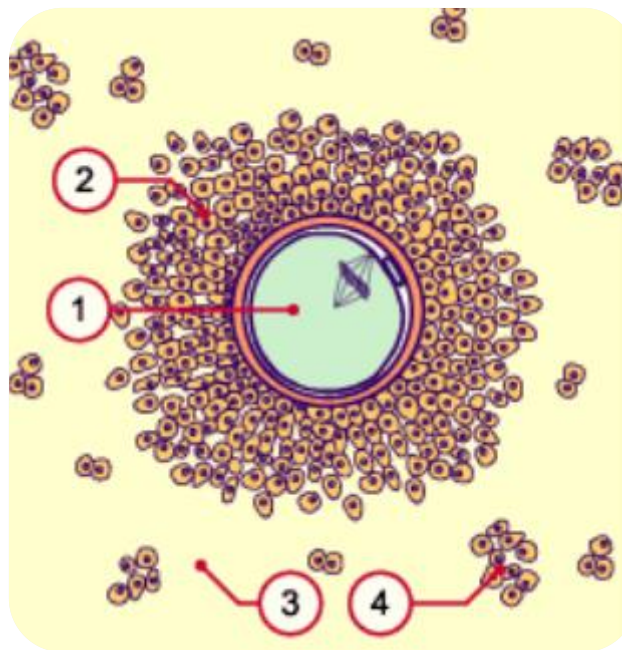


Figure 1: Schéma d'un ovocyte ovulé et du cumulus oophorus (Bessonnat, 2015)

(1) Ovocyte 2 bloqué en métaphase 2 (visualisation du fuseau mitotique) ; (2) Cellules du cumulus oophorus ; (3) Liquide folliculaire et matrice d'acide hyaluronique ; (4) Cellules du cumulus en amas isolés

1.2. Spermatozoïde

Le spermatozoïde est une cellule sexuelle mâle qui est produite dans les testicules de l'homme, au cours du processus de la spermatogénèse. Il se compose de trois parties : tête (contenant de l'ADN et des enzymes qui entrent dans l'œuf), partie médiane (extrêmement riche en mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire au mouvement) et un flagelle qui est l'organe moteur du sperme (Berbera et al., 2018) (figure 2).

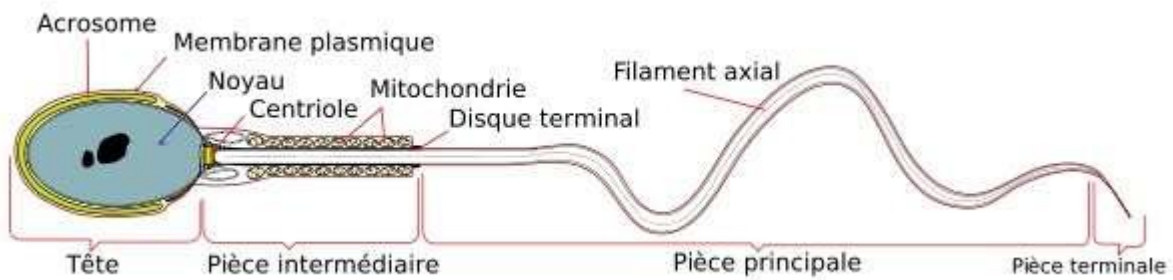


Figure 2: Représentation schématique du spermatozoïde (Bessonnat, 2015)

2. Mécanisme de la fécondation

La fécondation est le processus par lequel le noyau du gamète mâle haploïde, au génome extrêmement compacté, et l'ovocyte haploïde, dans lequel il pénètre, forment un zygote totipotent diploïde, capable de se développer en un individu viable (Coulombel, 2016). Dans l'espèce humaine, la rencontre des gamètes a lieu dans l'appareil génital féminin, au niveau de la jonction isthmo-ampullaire de la trompe de Fallope. Le spermatozoïde éjaculé acquiert sa capacité fécondante lors de sa traversée des voies génitales féminines, au cours de la capacitation. Cette maturation indispensable du spermatozoïde lui permet de traverser la couche des cellules folliculaires entourant l'ovocyte, de reconnaître et de se fixer à ZP (Lange et al., 2021).

3. Maturation des spermatozoïdes

Des millions de spermatozoïdes reviennent après l'éjaculation dans les organes génitaux féminins vers l'utérus. Mais seuls quelques-uns traversent les jonctions utéro-tubaires pour migrer vers l'ampoule de l'ovaire où se trouve l'ovocyte qui les attire par un chimioattractant émis par les cellules folliculaires qui l'entourent (Wassarman et al., 2001 ; Hanisha et al., 2019). Au cours de cette traversée, les spermatozoïdes subissent des modifications spécifiques pour acquérir une capacité fécondante. Cela exige trois étapes : la capacitation, l'hyperactivation et la réaction acrosomique (Kiipker et al., 1998).

a. Capacitation

La capacitation *in vivo* des spermatozoïdes est un processus régulé par l'environnement féminin, depuis leur remontée à travers la glaire cervicale jusqu'aux trompes, leur permettant d'arriver au contact de l'ovocyte et de le féconder au moment optimum. Ce processus nécessite une coordination complète entre le tractus génital féminin et les spermatozoïdes, garantissant ainsi à un nombre suffisant de spermatozoïdes la possibilité d'être aptes à féconder l'ovocyte (**Patrat et Serres, 2009**). La capacitation consiste entre autres à séparer les spermatozoïdes du plasma séminal et de modifier et réorganiser différentes molécules de leur membrane plasmique (**Jones, 1989**). Les principaux objectifs de la capacitation sont de rendre le spermatozoïde hyperactivé capable d'effectuer la réaction d'acrosome et capable de se lier à l'ovule (**Jones, 1989**).

b. Hyperactivation

Lorsque les spermatozoïdes se déplacent de l'utérus vers les trompes de Fallope, ils deviennent hyperactifs, nagent plus vite et pas droit. La suractivation permet le passage à travers la ZP. Bien que les mécanismes qui provoquent des modifications de la motilité des spermatozoïdes soient inconnus, les modifications de l'équilibre calcique par divers mécanismes se sont avérées d'une grande importance (**Castellano et al., 2003**).

c. Réaction acrosomique

La réaction acrosomique qui se produit après la capacitation des spermatozoïdes est un événement exocytotique induit par un afflux de Ca^{++} . Il joue un rôle essentiel lors de la fécondation, en rendant les spermatozoïdes capables de pénétrer dans la ZP et capables de fusionner avec la membrane plasmique de l'ovule. La zone pellucide est l'inducteur naturel de la réaction acrosomique. La liaison du récepteur du sperme à ZP3, une glycoprotéine de la zone agissant comme ligand, déclenche les événements moléculaires conduisant à l'exocytose acrosomique (**Croset, 1994**) (**figure3**).

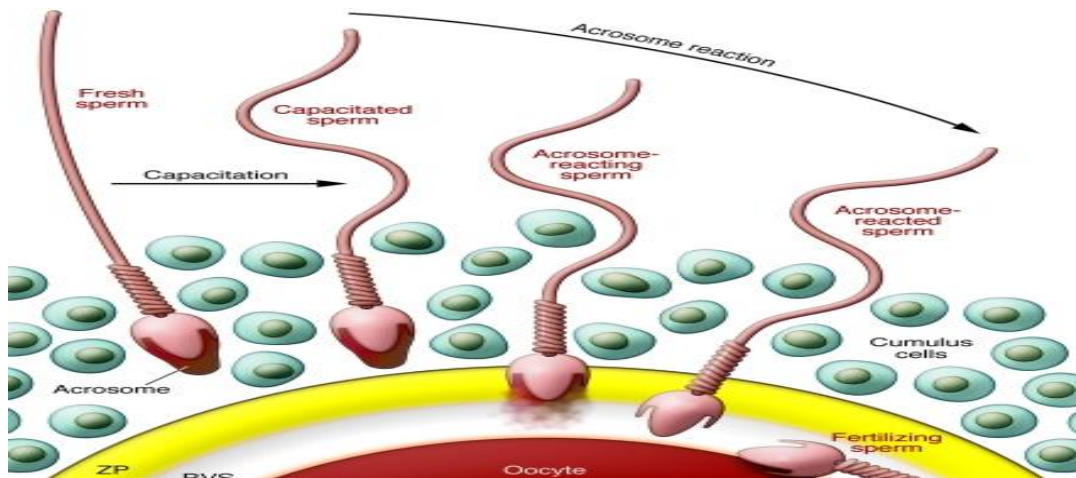


Figure 3: Mécanisme de l'interaction spermatozoïde-ovule (Ikawa et al.,2010)

La première barrière péri-ovocytaire que rencontre le spermatozoïde est l'ensemble des cellules folliculeuses (cumulus) ; la hyaluronidase contenue dans l'acrosome devrait en théorie favoriser la progression des spermatozoïdes à ce niveau mais ceci implique une réaction acrosomique précoce qui modifie les caractéristiques antigéniques du spermatozoïde et entraîne la fixation du gamète au cumulus. En fait, seuls les spermatozoïdes capités à acrosome intact traversent le cumulus sans y adhérer et la présence du cumulus ne semble pas un impératif pour la fécondation de l'ovocyte dans l'espèce humaine (**Plachot, 1988 ; Crozet, 1991**).

Après avoir traversé le cumulus, le spermatozoïde entre en contact avec la ZP. On sait depuis longtemps que pour traverser cette enveloppe le spermatozoïde doit avoir effectué sa réaction acrosomique. Le lieu où elle se produit a fait l'objet d'affirmations contradictoires et de nombreuses controverses. Cela provient en partie du fait que la réaction acrosomique peut se produire spontanément en l'absence d'ovocyte et qu'on peut la provoquer *in vitro*. Plusieurs études ont permis d'aboutir à la conclusion que chez les mammifères la réaction acrosomique du spermatozoïde fécondant se produit au contact de la zone pellucide (**Saling et Storey, 1979 ; Crozet et Dumont, 1984**).

4. Protéine PH-20

Les spermatozoïdes de mammifères possèdent une hyaluronidase ancrée à la glycosylphosphatidylinositol (GPI), connue sous le nom de PH-20 et de Sperm Adhesion Molecule 1 (SPAM 1). La PH-20 est située à la surface des spermatozoïdes et dans l'acrosome dérivé du lysosome, où elle est liée à la membrane acrosomique interne (**Cherr et al.,2001**).

Les hyaluronidases ont été découvertes pour la première fois dans les testicules (**Aronson et Davidson, 1965**). Les hyaluronidases humaines ont été étudiées et certaines d'entre elles sont bien caractérisées à partir de différents tissus (**Frost et al., 1996 ; Stern, 2003**). Il existe six séquences de type hyaluronidase dans le génome humain (**Csoka et al., 1999**). Ces gènes de hyaluronidase sont également connus sous le nom de gènes de glucosaminidase hyaluronique (HYAL). Six gènes paralogues de HYAL partagent environ 40 % d'identité les uns avec les autres. En revanche, chaque expression génique a une distribution tissulaire unique. Ces gènes sont situés dans un groupe de 3-2 sites chromosomiques sur les chromosomes 3p21.3 (HYAL1, HYAL2, HYAL3) et 7q31.3 (HYAL4, PH20/SPAM1, HYALP1). HYALP1 est un pseudogène humain. Hyal-1 et Hyal-2 sont les hyaluronidases les plus couramment exprimées dans les tissus du corps humain (**Csoka et al., 2001**) (**figure 4**).

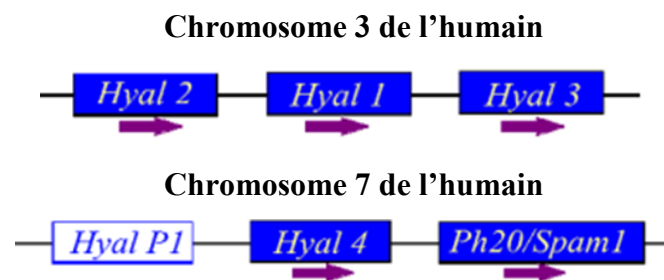


Figure 4 : Orientation chromosomique des gènes de la hyaluronidase (Csoka et al., 2001)

Les hyaluronidases catalysent l'hydrolyse des liaisons β (1,4) entre les unités disaccharides de l'acide hyaluronique (**Fronza et al., 2016 ; Khan et al., 2018**).

PH-20 est unique parmi les hyaluronidases en ce qu'elle a une activité enzymatique à la fois à pH acide et neutre, et ces activités semblent impliquer deux domaines différents dans la protéine (**Gmachl et kreil,1993 ; Cherr et al., 2001 ; Oettl et al., 2003**). L'activité enzymatique neutre de la membrane plasmique PH-20 est responsable de la dégradation locale du cumulus ECM (matrice extra cellulaire) lors de la pénétration des spermatozoïdes. La membrane plasmique PH-20 médie la signalisation des spermatozoïdes induite par HA via un domaine de liaison HA qui est séparé des domaines hyaluronidases. Cette signalisation est associée à une augmentation du calcium intracellulaire et par conséquent, la réactivité des spermatozoïdes à l'induction de la réaction acrosomique par la zone pellucide est augmentée.

Il existe de nombreuses preuves que les protéines ancrées au GPI sont impliquées dans la transduction du signal initiée par un groupe diversifié de récepteurs de surface cellulaire. Les protéines ancrées au GPI impliquées dans la signalisation sont souvent associées à des protéines de signalisation liées au feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique, généralement la famille Src, des protéines tyrosine kinases non réceptrices. PH-20 semble initier la signalisation intracellulaire en s'agrégant dans la membrane plasmique, et une protéine de 92 kDa peut être la molécule de signalisation cellulaire liée à PH-20 (**Cherr et al., 2001**). La hyaluronidase testiculaire PH-20 était initialement supposée être spécifique au tissu, avec une expression limitée aux testicules. Par la technique PCR, la PH-20 a été détectée dans l'épididyme, le sein dans l'appareil reproducteur féminin, ainsi qu'en association avec un certain nombre de tumeurs malignes. La présence de PH-20 dans l'appareil reproducteur féminin et le sein témoigne de la multifonctionnalité de l'enzyme, et peut-être de toutes les enzymes de la famille Hyal (**Deng et al., 2000**).

La PH-20 humaine, nécessaire à la fécondation, facilite la pénétration des spermatozoïdes à travers la masse du cumulus jusqu'à l'ovule. Il a d'abord été détectée dans des extraits testiculaires, et est l'identité du « facteur de propagation » (**Duran et Reynals, 1928**). La protéine PH-20, codée par le gène SPAM1 qui réside dans le cluster reproducteur sur le chromosome 7q31 humain est la protéine de membrane de sperme de mammifère la plus largement conservée (**Lathrop et al., 1990**). La structure moléculaire de la PH 20 a été élucidée : de 68 kDa appartenant à la famille des glycosyl hydrolases 56. Cette famille d'enzymes a une activité hyaluronidase qui hydrolyse la liaison glycosidique entre deux glucides ou plus, ou entre un glucide et un fragment non glucidique. La hyaluronidase du sperme est active à des pH neutres et acides qui résultent de différents sites actifs dans le domaine hyaluronidase à l'extrémité N-terminale de la protéine. Le domaine hyaluronidase contient également un site de liaison à l'acide hyaluronique (HA) qui joue un rôle dans la voie de signalisation conduisant à l'exocytose acrosomique. La protéine contient également un domaine de liaison zona à l'extrémité C-terminale (**Sade et Banerjee ,2010**) PH-20 semble être une protéine multifonctionnelle ; c'est une hyaluronidase, un récepteur pour la signalisation cellulaire induite par HA et un récepteur pour la zone pellucide entourant l'ovocyte. La fonction de reconnaissance de la zone pellucide de PH-20 a été découverte en premier. Cette fonction est attribuée à la membrane acrosomique interne PH-20, qui semble différer biochimiquement du PH-20 à la surface du sperme (**Cherr et al., 2001**) (**figure 5**)

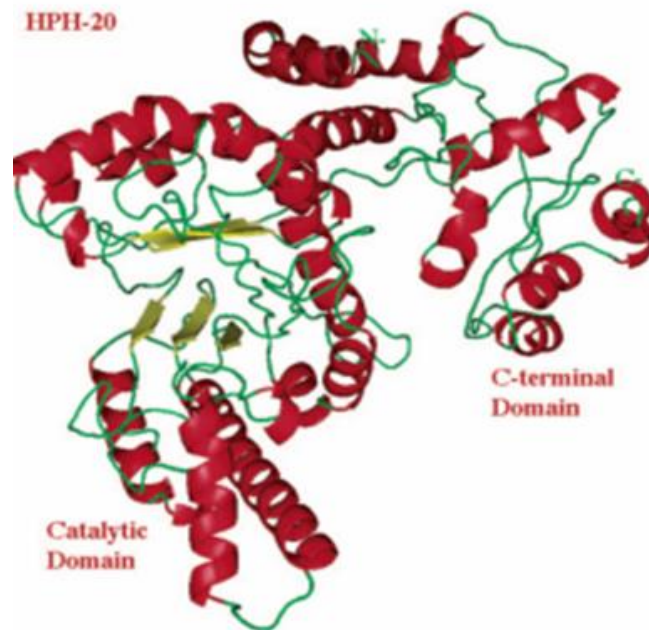


Figure 5 : Modèle structurel de la hyaluronidase PH-20 humaine (Jedrzejak et Stern., 2005)

Bien que PH-20 soit présente sur la membrane plasmique des spermatozoïdes intacts de l'acrosome, elle n'est pas nécessaire dans la liaison primaire de ces spermatozoïdes à la zone pellucide (Myles et al., 1987). L'activité hyaluronidase de la membrane plasmique PH-20 est nécessaire pour que les spermatozoïdes intacts de l'acrosome pénètrent dans la couche de cellules du cumulus (Lin et al., 1994). La découverte que PH-20 a nécessité des activités à deux étapes du processus de fécondation suggère que PH-20 pourrait être bifonctionnel. D'autre part, il est possible que la fonction requise de PH-20 dans la liaison secondaire puisse dépendre de la liaison répétitive et de l'hydrolyse par son domaine hyaluronidase de HA présent dans la zone pellucide (Hunnicutt et al., 1996) (figure 6)

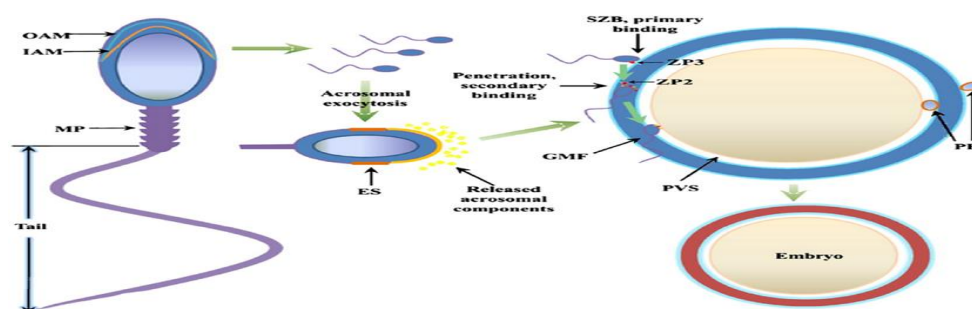


Figure 6 : Interaction spermatozoïde-ovule (Yang, 2013)

Chapitre II
Contraception
non hormonale

1. Immuno-contraception

L'avènement de l'immuno-contraception représente la première approche véritablement nouvelle du développement des méthodes de planification familiale. Il s'agit d'un moyen qui n'administre pas d'hormones ou de composés qui bloquent la sécrétion d'hormones (**Jacques et al., 2013**).

Elle implique l'administration d'un vaccin qui induit une réponse immunitaire adaptative qui rend un animal temporairement infertile (**Kirkpatrick et al., 2011**).

Le développement de l'immuno-contraception s'articule autour du criblage de la production de gamètes [hormone de libération des gonadotrophines (GnRH), hormone folliculo-stimulante (FSH) et hormone lutéinisante (LH)], la fonction des gamètes (protéines de la ZP des ovocytes et des antigènes du sperme) et le résultat des gamètes gonadotrophine chorionique humaine [hCG] (**Naz, 2011**) (**figure 7**).

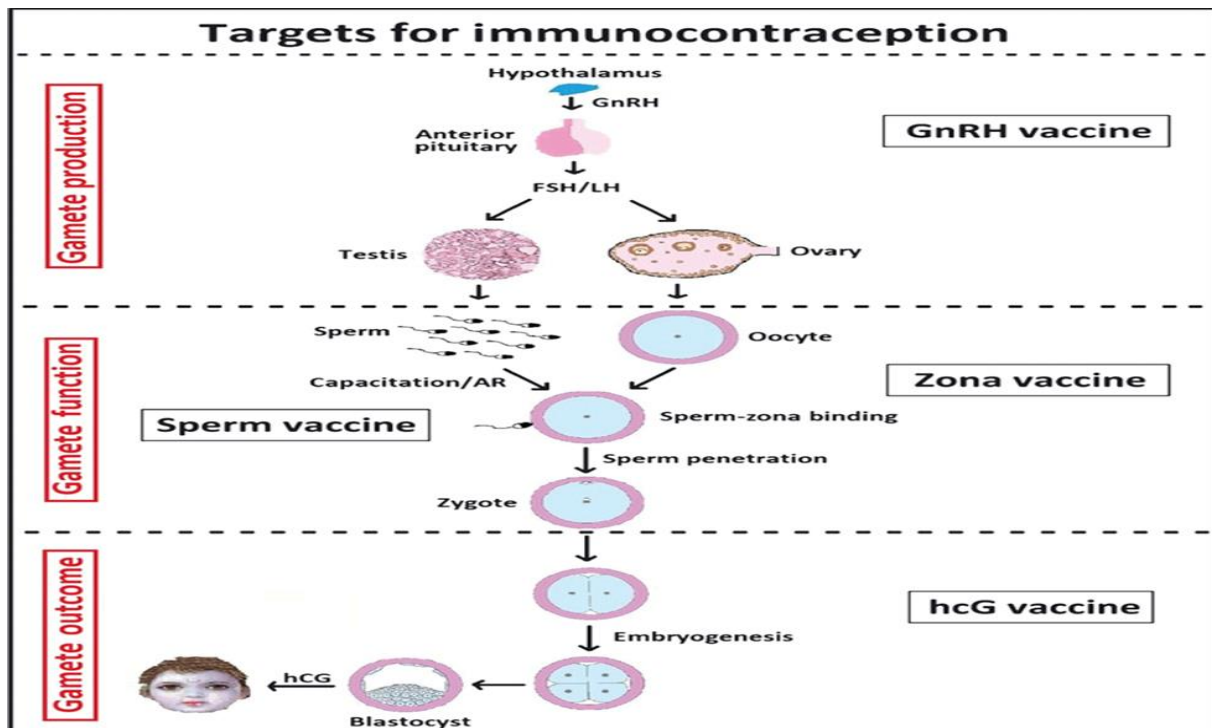


Figure 7 : Modèle schématique indiquant diverses cibles explorées pour le développement d'un vaccin contraceptif (Naz, 2011)

2. Vaccin de sperme

Les protéines, glycoprotéines et lipoprotéines de la membrane du spermatozoïde, différenciées lors de la spermatogenèse, diffèrent en tant qu'antigènes de ceux des cellules somatiques d'individu puisqu'ils correspondent à l'expression d'un génome haploïde. Normalement les spermatozoïdes n'entrent pas en contact avec les cellules du système immunitaire et leurs antigènes sont parfaitement tolérés. Il peut cependant se produire une défaillance des systèmes de protection suivie de la production d'AAS (**De Almeida, 1989**).

Dans l'espèce humaine, une immunisation dirigée contre des antigènes spermatiques peut être un facteur d'infertilité qu'elle soit présente chez l'homme (auto-immunité) ou chez la femme (iso-immunité). La plupart des études faites sur cette immunité se sont limitées à la recherche des anticorps circulants dirigés contre des spermatozoïdes. La fréquence de ces anticorps est très variable selon les séries des sujets infertiles étudiés : 3 à 15 % chez l'homme et 3 à 22 % parmi les femmes. Chez l'homme, des taux élevés d'anticorps sériques sont toujours associés à la présence d'anticorps fixés sur les spermatozoïdes éjaculés mais dans quelques cas, assez rares, l'immunité n'est décelée que dans l'éjaculat. Chez la femme, la corrélation entre les anticorps sériques et les anticorps détectés dans le mucus cervical est faible. Ainsi des titres élevés d'anticorps peuvent être détectés dans le sérum sans contrepartie dans les sécrétions cervicales et vice-versa. Par contre, il y a une bonne corrélation entre le taux des anticorps circulants et leur présence dans les liquides folliculaires (**De Almeida, 1991 et 1993**).

C'est pourquoi, parmi toutes les cibles potentielles, les spermatozoïdes ont reçu le plus d'attention. Le spermatozoïde entier en lui-même ne peut pas être utilisé pour le développement d'un vaccin en raison de la présence de plusieurs antigènes susceptibles d'être partagés avec diverses cellules somatiques (**Naz, 1999**). Seuls les antigènes spécifiques au sperme peuvent être utilisés pour un VC. L'application d'un antigène de sperme dans un VC dépend de sa spécificité de sperme, de son expression de surface, de son implication dans la fertilité et de sa capacité à produire suffisamment d'anticorps pour être capable d'intercepter la fertilité. Les AAS affectent l'adiposité fébrile et la fertilité à la fois *in vitro* et *in vivo*. La présence d'AAS dans le milieu de fécondation *in vitro* entrave la fécondation par plusieurs mécanismes, tels que l'inhibition de la condensation des spermatogonies, l'interaction acrosome et l'interaction spermatozoïdes-région. L'insémination délibérée d'animaux de diverses espèces, y compris les humains (femmes et hommes), avec du sperme ou des extraits de celui-ci provoque le développement d'AAS, conduisant à l'infertilité (**Naz, 2005**).

Si un antigène est également impliqué dans l'immuno-infertilité humaine, c'est un candidat particulièrement intéressant.

Le site de liaison spermatozoïde-ZP constitue la cible la plus attractive pour l'immuno-contraception (Naz, 2005) (figure 8).

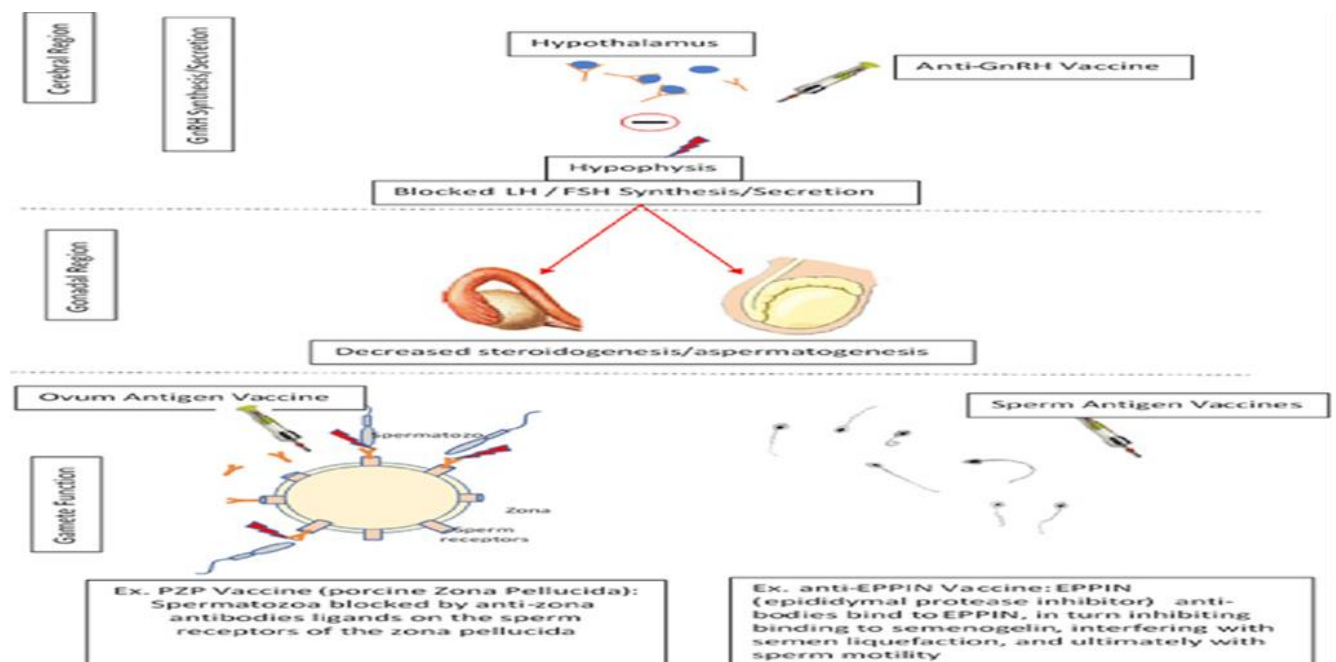


Figure 8 : Les cibles immuno-contraceptives (Liu et al., 2005)

3. PH-20 dans l'immuno-contraception

L'incubation *in vitro* de spermatozoïdes avec des anticorps générés contre PH-20 a entraîné une réduction de la liaison spermatozoïde-ZP. L'immunisation de cobayes mâles ou femelles avec PH-20 purifiée provenant de cobayes a induit 100 % d'infertilité (Primakoff et al., 1997). L'infertilité était associée à une perte de sperme normal dans l'épididyme et à des troubles auto-immuns chez les hommes immunisés (Tung et al., 1997). Chez les femelles, la prévention de la liaison spermatozoïde-ovule par les anticorps a entraîné l'infertilité. Cependant, l'infertilité induite par la vaccination s'est avérée réversible dans les deux cas, la fertilité étant retrouvée dans les 6 à 15 mois (Kaur et Prabha, 2014).

Bien que les résultats aient été assez encourageants, mais pour produire un VC efficace, il est nécessaire de générer des protéines en quantité suffisante. Cette lacune a été comblée par l'utilisation d'antigènes recombinants. L'ADNc codant pour l'antigène PH-20 a été cloné et séquencé. Cependant, l'immunisation de lapins mâles et femelles réalisée à l'aide de PH-20 recombinant (rSPAM-1) n'a entraîné d'infertilité chez aucun des animaux immunisés. Ces différences entre la forme native et la forme recombinante peuvent être dues au manque de quantités suffisantes d'anticorps anti-rSPAM1 qui étaient nécessaires pour bloquer la conception (Holland et al., 1997 ; Pomeroy et al., 2002).

Chapitre III
Docking
moléculaire

Le docking moléculaire ou amarrage moléculaire est une méthode *in silico* basée sur la structure, largement utilisée dans la découverte de médicaments. Il permet d'identifier de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique, de prédire les interactions ligand-cible au niveau moléculaire ou de définir les relations structure-activité, sans connaître à priori la structure chimique d'autres modulateurs de cibles. Il a été initialement utilisé pour aider à comprendre les mécanismes de reconnaissance moléculaire entre petites et grandes molécules (**Kitchen et al., 2004**).

Les approches *in silico*, permettent aujourd'hui le criblage virtuel de millions de composés dans un délai abordable, ce qui réduit les coûts initiaux de l'identification des résultats et améliore les chances de trouver le médicament souhaité (**Pinzi et Rastelli, 2019**). Dans ce contexte, le docking moléculaire est utilisé pour faciliter différentes tâches des programmes de découverte de médicaments, l'identification et l'optimisation de cibles, le repositionnement de médicaments et la conception. A l'heure où des centaines d'essais cliniques ont été lancés dans le monde dans le but de trouver rapidement une solution thérapeutique contre certaines maladies, les médecins et chercheurs ont priorisé le repositionnement de molécules déjà approuvées en utilisant le docking moléculaire pour traiter ces maladies (**Shoichet et al., 2002 ; Kinnings et al., 2009 ; Lee et al., 2016**).

Matériels
et
Méthodes

1. Récepteur

Selon **Pang et al. (2022)** la protéine PH-20 humaine code pour un polypeptide de 511 acides aminés, le poids moléculaire et la valeur de pI de PH-20 ont été estimés à 58,4 kDa et 7,0, respectivement. Les acides aminés conservés dans les domaines structuraux de PH-20 associés à la catalyse et à la glycosylation du substrat ont été déduits par l'outil de blastage de protéines en ligne du NCBI : le site actif Asp 146 et Glu 148, et le site de glycosylation Asn 82, Asn 166, Asn 235, Asn 254, Asn 368 et Asn 393 (**Pang et al., 2022**).

Premièrement nous avons recherché la protéine PH-20 humaine dans la banque de données *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>). C'est la principale ressource mondiale de séquences protéiques et d'informations fonctionnelles de haute qualité, complète et librement accessible. La protéine PH-20 humaine (polypeptide de 509 acides aminés), y est répertoriée sous le code **P38567** (**figure 9**).

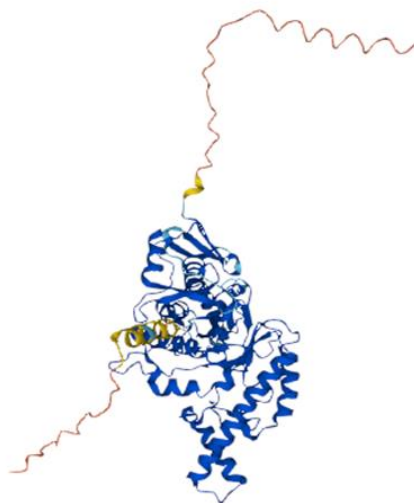


Figure 9 : Structure 3D de la protéine PH-20

Après on passe sur *Robetta* (<https://rosetta.bakerlab.org/>) un service de prédiction de la structure des protéines qui est continuellement évalué par CAMEO (Continuous Automated Model Evaluation), afin de modéliser la structure de PH-20 (**figure 10**)



Figure 10 : Structure modélisée de PH-20 humaine

2. Ligands

Nous avons recherché dans la base de données *Zinc* (<https://zinc.docking.org>), les molécules approuvées par la FDA (Administration of Food and Drug) et susceptibles d'interagir avec la protéine PH-20.

Zinc est un outil de recherche pour la découverte de ligands, qui relie les activités biologiques par produit génique, médicaments et produits naturels avec la disponibilité commerciale (Sterling et Irwin, 2015).

Pour télécharger les molécules FDA, nous suivons les étapes suivantes :

- Cliquer sur Substances pour rechercher les sous-ensembles.
- Cliquer sur Sous-ensembles pour rechercher les médicaments approuvés par la FDA, dans la Drug Bank.

- Télécharger les structures des ligands sous forme **SDF**

The screenshot shows the ZINC database entry for ZINC1481956 (Paliperidone). The page includes a header with navigation links, a breadcrumb trail, and the compound name. Below the name, there are links to external resources and a table with columns: Added, Availability, Since, Melt, logP, and Download. The Download button is circled in red and labeled '1'. A dropdown menu is open, showing options: SMILES, SDF (circled in red and labeled '2'), CSV, XML, and JSON. Below the dropdown, there are fields for SMILES, InChI, and InChI Key. At the bottom, there is a table for 'Available 3D Representations' with columns: pH range, Net charge, H-bond donors, H-bond acceptors, TPSA, Rotatable bonds, Apolar desolvation, Polar desolvation, and Download.

3. Interaction ligand-récepteur

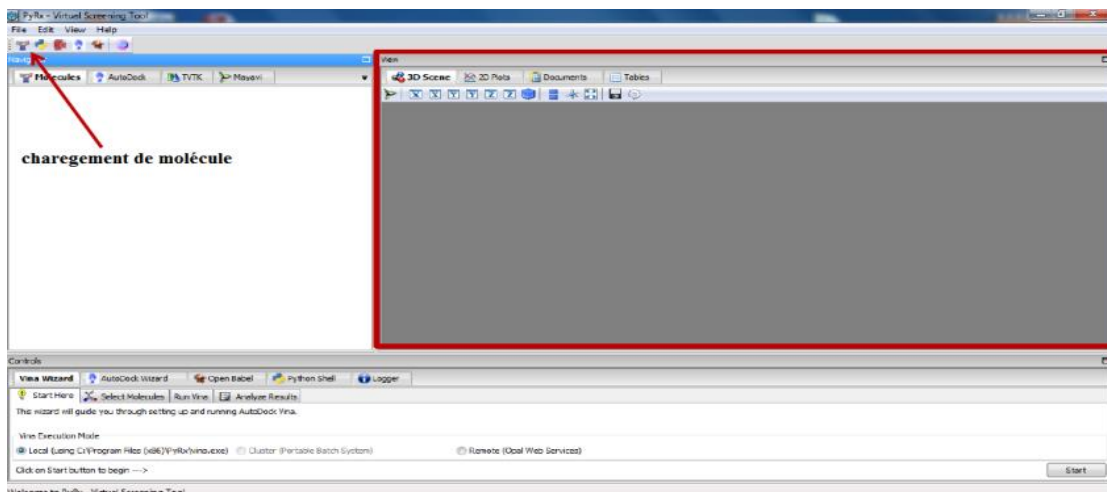
Nous avons utilisé les logiciels *PyRx* et *Chimera* pour tester l'interaction ligand-récepteur.

* **PyRx** : est un logiciel open source doté d'une interface utilisateur intuitive qui s'exécute sur tous les principaux systèmes d'exploitation (Linux, Windows et Mac OS) (**Dallakyan et Olson, 2015**). Le docking moléculaire sur *PyRx* se déroule selon les étapes suivantes :

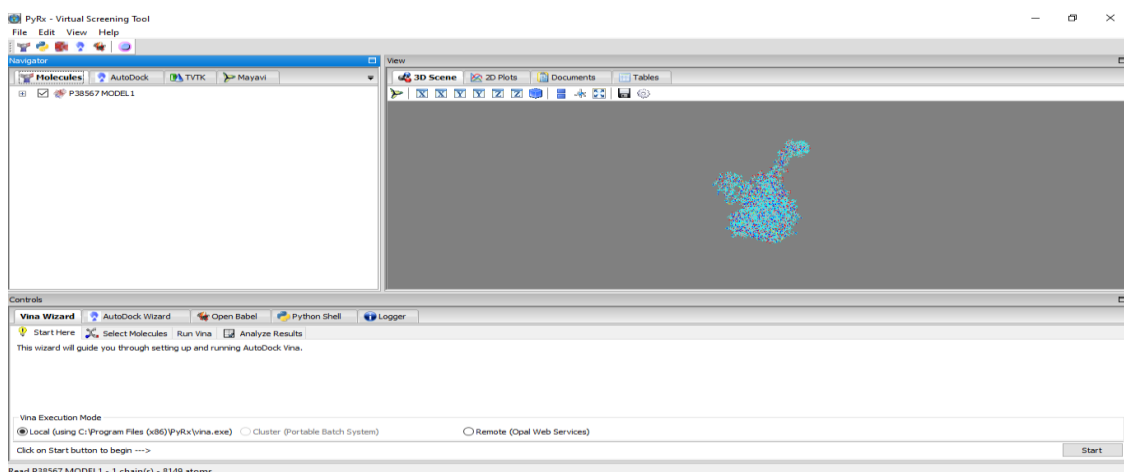
- Télécharger *PyRx* : (<http://pyrx.sourceforge.net/downloads>)



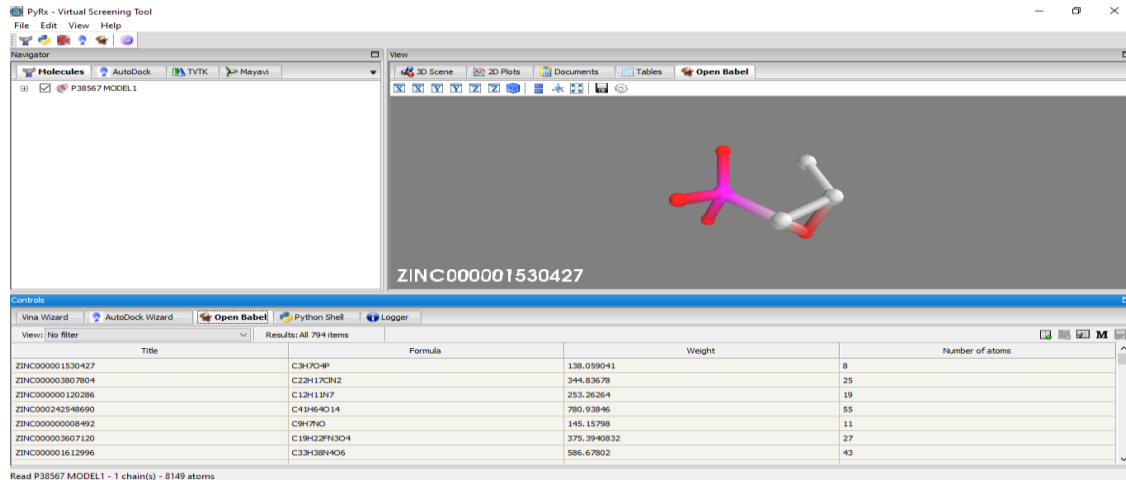
- Charger les molécules dans l'espace de travail *PyRx*.



- Cliquer sur File puis sur Load Molécule et sélectionner le fichier **P38567** (Model 1)



- Cliquer sur Open Babel/insert new item/ sélectionner la base de données FDA

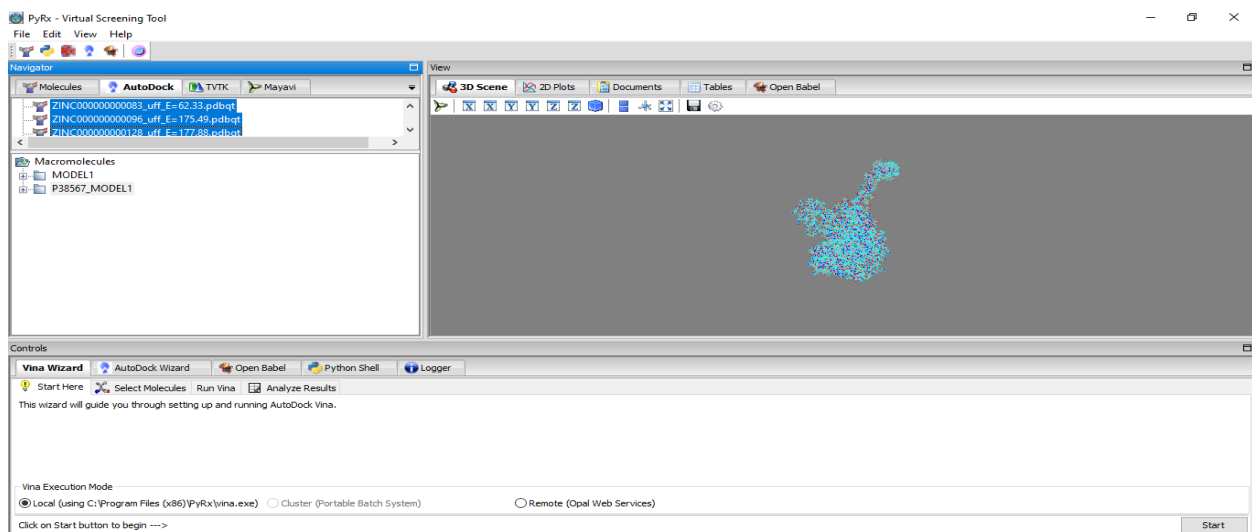


- Cliquer droit sur le ligand et sélectionner Minimize All.

- Cliquer Vina Wizard puis sélectionner Local /start /Add Macromolecule puis sélectionner **P38567**.

- Cliquer sur Open Babel puis cliquer droit sur les ligands et sélectionner Convert All to AutoDock Ligand (pdbqt).

- Cliquer sur le premier ligand et sur shift puis sur le dernier ligand pour sélectionner tous les ligands/puis sur start en fin sur forward.

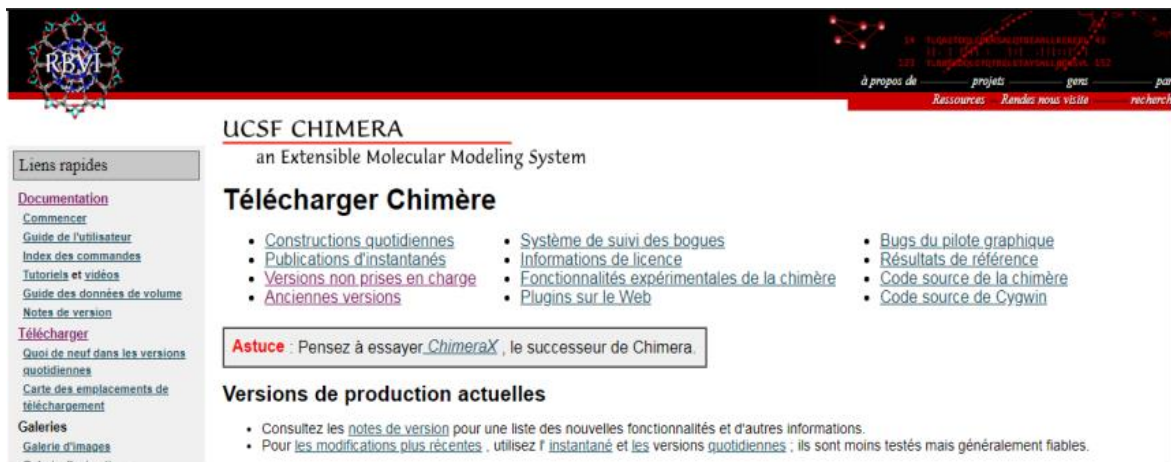


- Ensuite, on transforme le fichier de minimisation pdb en pdb.qt pour entrer dans un autre programme qui s'appelle *Chimera*.

* **Chimera** : est segmenté en un noyau qui fournit des services et une visualisation de base, et des extensions qui fournissent des fonctionnalités de niveau supérieur (**Pettersen et al., 2004**).

Le processus de docking avec *Chimera* se déroule selon les étapes suivantes :

- Télécharger *UCSF Chimera* : <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>



UCSF CHIMERA
an Extensible Molecular Modeling System

Télécharger Chimère

- Constructions quotidiennes
- Publications d'instantanés
- Versions non prises en charge
- Anciennes versions
- Système de suivi des bogues
- Informations de licence
- Fonctionnalités expérimentales de la chimère
- Plug-ins sur le Web
- Bugs du pilote graphique
- Résultats de référence
- Code source de la chimère
- Code source de Cygwin

Astuce : Pensez à essayer *ChimeraX*, le successeur de Chimera.

Versions de production actuelles

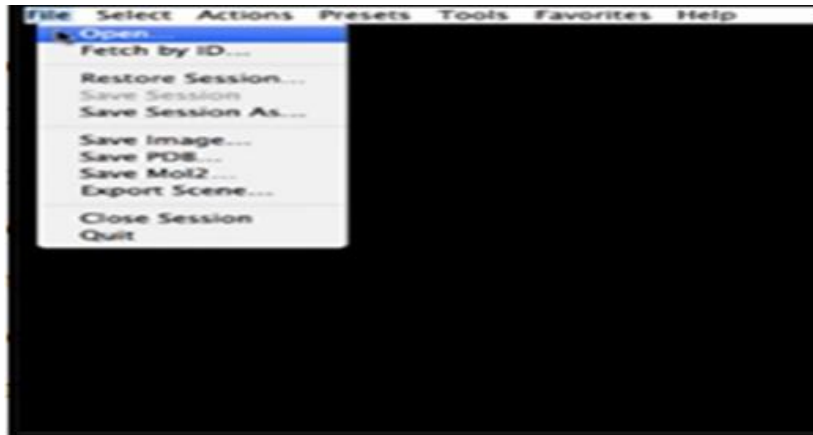
- Consultez les [notes de version](#) pour une liste des nouvelles fonctionnalités et d'autres informations.
- Pour les [modifications plus récentes](#), utilisez l' [instantané](#) et les [versions quotidiennes](#) ; ils sont moins testés mais généralement fiables.

Préparer les stimulations de docking : ouvrir avec *UCSF Chimera* les structures pdb de notre récepteur (**P38567**) puis notre ligand. Ces structures proviennent des structures cristallographiques.

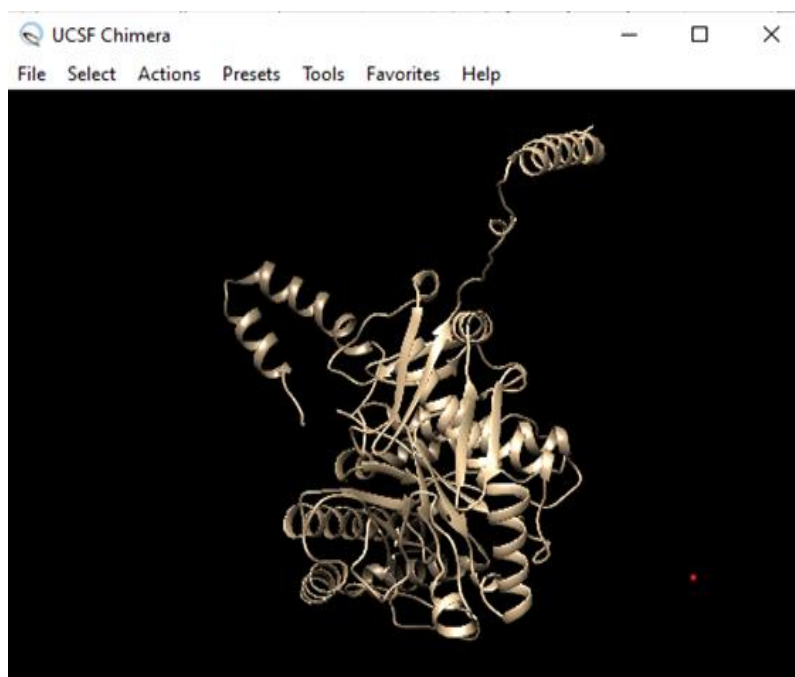


3.1. Préparation du récepteur

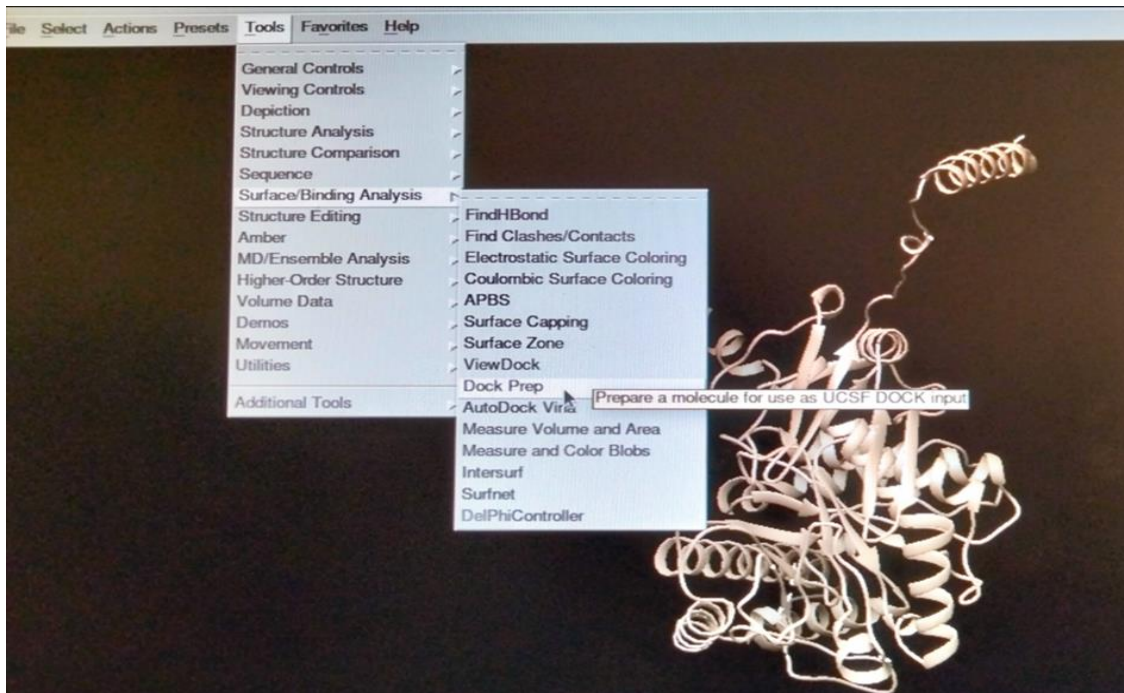
- Cliquer sur File puis Open pour ouvrir le fichier **P38567**.



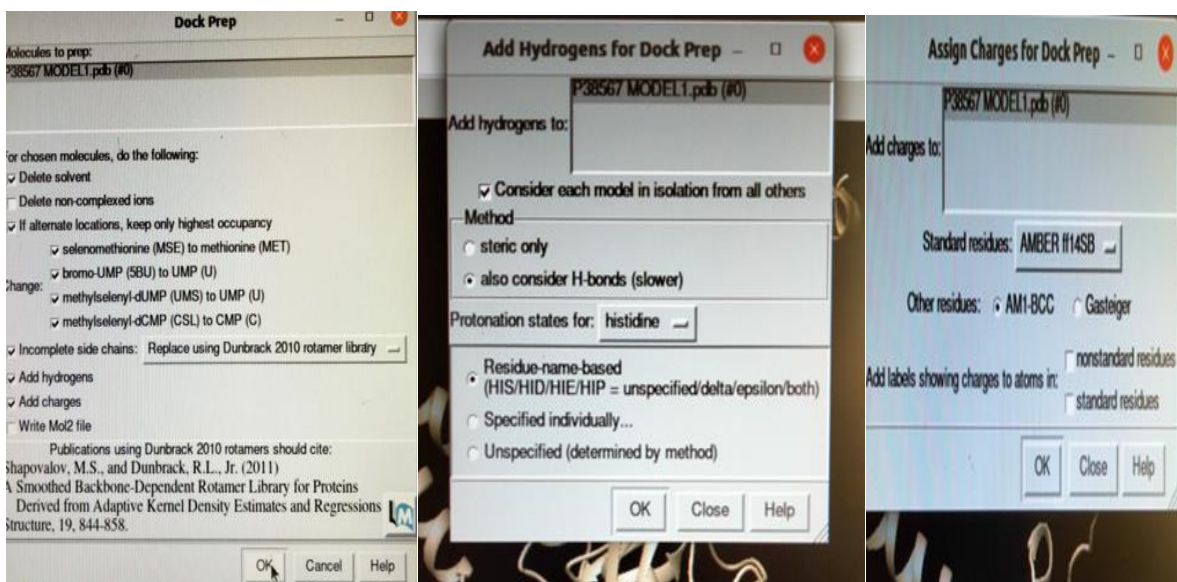
- Entrer le récepteur



- Cliquer sur Tools>surface –binding Analysis >Dock preb pour Optimiser le récepteur pour l'amarage



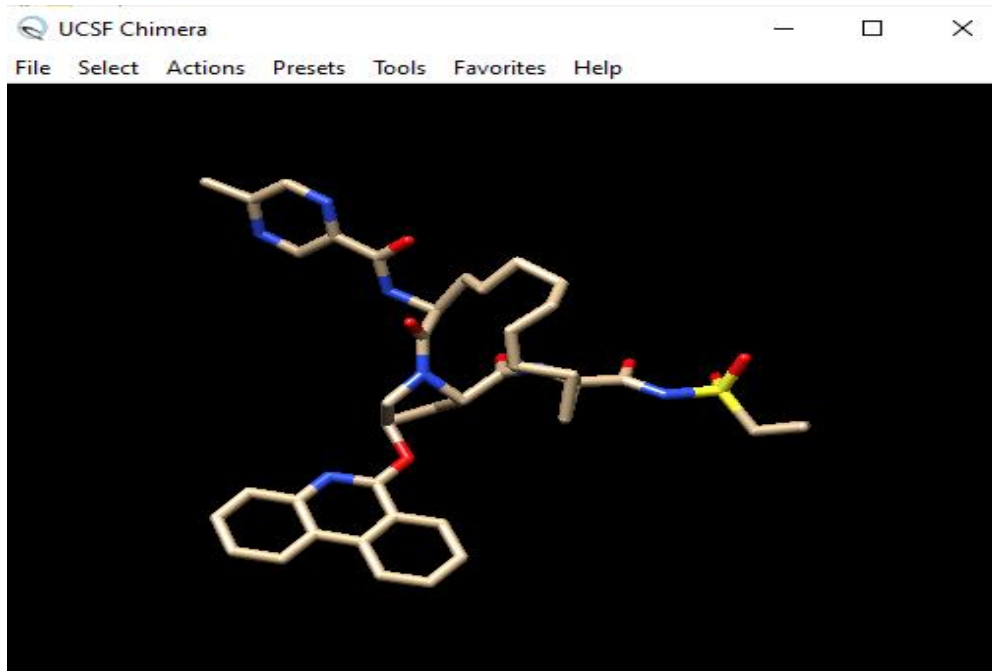
- Dans Dock prep sélectionner toute les options sauf « Delte non-complexed » et « Write Mol2 file » / cliquer sur OK/OK/OK.



3.2. Préparation du ligand

Le processus de préparation du ligand est similaire au processus d'obtention du récepteur

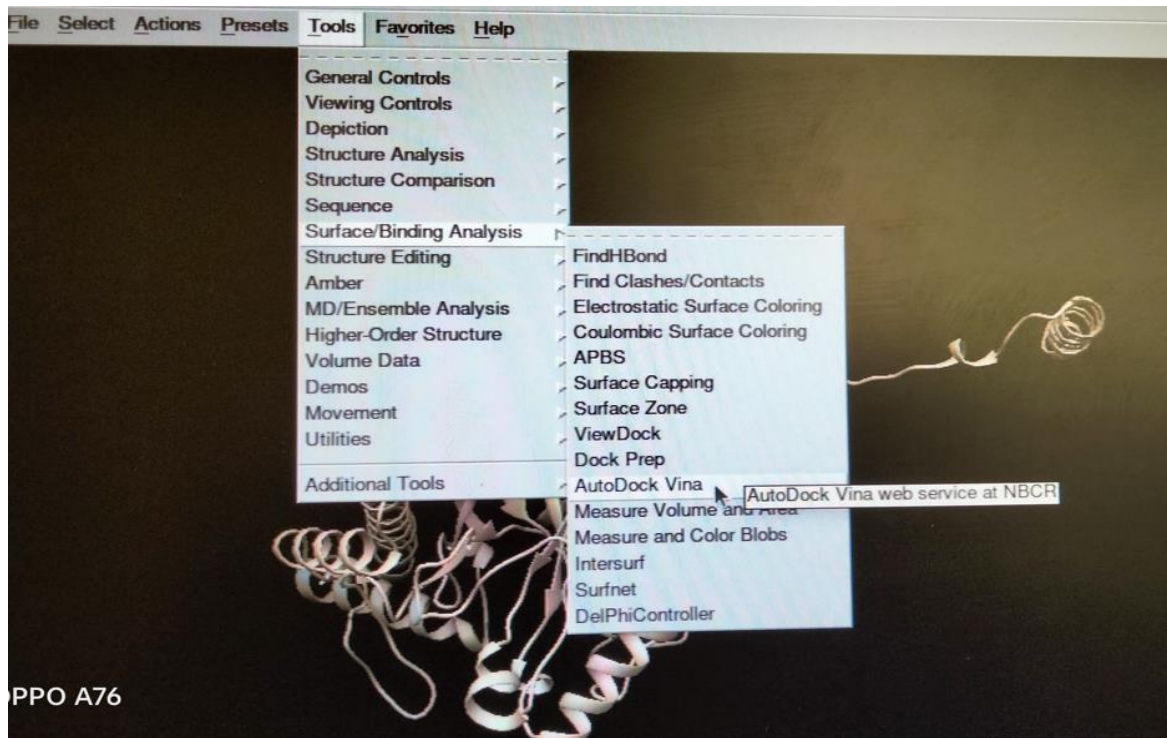
- Cliquer sur File puis Open/. On commence par ouvrir le premier ligand.



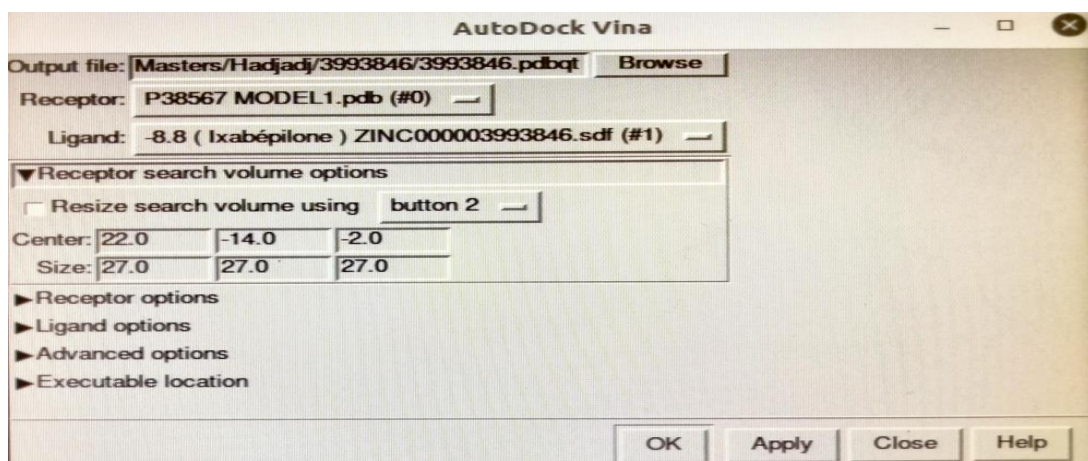
4. Docking moléculaire

Pour réaliser le docking, nous préparons les paramètres de simulation.

- Cliquer sur Tools/Surface/Binding Analysis/ AutoDock Vina.

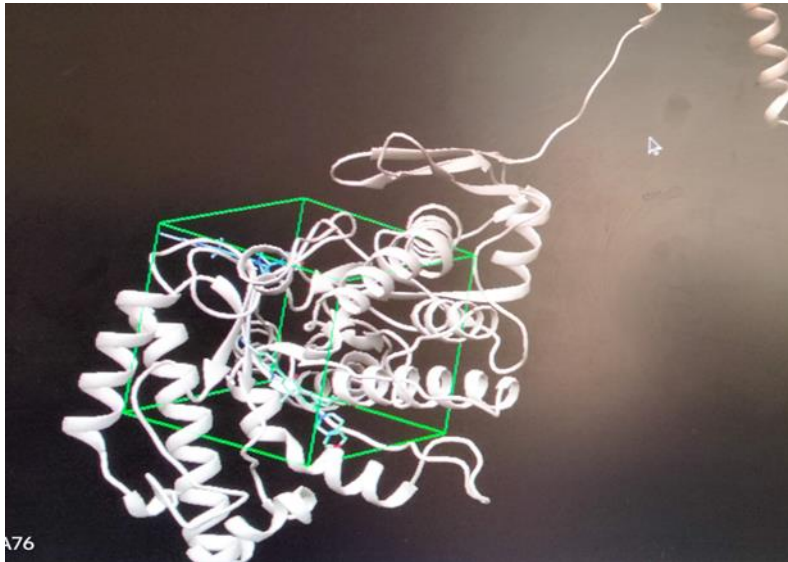


- Dans AutoDock Vina cliquer sur Browse après nomer votre complexe/ sélectionner le récepteur et le ligand / cliquer sur bouton 1
- Définir l'espace de recherche (taille et position de centre de grille)
- Cliquer sur l'écran par la souris clic droit pour mettre le complexe sur une boîte.



Pour contrôler les mouvements de la boîte de docking, nous cochons sur Resize

- Ensuite cliquer >Brows >numéro de ligand> ok >File name> le même numéro > Set Out pot > location> Apply> Ruming.



L'amarrage moléculaire a maintenant commencé et une fois l'analyse terminée, l'interface « ViewDock » est ouverte.

- Pour obtenir le tableau de scores de ΔG , cliquer sur Tools>surface –binding Analysis > ViewDock> entrer fichier pdb. qt.

- Enfin, pour enregistrer les fichiers obtenus, cliquer sur file> save pdb> cocher ligand insérer le code de ligand dans file name (3.1) en cliquant sur shift / ctrl, et pour le récepteur, cliquer sur file >save sension entrer le code de ligand dans file name meilleur, donc les résultats de docking sont enregistré dans un fichier pdb.

* On recommence les mêmes étapes pour les autres ligands.

Résultats
et
Discussion

1. Screening moléculaire

Le screening moléculaire a permis de ressortir 1617 molécules susceptibles de cibler la protéine PH-20. Nous n'en avons retenu que 11 sur la base des scores ΔG , qui reflètent l'affinité de liaison entre le récepteur et le ligand et qui sont donnés dans le **tableau 1**.

Tableau 1. Les meilleurs scores ΔG révélés par le screening moléculaire par PyRx

Code Zinc	Ligands	ΔG (Kcal/ml)
150338819	Lédipasvir	-9.3
164760874	Olysio	-9.2
203757351	Paritaprevir	-9.2
66166864	Alectinib	-9.0
100016058	Tripranavir	-8.9
3993846	Ixbépilone	-8.8
11617039	Pazopanib	-8.7
100003902	Mraviroc	-8.7
68204830	Daclatasvir	-8.7
84668739	Lifitegrast	-8.6
68202099	Erismodegib	-8.6

2. Docking moléculaire

Le criblage moléculaire étant une recherche rapide de ligands pour notre récepteur parmi des milliers de molécules, nous procédons à un docking moléculaire par *Chimera* sur les ligands qui ont montré les meilleurs scores afin de confirmer leur affinité de liaison pour le récepteur PH-20 (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Les meilleurs scores ΔG révélés par le criblage moléculaire par *Chimera*

Code Zinc	Ligands	ΔG (Kcal/ml)
203757351	Paritaprevir	-9.2
11617039	Pazopanib	-8.1
68202099	Erismodegib	-7.9
68204830	Daclatasvir	-7.6
66166864	Alectinib	-6.6
84668739	Lifitegrast	-5.9
100016058	Tipranavir	-5.7
164760874	Olysio,	-5.2
100003902	Mraviroc	-4.7
150338819	Lédipasvir	-3.0

Les résultats du docking par *Chimera* ont réduit le nombre de molécules qui ont une affinité de liaison élevée pour le récepteur PH-20 à quatre molécules, que nous avons sélectionné pour le reste des analyses. Il s'agit de médicaments approuvés par la FDA, et dont les modes d'action et les effets secondaires sont connus.

Paritaprevir qui présente le meilleur score ΔG , est une molécule à activité antivirale *in vitro* contre plusieurs génotypes du virus de l'hépatite C (VHC) (Messina et al., 2015). Le *Paritaprevir* coadministré avec le *Ritonavir*, l'*Ombitasvir*, le *Aasabuvir* et le Régime 3D, s'est avéré efficace pour le traitement de l'infection par le VHC de génotype 1 et a été approuvé pour cette indication. Les effets indésirables les plus couramment observés qui peuvent toucher plus d'une personne sur 5 sont les suivants : fatigue et nausées (sensation de malaise) (Pilot et al., 2015).

Pazopanib est indiqué dans le traitement de première intention du cancer du rein métastatique. Le *pazopanib* est un inhibiteur multikinase qui cible le récepteur facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR), le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) et la protéine c-Kit, inhibant l'angiogenèse. Il est indiqué chez les patients adultes atteints d'un cancer colo-rectal à un stade métastatique, à la fois en première intention et après un traitement antérieur par des cytokines. Les effets indésirables observés suite à l'utilisation de cette molécule sont des changements dans les ongles, une chute ou une raréfaction des cheveux, une douleur musculaire, articulaire ou osseuse (Hurwitz et al., 2005).

L'*Erismodegib*, troisième meilleur ligand potentiel pour le récepteur PH-20, inhibe la transition épithéliale-mésenchymateuse et la croissance des cellules souches du cancer de la prostate. Les effets indésirables les plus fréquents, survenus chez au moins 10 % des patients traités avec cette molécule, ont été les suivants : spasmes musculaires, alopecie, dysgueusie, fatigue, nausées, douleur musculo- squelettique, diarrhée, perte de poids, diminution de l'appétit, myalgie, douleur abdominale, maux de tête (Nanta et al., 2013).

Le *Daclatasvir* inhibe la réplication du VHC en se liant à l'extrémité N-terminale de la protéine 5A non structurale (NS5A), affectant à la fois la réplication de l'ARN viral et l'assemblage du virion. L'utilisation de cette molécule peut provoquer fatigue, céphalées, insomnie, vertiges, troubles digestifs et arthralgies (Smith et al., 2016).

3- Type de liaisons engagées dans l'interaction Récepteur PH-20/ligands

Les diagrammes 2D, confirment l'affinité de liaison des molécules qui montrent les quatre meilleurs scores delta G, puisque chacune d'elle engage un grand nombre de liaisons dans son interaction avec PH-20.

* Entre Paritaprevir et PH-20, nous pouvons recenser, comme le montre **la figure 11**

- Une liaison hydrogène formée entre le Paritaprevir et le résidu tyrosine en position 100 du récepteur **P38567**. La liaison hydrogène est une liaison chimique non covalente de type dipôle-dipôle entre 2 molécules ou entre 2 groupements d'une molécule. Elle joue un rôle stabilisateur de la structure secondaire des macromolécules biologiques (**Li et al., 2021**).
- Quatre liaisons Pi-alkyl entre Paritaprevir et le résidu tyrosine en position 91, leucine en position 342, proline en position 56, valine en position 312 du récepteur **P38567**. Les interactions non covalentes impliquant des systèmes pi sont essentielles pour des événements biologiques tels que la reconnaissance protéine-ligand (**Meyer et al., 2003**).
- Une liaison Pi-cation entre Paritaprevir et le résidu arginine en position 305 du récepteur **P38567**. L'interaction pi-cation est une interaction électrostatique stabilisante d'un cation avec le nuage d'électrons pi polarisable d'un cycle aromatique. Les interactions cation-pi contribuent de manière significative à la stabilité globale de la plupart des protéines (**Gallivan et Dougherty, 1999**).
- Une liaison Pi-sulfure entre Paritaprevir et le résidu tyrosine en position 100 du récepteur **P38567**.

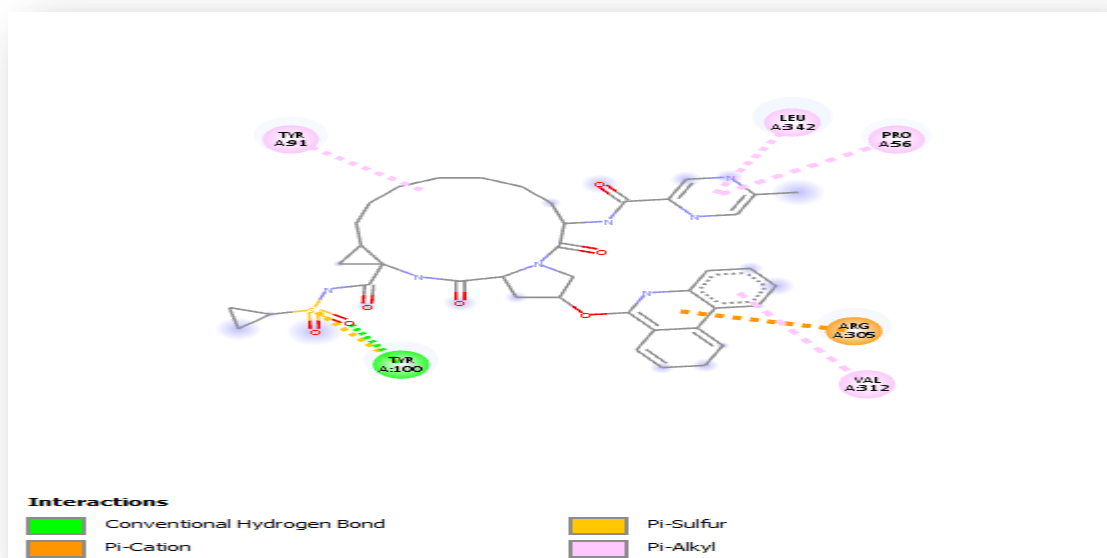


Figure 11 : Diagramme 2D de l'interaction Paritaprevir – PH-20

* L'interaction Pazopanib – PH-20 engage, comme le montre la **figure 12** :

- Une liaison Pi-anion entre Pazopanib et le résidu glutamique en position 148 du récepteur **P38567**. La liaison Pi-anion est une interaction chimique entre un système π -électronique et un anion. Elle se produit lorsque les électrons π d'une molécule ou d'un groupe fonctionnel entrent en interaction avec un anion chargé négativement. Elle joue un rôle stabilisation de la conformation moléculaire et es complexes métalliques (**Li et al., 2022**).
- Deux liaisons carbone hydrogene entre Pazopanib et le résidu serine en position 103 et le résidu aspartine en position 93 du récepteur **P38567**.
- Deux liaison Pi-stacked entre Pazopanib et le résidu tyrosine en position 91 du récepteur **P38567**.
- Deux liaisons Pi-alkyl entre Pazopanib et résidu proline en position 78 du récepteur **P38567**.
- Deux liaisons alkyl entre Pazopanib et le résidu proline en position 56 et le résidu tryptophane en position 339 du récepteur **P38567**.
- Une liaison Pi – sulfure entre Pazopanib et le résidu tyrosine en position 100 du récepteur **P38567**.

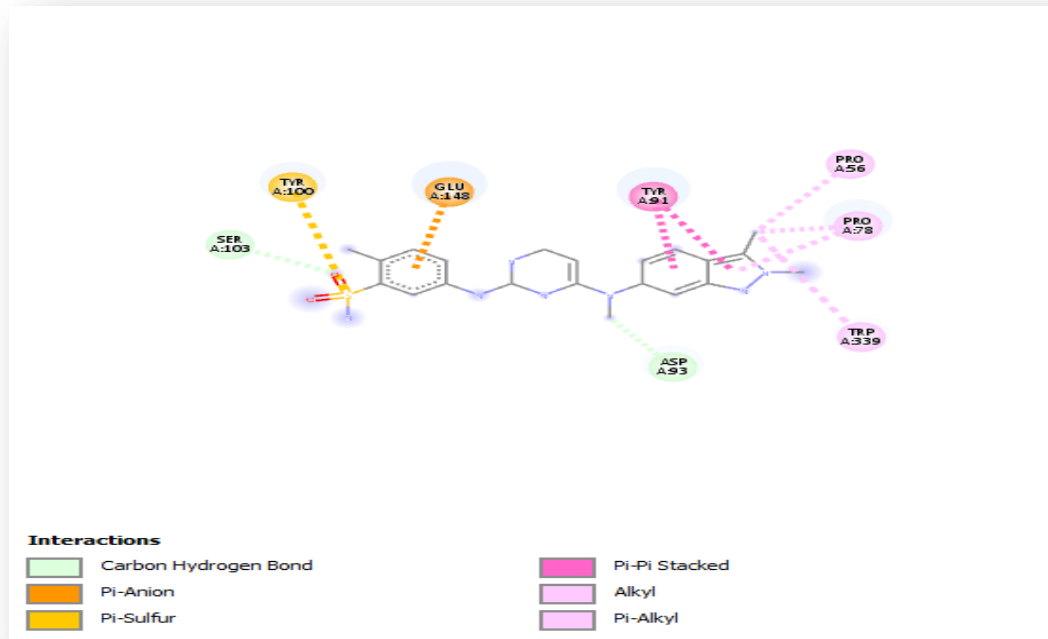


Figure 12 : Diagramme 2D de l'interaction Pazopanib– PH-20

* D'après la figure 13, le complexe Erismodegib-PH-20, engage :

- Une liaison hydrogène entre Erismodegib et le résidu thréonine en position 341 du récepteur **P38567**.
- Une liaison carbone hydrogène entre Erismodegib et le résidu arginine en position 79 du récepteur **P38567**.
- Deux liaison halogène entre Erismodegib et le résidu proline en positon 78 du récepteur **P38567**.
- Une liaison Pi-Pi stacked entre Erismodegib et le résidu tyrosine en positon 91 du récepteur **P38567**.
- Une liaison Pi-Pi t-shaped entre Erismodgib et le résidu tyrptophane en positon 339 du récepteur **P38567**.
- Deux liaisons Pi-alkyl entre Erismodegib et le résidu tyrosine en positon 91 et le résidu tyrptophane en positon 339 du récepteur **P38567**.

- Une liaison alkyl entre Erismodegib et le résidu valine en position 312 du récepteur P38567.

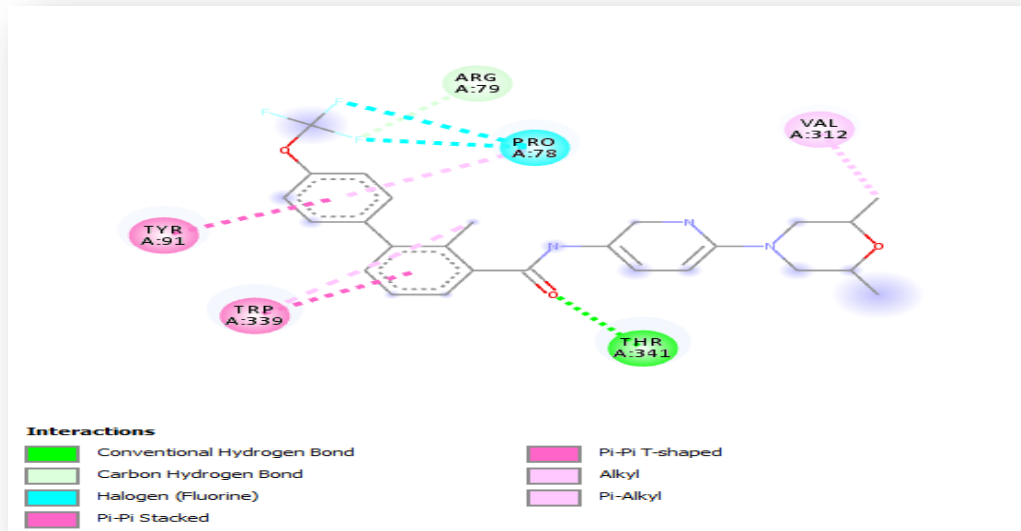


Figure 13 : Diagramme 2D de l'interaction Erismodegib– PH-20

*Comme le montre la figure 14, l'interaction Daclatasvir- PH-20 engage :

- Deux liaisons hydrogène formée entre Daclatasvir et le résidu aspartine en position 93 et le résidu glutamique en position 147 du récepteur **P38567**.
- Deux liaisons Pi-alkyl entre Daclatasvir et le résidu proline en position 159 et le résidu tyrosine en position 91 du récepteur **P38567**.
- Une liaison Pi-anion entre Daclatasvir et le résidu glutamique en position 148 du récepteur **P38567**.
- Deux liaisons Pi-cation entre Daclatasvir et le résidu glutamique en position 148 et le résidu lysine en position 160 du récepteur **P38567**.

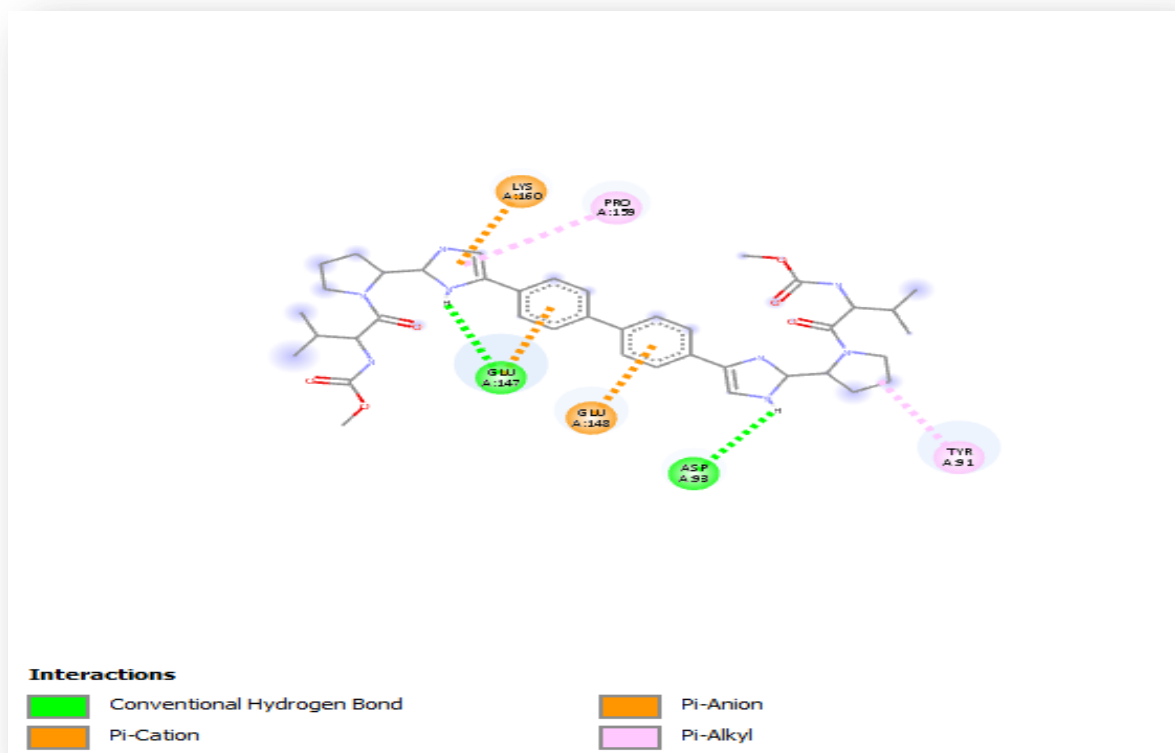


Figure 14 : Diagramme 2D de l'interaction Daclatasvir– PH-20

Conclusion

PH-20 est l'une des protéines constitutives du spermatozoïde. Son rôle principal est de servir de récepteur à la zone pellucide lorsqu'il tente de pénétrer l'ovule pendant la fécondation.

En vue d'une approche de contraception non hormonale, nous avons entrepris une étude par docking moléculaire pour rechercher des inhibiteurs potentiels susceptibles d'interagir avec PH-20 afin d'empêcher son interaction avec la zone pellucide, et donc empêcher la fécondation.

Le criblage moléculaire a fait ressortir 1617 molécules FDA, avec une affinité de liaison avec le récepteur PH-20. Onze d'entre elles seulement ont été retenues pour le docking moléculaire sur la base de leur faible variation d'énergie de Gibbs.

Toutefois, en raison de leurs utilisations thérapeutiques et leurs effets secondaires, ces molécules ne semblent pas a priori intéressantes dans le cadre d'un repositionnement de médicaments pour une contraception non hormonale. Bien que certains de ces médicaments ne provoquent que des effets secondaires mineurs, il s'avère que ce sont les mêmes effets indésirables de la contraception hormonale. Cependant, des études *in vitro* et *in vivo*, seraient nécessaires afin d'explorer l'efficacité de ces molécules et éventuellement l'absence d'effets indésirables à faible dose.

Pour des études ultérieures, nous souhaitons cibler la protéine PH-20 pour une approche d'immuno-contraception.

Références
bibliographiques

A

Aronson, N.N. Jr and Davidson, E.A. (1965). “Lysosomal Hyaluronidase”, Preliminary communications, 240 (7), 3222.

B

Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76, 185-202

C

Croset N. (1994) Acrosome reaction and fertilization, INRA, Unité de biologie de la fécondation, Jouy-en-Josas., 22,328-3

Croset N. (1991). La fécondation in vivo et in vitro. In *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Eds. Thibault, C., M. C. Levasseur. Paris, Collection Ellipses INRA. pp. 315-337

Croset, N., Dumont, M. (1984). The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte. *Gamete Res.* 10: 97-105.

Coulombel L., (2016) Reprogrammation fonctionnelle de gamètes mâles par des embryons haploïdes parthénotes, Directrice de recherche émérite, Inserm U1130, conseillère scientifique de médecine/sciences, Paris, France. ; 2016 ; 32 : 903-7.

Castellano, L.E., Trevino, C.L., Rodriguez, D., Serrano, C.J., Pacheco, J., Tsitsumi, V., Felix, R., and Darszon, A. (2003). Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.* 541, 69-74.

Cherr G.N., Yudin A.I., Overstreet J. W (2001). The dual functions of GPI anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix biology.*; 20, 515-525

Csoka, A. B., Scherer, S. W., and Stern, R. (1999). Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31, *Genomics* 60, 356-361.

Csoka, A. B., Frost, G. I., and Stern, R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes, *Matrix Biol* 20, 499-508.

D

Dacheux J.D., Gatti J.I., Dacheux F. (2010). Maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme : un nouveau regard sur un problème ancien. *Médecine Thérapeutique Endocrinologie.* ; 12 ,183-191

De almeida, M. (1991). Procréations médicalement assistées et infertilités immunologiques. *L'Information du Technicien Biologiste.* 4 : 180-183.

De almeida, M. (1993). Les stérilités masculines d'origine immunologique et leurs traitements. *Rev. Prat.* 43 : 956-959

De almeida, M. (1989). Anticorps antispermatozoïdes chez l'homme : IAC ou FIV ? In *Stérilité masculine et procréations médicalement assistées.* Eds. Englert, Y., J. F. Guérin, P. Jouannet. Paris, DOIN Editeurs. pp. 101 -112

Duran., Reynals F. (1928). Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes .*CR Soc Biol.* ; 99 : 6–7

Deng X, He Y, Martin-Deleon PA. (2000). *J Androl.* .21 ,822–32.

Dallakyan S., Olson AJ. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology;* 1263: 243-250.

F

Frost, G. I., Csoka, T., Stern, R. (1996). The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview., *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 8, 419-434.

G

Gmachl M, Kreil G. (1993). Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA;* 90:3569-3573.

Gallivan, J. P., & Dougherty, D. A. (1999). Cation- π interactions in structural biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* Volume 96, Numéro 17, page 9459-94

H

Hunnicutt GR., Primakoff P., Myles DG. (1996). Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biology of reproduction.* ; 55 : 80-86.

Hanisha HB., Fares HR., Matteo AA. (2019). The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization. *The Company of Biologists Ltd Development*; 146 :1-13.

Holland MK., Andrews J., Clarke H., Walton C., Hinds LA. (1997). Selection of antigens for use in a virus-vectored immunocontraceptive vaccine: PH-20 as a case study. *Reproduction, Fertility and Development*; 9(1) :117–124.

Hurwitz H, Dowlati A, Savage S, Fernando N, Lasalvia S, Whitehead B, et al. Sécurité, (2005). tolérabilité et pharmacocinétique de l'administration orale de GW786034 chez les patients atteints de tumeurs solides. *J Clin Oncol.* 2005 : 23–3012.

I

Ikawa M., Inoue N., Adam MB., Masaru. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The journal of clinical investigation* ;120, 1-11.

J

Jedrzejewski M. J., Stern R. (2005). Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. *issue 2 .61, 227-238*

Jacques J., Ngatchou N., Amory J K. (2013). New approaches to male nonhormonal contraception. *Contraception.*; 87(3): 296–299.

K

Kirschner K, Bisswanger H. (1976). Multifunctional proteins. *Annu Rev Biochem*; 45:143-166.

Kiipker W., Diedrich K., Edwards RG. (1998). Principals of mammalian fertilization. *Human Reproduction* ;13: 20-32

Kirkpatrick JF., Lyda RO., Frank KM. (2011). Contraceptive vaccines for wildlife: a review. *The American Journal of Reproductive Immunology*; 66(1): 40–50.

Kaur K., Prabha V. (2014). Immunocontraceptives: New Approaches to Fertility Control. *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 868196, 15 pages,

Kitchen DB., Decornez H., Furr JR., Bajorath J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery. methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov*; 3: 935–949.

Kinnings SL., Liu N., Buchmeier N., Tonge PJ., Xie L., Bourne PE. (2009). Drug discovery using chemical systems biology: Repositioning the safe medicine Comtan to treat multi-drug and extensively drug resistant tuberculosis. *PLoS Comput. Biol*; 5: e1000423.

L

Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* ; 125 :1157-1163.

Langeb B., V. ; Gille, A.-S. ; Firmin, J. ; Jean, C. ; Bourdon, M. ; Santulli, P. ; Patrat, C. (2021) La fécondation dans l'espèce humaine. *Obstétrique.* ,44,1 -10

Lathrop W.F., Carmichael E.P., Myles D.G., Primakoff P., (1990). cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J. Cell Biol.* 111, 2939–2949.

Liu I.K.M.; Turner Junior J.W.; Van Leeuwen E.M.G.; Flanagan D.R.; Hedrick J.L.; Murata K.; Lane V.M.; Morales-Levy M. P. (2005). Persistence of anti-zonae pellucidae antibodies following a single inoculation of porcine zonae pellucidae in the domesticequine. *Reproduction* ;129(2) :181-190.

Lee A.; Lee K.; Kim D. (2016). Using reverse docking for target identification and its applications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov*; 11 :707–715.

Li C., Hilgeroth P., Hasan N., Ströhl D., Kressler J., Binder WH. (2021). Comparing C2=O and C2=S Barbiturates: Different Hydrogen-Bonding Patterns of Thiobarbiturates in Solution and the Solid State.*Int J Mol Sci*; 22(23):12679.

M

Myles DG, Hyatt H, Primakoff P. (1987). Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. *Dev Biol*; 121:559-567.

Mihajlovic AI., FitzHarris G. (2018). Segregating Chromosomes in the Mammalian Oocyte. *Current Biology.*; 28, R895–R907

Madan AK, Yu K, Dhurandhar N, Cullinane C, Pang Y. (1999). Beech DJ. *Oncol Rep*; 6: 607–9.

Mao.H., Yang.W (2013). Modes of acrosin functioning during fertilization. Elsevier B.V. All rights reserved ;526 :75-79.

Meyer EA., Castellano RK., Diederich F. (2003). Interactions avec les cycles aromatiques dans la reconnaissance chimique et biologique. *Angewandte Chemie International Edition en anglais* ; 42 (11) : 1210–1250.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Distribution. (2015). Mondiale et prévalence des génotypes du virus de l'hépatite C. *Hépatologie* ; 61 : 77–87

N

Naz RK. (2011). Contraceptive Vaccines: Success, Status, and Future Perspective. *The American Journal of Reproductive Immunology*; 66(1): 2–4.

Naz RK., Gupta SK., Gupta J C., Vyas HK., Talwar GP. (2005). Recent advances in contraceptive vaccine development. *Human Reproduction* ; 20(12) : 3271–3283.

Naz RK (2005). Contraceptive vaccines. *Drugs* ; 65(5) : 593-603.

Naz R.K. (1999). Vaccin pour la contraception ciblant le sperme. *Immunol Rev*; 171,193–202

Nanta R., Kumar D., Meeker D., Rodava M., veldhuizen PJ., S hamkars S., Srivastqvic RK., (2013), Le NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibe la transition épithéliale-mésenchymateuse et la croissance des cellules souches du cancer de la prostate chez les souris nulles NOD/SCID IL2R γ en régulant Bmi-1 et le microARN-128. *Oncogène* 3(4)

O

Oetl, M., Hoehstetter, J., Asen, I., Bernhardt, G., and Buschauer, A. (2003). Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase.

P

Perham RN. (1991). Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry*; 30:8501-8512.

Patrat C., Serres C. (2009). La capacitation in vivo : influence de l'environnement féminin. Quarantième Journée thématique de la SFEF. ; 37, 536–539

Primakoff P., Woolman-Gamer L., Tung KSK., Myles DG. (1997). Reversible contraceptive effect of PH-20 immunization in male guinea pigs. *Biology of Reproduction*; 56,1142–1146.

Pilot- Matias T, Tripathi R, Cohen D, Gaultier I, Dekhtyar T, Lu L, Reisch T, Irvin M, Hopkins T, Pithawalla R, Middleton T, Ng T, McDaniel K, Or YS, Menon R, Kempf D, Molla A, Collins C. (2015). Activité antivirale in vitro et in vivo et profil de résistance de l'inhibiteur de protéase NS3/4A du virus de l'hépatite C ABT- 450. *Agents antimicrobiens Chemother* ; 59 : 988–97.

Pomering M., Jones RC., Holland MK., Blake AE., Beagley KW. (2002). Restricted entry of IgG into male and female rabbit reproductive ducts following immunization with recombinant rabbit PH-20. *The American Journal of Reproductive Immunology* ;47(3)174–182.

Pang B., He J., Zhang W., Huang H., Wang Y., Wang M., Du G., Kang Z. (2022). Active Expression of Human Hyaluronidase PH20 and Characterization of Its Hydrolysis Pattern. *Front Bioeng Biotechnol*; 10: 885888.

Pettersen EF., Goddard TD., Huang CC., Couch GS., Greenblatt DM., Meng EC., Ferrin T. (2004). UCSF Chimera - un système de visualisation pour la recherche exploratoire et l'analyse. *J Comput Chem*; 25(13): 1605-12.

Pinzi L., Rastelli G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci*; 20(18): 1-23. 182.

S

Stern, R. (2003). Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 13, 105R-115R.

Saling, P. M., Storay, B. T. (1979). Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 83 : 544-555

Sade A., Banerjee S. (2010). SPAM 1(Sperm adhesion molecule 1(PH-20 hyaluronidase, Zona pellucida binding)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*

Sigrid Arming, Birgit Strobl, Christian Wechselberger, Gunther Kreil., Strobl B., Wechselberger C., Kreil G. (1997). In Vitro Mutagenesis of PH-20 Hyaluronidase from Human Sperm. *Eur. J. Biochem.*;247, 810-814

Sterling T., Irwin JJ. (2015). ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model*; 55(11) :2324–2337.

Shoichet BK., McGovern SL., Wei B., Irwin JJ. (2002). Lead discovery using molecular docking. *Curr. Opin.Chem. Biol*; 6 :439–446.

Stepanenko N., Wolk O., Bianchi E., Wright GJ., Schachter-Safrai N., Makedonski K., Ouro A., Meir AB., Baganim Y., Goldblum A. (2022). In silico Docking Analysis for Blocking JUNO-IZUMO1 Interaction Identifies Two Small Molecules that Block in vitro Fertilization.*Front Cell Dev Biol*;5(10):824629.

Smith MA, Regal RE, Mohammad RA (2016). Daclatasvir : un inhibiteur du complexe de réplication NS5A pour l'infection par l'hépatite C. *Ann Pharmacother* ; 50 : 39–46.

T

Tung KSK., Primakoff P., Woolman-Gamer L., Myles DG. (1997). Mechanism of infertility in male guinea pigs immunized with sperm PH-20,” *Biology of Reproduction*; 56(5):1133-1141.

W

Wassarman P. M. (1987). The biology and chemistry of fertilization. *Science.*; 235, 553-560.

Wassarman PM., Luca J., Eveline SL. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology*; 3: 59-64