



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la

Terre et de l'Univers

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté par

Larbi Bouchra et Beldjilali Amira

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

**Inhibition de IZUMO1, pour une contraception
non hormonale**

Soutenu le _____, devant le jury composé de :

Présidente	MEDJATI	Nouria	Professeur	Université TLEMCCEN
Examinatrice	DALI YOUCEF	Majda	Professeur	Université TLEMCCEN
Encadrante	BERRAHOU	Samira	Maître assistante A	Université TLEMCCEN

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

Nous adressons nos remerciements à l'éternel, ALLAH tout puissant qui nous a permis de réaliser ce travail. Nous vous devons ce que nous sommes devenues, louanges et remerciements pour votre clémence et miséricorde.

Nos remerciements s'adressent ensuite à notre encadrante Mme **BERRAHOU Samira** pour nous avoir honoré en acceptant de guider notre travail, et pour sa disponibilité et ses précieux conseils, ses efforts, ses relectures attentives, ses remarques et son soutien tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer également toute notre reconnaissance à Mr **CHERRAK Sabri** pour nous avoir guidé durant la réalisation du travail avec une disponibilité permanente, et de nous avoir fait bénéficier de ses connaissances dans le domaine du docking moléculaire.

Nous tenons également à remercier, mesdames **MEDJATI Nouria** et **DALI YUCEF Madjda**, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

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.

Dédicaces

Je dédié mon travaille

A mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et la confiance que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera pour toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulé, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

A ma seule et ma chère sœur bien aimée Meriem

A mes chers frères Ayoub, Sidi Mohammed, Abdelhadi.

A ma belle-sœur Rachida

A mes nièces Malek et Douae et mes neveux Fares et Yanis

A mes amis les plus fidèles Hanen, Ahlem, Nassira, Asmae, je vous remercie pour tous les beaux moments inoubliables qu'on a passé ensemble.

A mon binôme Larbi Bouchera, d'avoir eu le courage pour cloître ce travail.

A tous les gens qui ont cru en moi et qui me donnent l'envie d'aller en avant.

Amira

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail,

*A mon précieux offre de Dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect ; mon cher père **Mohammed**, merci pour ton soutien, ton affection et la confiance que tu m'as accordé*

*A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, à ma source d'amour, à la mère des sentiments fragiles qui ma bénie par ces prières ; ma cher maman **Rachida**, que dieu te garde*

*A mes très chers sœurs **Chahrazed** et **Kawther**, qui m'ont toujours soutenu et encouragé*

*A mon adorable nièce **Ghizlene***

*A mon beau-frère **Abderahim***

*Bien sur son oublier mon binôme **Beldjilali Amira**, qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail*

A mes amis et à toutes personnes qui nous ont toujours accompagné de loin ou de près dans la réalisation de ce travail

Et tous ceux qui aiment le bon travail et ne reculent pas devant les obstacles de la vie

Bouchra.

Résumé

IZUMO1, une protéine spermatique, est un des acteurs protéiques essentiels à l'interaction gamétique. En son absence, la fécondation ne peut pas se faire, ce qui entraîne une stérilité totale.

Par des méthodes de docking moléculaire, nous avons recherché parmi les médicaments approuvés par la FDA, des inhibiteurs potentiels d'IZUMO1. L'objectif est d'empêcher son interaction avec JUNO. Cette interaction est en effet essentielle à la fécondation.

Les résultats obtenus nous ont permis de ressortir 7 molécules susceptibles de se lier avec IZUMO1 avec une forte affinité de liaison. Nous en avons retenu trois : la Naldemedine, la Dihydroergotamine et la Simeprevir, en raison de leurs effets secondaires mineurs comparés aux autres médicaments.

Ces molécules pourraient être repositionnées dans le cadre d'une contraception non hormonale. Toutefois, des essais *in vitro* seraient nécessaires pour tester la stabilité de l'interaction entre ces médicaments et IZUMO1, et leur efficacité à bloquer la fécondation.

Mots clés : IZUMO1, fécondation, contraception non hormonale, docking moléculaire.

المخلص

IZUMO1، البروتين المنوي هو أحد عناصر البروتين الأساسية المشاركة في التفاعل المشيجي. في حالة غيابه، لا يمكن إجراء الإخصاب مما يؤدي إلى العقم التام.

باستخدام طرق الالتحام الجزيئي، بحثنا بين الأدوية المعتمدة من إدارة الغذاء والدواء عن مثبطات IZUMO المحتملة. الهدف هو منع تفاعلها مع JUNO. هذا التفاعل ضروري بالفعل للإخصاب.

سمحت لنا النتائج التي تم الحصول عليها بتسليط الضوء على 7 جزيئات من المحتمل ان ترتبط بIZUMO بتقارب ارتباط عال. اخترنا ثلاث: Naldemedine و Simeprevir و Dihydroergotamine بسبب اثارها الجانبية الطفيفة مقارنة بالأدوية الأخرى.

يمكن إعادة وضع هذين الجزيئين كجزء من وسائل منع الحمل غير الهرمونية. ومع ذلك، ستكون الاختبارات المخبرية ضرورية لاختبار استقرار التفاعل بين هذه الأدوية وIZUMO وفعاليتها في منع الإخصاب.

الكلمات المفتاحية: الالتحام الجزيئي، وسائل منع الحمل غير الهرمونية، الإخصاب، IZUMO1

Abstract

IZUMO1, a spermatid protein, is one of the protein factors essential to gametic interaction. In its absence, fertilization cannot be done, which leads to total sterility.

Using molecular docking methods, we searched for potential IZUMO1 inhibitors among FDA-approved drugs. The goal is to prevent its interaction with JUNO. This interaction is indeed essential to fertilization.

The results obtained allowed us to identify 7 molecules likely to bind with IZUMO1 with a strong binding affinity. We selected three: Naldemedine, Dihydroergotamine and Simeprevir, because of their minor side effects compared to other drugs.

These molecules could be repositioned as part of non-hormonal contraception. However, in vitro tests would be needed to test the stability of the interaction between these drugs and IZUMO1, and their effectiveness in blocking fertilization.

Keywords: IZUMO1, fertilization, non-hormonal contraception, molecular docking.

Liste des abréviations

ADAMs : A Disintegrin And Metalloprotease.

CHC : Contraceptif Hormonaux Combinés

CD : Cluster de Différenciation

DMPA : Depot-MedroxyProgesterone Acetate

DIU : Diapositif Intra-Utérine

EPV : Espace Péri Vitellin.

FABM: Fertility Awareness Based Method

FDA: Food and Drugs Administration

FSH: Hormone Folliculo-Stimulante

FIV: Fécondation In Vitro

FOLR: FOLate Receptor

GPI-AP: GlycosylPhosphatidylInositol-Anchored Proteins

IST: Infections Sexuellement Transmissibles

KO: Knock-Out

LAM: Lactational Amenorrhea Method

LH: Hormone Lutéinisante

POP: Progestogen-Only Pill

RA: Réaction Acrosomique

SIU: Système Intra-Utérine

SPESP: Sperm Equatorial Segment Protein

ZP : Zone Pellucide

ΔG : énergie libre de Gibbs

Liste des figures

Figure 1: Structures principales du spermatozoïde mammifère mature (Borg et al., 2010)	6
Figure 2: Vue schématique d'un ovocyte ayant expulsé son premier globule polaire (Evans, 2012)	7
Figure 3: Schéma récapitulatif représentant les principaux acteurs impliqués dans les processus d'adhésion/fusion gamétique (Gadella et Evans, 2011)	7
Figure 4: Exemple de la structure d'une tétraspanine : Structure de la tétraspanine CD9 (Kawano et al., 2011)	8
Figure 5: Diagramme schématique de la structure de domaine de la famille ADAM (une désintégrine et une métalloprotéinase) (Murphy, 2008)	10
Figure 6: Schéma représentant la structure de JUNO (Bianchi et al., 2014)	11
Figure 7: Représentation schématique classique des étapes de la réaction acrosomique (Ladyofhats et al., 2006)	13
Figure 8: Schéma de la fusion membranaire des gamètes (Yanagimachi, 1978)	15
Figure 9: Structure de IZUMO (Inoue et al., 2005)	19
Figure 10: Structure 3D de la protéine chaîne a de IZUMO1	29
Figure 11: Digramme 2D de l'interaction Naldemedine-IZUMO1	42
Figure 12: Digramme 2D de l'interaction Dihydroergotamine-IZUMO1	43
Figure 13: Digramme 2D de l'interaction Simeprevir-IZUMO1	44

Liste des tableaux

Tableau 1: Les meilleurs scores ΔG révélés par le screening moléculaire par PyRx 39

Tableau 2: Les meilleurs scores ΔG révélés par le docking moléculaire par Chimera .. 40

Table des Matières

Introduction.....	1
Synthèse Bibliographique.....	3
Chapitre I	4
1 La fécondation.....	5
2 Les gamètes.....	5
2.1 Le spermatozoïde	5
2.2 L'ovocyte	6
3 Les acteurs protéiques impliqués dans l'interaction gamétique	7
3.1 Les acteurs ovocytaires	7
3.2 Les acteurs spermatiques.....	9
4 Les étapes de la fécondation.....	12
4.1 Attachement des spermatozoïdes sur la ZP	12
4.2 Induction de la réaction acrosomique.....	12
4.3 Pénétration de la zone pellucide.....	14
4.4 Adhésion des gamètes	14
4.5 Fusion des gamètes	14
Chapitre II	17
1 IZUMO1	18
2 La famille IZUMO	18
3 Propriétés structurales	18
4 Le rôle de IZUMO1 dans l'interaction gamétique	19
Chapitre III	20
1 La contraception.....	21
2 Contraceptifs hormonaux.....	21
2.1 Contraceptifs hormonaux combinés	21
2.2 Méthodes progestatives.....	21
3 Contraceptifs non hormonaux	21
4 Méthodes comportementales.....	22
Chapitre IV	24
1 Le docking moléculaire.....	25
2 Principe du docking moléculaire	25
3 Etapes du docking.....	25
4 Applications du docking moléculaire	25
Matériels et Méthodes.....	27
1 Logiciels et banques de données utilisés	28

2	Méthodes	29
2.1	Préparation des molécules au docking	29
2.1.1	Récepteur	29
2.1.2	Ligand	30
2.2	Docking moléculaire	30
2.2.1	Préparation du récepteur	34
2.2.2	Préparation du ligand	35
	Résultats	38
1	Criblage moléculaire	39
2	Docking moléculaire	39
	CONCLUSION	45
	Références Bibliographiques	45

Introduction

Au cours du XX^e siècle, la prévention des grossesses non désirées est devenue une préoccupation majeure tant pour les femmes que pour la société dans son ensemble, aboutissant au développement du premier contraceptif hormonal mis sur le marché en 1960. Depuis lors, tous les contraceptifs administrés par voie orale sont composés de combinaisons d'hormones stéroïdes des familles des progestatifs et des œstrogènes, qui inhibent le développement folliculaire et empêchent l'ovulation et la réceptivité endométriale. Cependant, ces médicaments ont un sérieux impact sur la santé de nombreuses femmes avec de nombreux effets secondaires (**Sabatini et Cagiano, 2006 ; O'Connell et al., 2007**) même à des doses plus faibles (**Rosenberg et al., 1999**). Les contraceptifs progestatifs « mini-pilules » réduisent bon nombre de ces risques, mais sont toujours associés à un niveau élevé d'abandon (**McCann et Potter, 1994**).

Des recherches substantielles ont donc été consacrées au développement de contraceptifs non hormonaux susceptibles de réduire ou d'éliminer ces effets secondaires. Pour atteindre cet objectif, il est essentiel d'identifier les protéines impliquées dans le processus de fécondation, en dehors des récepteurs d'hormones stéroïdiennes, afin qu'elles puissent être ciblées par les candidats non hormonaux. De nombreuses protéines de ce type ont été identifiées au fil des ans, principalement par des expériences d'inactivation ou par blocage avec des anticorps (**Gupta et al., 2015**). Parmi celles-ci, deux apparaissent comme les plus cruciaux pour l'interaction initiale entre les gamètes : IZUMO1 sur le sperme, découvert par **Inoue et al., (2005)** et son partenaire ovocyte, JUNO, découvert par **Bianchi et al., (2014)**.

L'objectif de notre travail est la recherche d'agents pharmacologiques approuvés par la FDA (Food and Drugs Administration), capables d'interagir avec la protéine IZUMO1 afin d'empêcher sa liaison avec JUNO et bloquer ainsi la fécondation. Il s'agit d'une étude *in silico*, utilisant les outils bioinformatiques du docking moléculaire et visant à repositionner des médicaments dans le cadre d'une contraception non hormonale.

Synthèse
Bibliographique

Chapitre I

1 La fécondation

La fécondation est un processus en plusieurs étapes qui comprend la reconnaissance du spermatozoïde et la fusion spermatozoïde-ovule, résultant en un organisme diploïde génétiquement distinct. La fusion montre une spécificité d'espèce moins distincte que l'étape de reconnaissance spermatozoïde-ovule de la fécondation, ce qui suggère que le mécanisme et les molécules responsables de la fusion des gamètes sont plus fortement conservés parmi les différentes espèces que ceux responsables de la reconnaissance spermatozoïde-ovule (**Allingham et Floraino, 2021**).

2 Les gamètes

2.1 Le spermatozoïde

Le gamète mâle a été visualisé pour la première fois par le néerlandais Antoine Van Leeuwenhoek en 1677. Cet homme passionné par la microscopie, décrivit cette cellule comme ayant un corps rond et une queue de cinq à six fois la longueur du corps (**Karamanou et al., 2010**). Le spermatozoïde est une cellule hyperspécialisée et bien compartimentée, et peut être divisée en deux grandes parties : la tête et le flagelle. Le flagelle peut être subdivisé en trois pièces : intermédiaire, principale, et terminale (**Figure 1**). Alors que les fonctions de la fécondation sont confinées à la tête du spermatozoïde, la motilité est prise en charge par le flagelle (**Buffone et al., 2012**).

La tête est composée d'un noyau dans lequel l'ADN est hyper condensé par des protamines, ce qui permettra de créer une forme hydrodynamique favorisant la mobilité et la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule (**Figure 1**) (**Fawcett, 1975**).

L'acrosome de mammifère est un organite hautement spécialisé recouvrant l'avant partie du noyau du sperme et contient une variété de protéines, y compris des enzymes hydrolytiques et molécules matricielles (**Figure 1**). Fonctionnellement, l'acrosome antérieur est impliqué dans la réaction de l'acrosome à l'interaction spermatozoïde-zone pellucide, tandis que le segment équatorial (acrosome postérieur) est impliqué dans la fusion spermatozoïde-ovule (**Yoshinaga et Toshimori, 2003**).

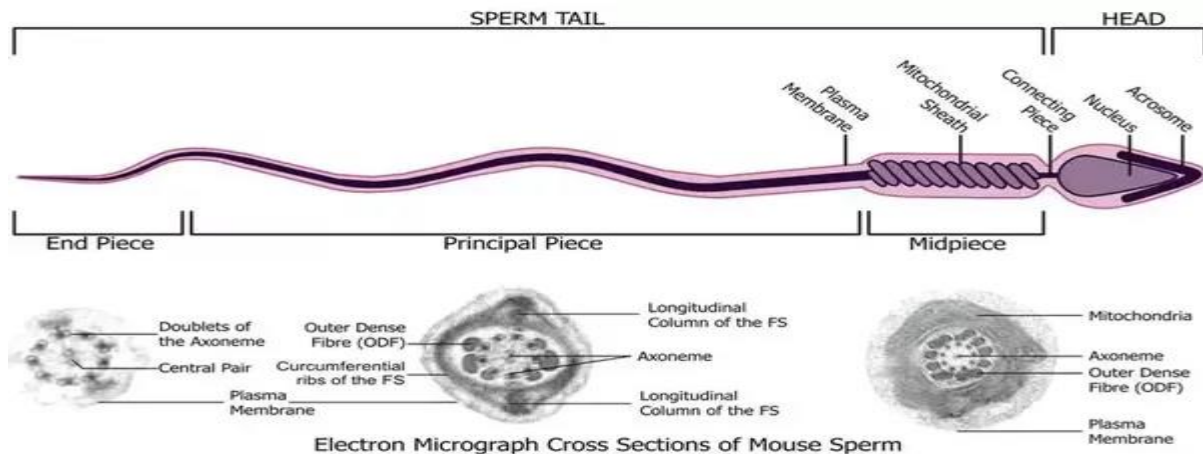


Figure 1: Structures principales du spermatozoïde mammifère mature (Borg et al., 2010)

2.2 L'ovocyte

L'ovocyte est une cellule sphérique de grande taille, 80 μ m de diamètre chez la souris et 120 μ m de diamètre chez l'homme. Elle est entourée d'un manteau de 3 glycoprotéines (ZP1, ZP2, ZP3) chez les mammifères non humains, et 4 chez l'homme (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) (Gupta et Bhandari, 2011). Appelé zone pellucide (ZP), ce manteau protège l'ovocyte du milieu environnant et constitue une barrière pour les spermatozoïdes (Gahlay et al., 2010). L'espace compris entre la membrane plasmique ovocytaire et la ZP est appelé espace périvitellin. La membrane cytoplasmique de l'ovocyte est recouverte de microvillosités, des protrusions membranaires maintenues par un cytosquelette d'actine. Elles permettent une augmentation importante de la zone de contact potentielle avec la tête du spermatozoïde et interviennent lors de l'internalisation de ce dernier (Runge et al., 2007). Le cytoplasme est riche en organelles. Il s'agit surtout des mitochondries et du réticulum endoplasmique lisse, impliqués dans la régulation et le stockage de calcium (Blakier et al., 2002). L'ovocyte est entouré par un nuage cellulaire, le cumulus oophorus, qui est composé d'environ 20 000 cellules folliculaires de la granulosa, maintenues entre elles en réseau par une matrice extracellulaire. Ces cellules persistent jusqu'à 72 heures après la fécondation (Figure 2) (Familiari et al., 2006).

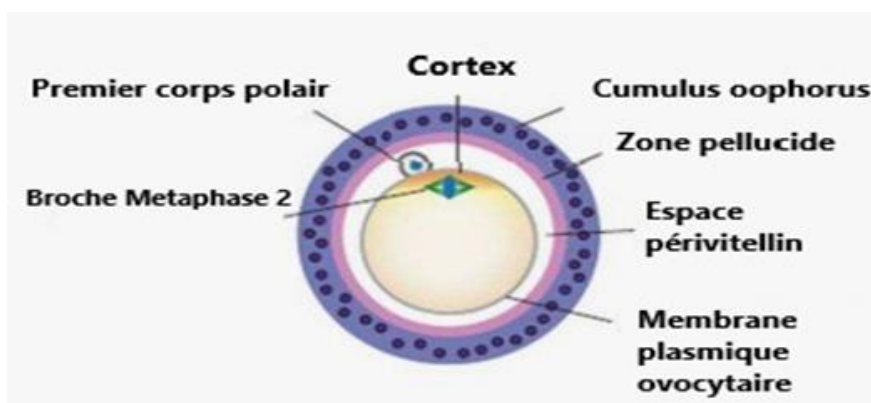


Figure 2: Vue schématique d'un ovocyte ayant expulsé son premier globule polaire (Evans, 2012)

3 Les acteurs protéiques impliqués dans l'interaction gamétique

Un nombre important de molécules ont été identifiées comme jouant un rôle dans l'interaction gamétique (Rubinstein et al., 2006a et 2006b; Inou et al., 2011). La détermination des molécules candidates a débuté par l'utilisation des anticorps bloquants dans des expériences de fécondation *in vitro*. Plus récemment, les travaux de protéomique ont permis d'identifier d'autres molécules (Figure 3) (Nishimura et al., 2001 ; Stein et al., 2006 ; Wolkowicz et al., 2008).

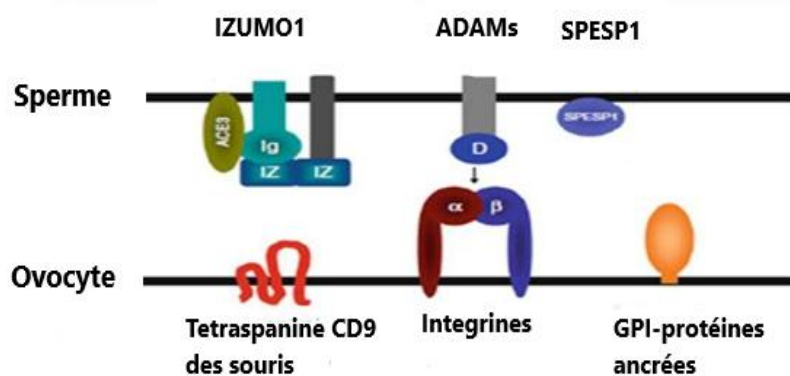


Figure 3: Schéma récapitulatif représentant les principaux acteurs impliqués dans les processus d'adhésion/fusion gamétique (Gadella et Evans, 2011)

3.1 Les acteurs ovocytaires

- **Les tétraspanines :** Constituent une famille de protéines, identifiées en premier sur les leucocytes humains (Hotta et al., 1988 ; Classon et al., 1989 ; Classon et al., 1990), largement présentes dans différents organismes. Elles sont également exprimées par différents tissus impliqués dans de nombreux processus cellulaires importants tels que la migration, l'adhésion, la fusion, la signalisation cellulaire, la réponse immunitaire et

les processus métastatiques (**Figure 4**) (Maecker et al., 1997 ; Charrin et al., 2009 ; Sala-Valdes et al., 2012 ; Hemler, 2014).

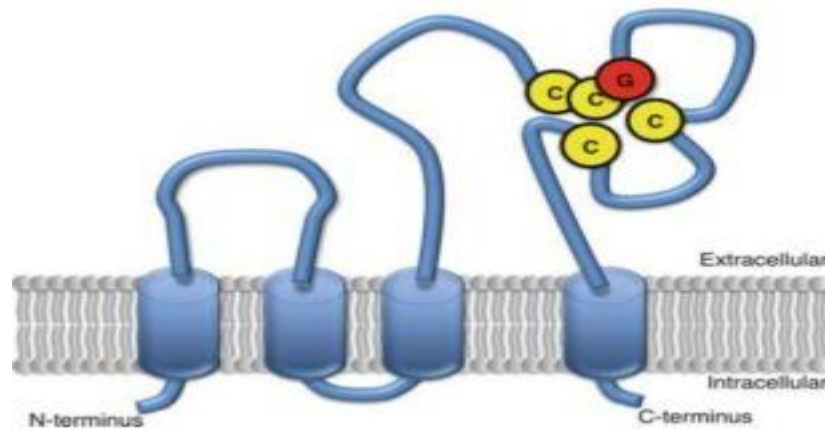


Figure 4: Exemple de la structure d'une tétraspanine : Structure de la tétraspanine CD9 (Kawano et al., 2011)

Les tétraspanines CD9 et CD81 sont impliquées dans le processus d'interaction gamétique. CD9 est impliqué dans le processus fusionnel lors de la fécondation ; la première preuve a été expérimentale : l'anticorps monoclonal JF9 dirigé contre CD9 inhibe la fusion gamétique (Chen et al., 1999). Le phénotype majeur observé sur des souris knock-out (KO) pour cette protéine est une forte réduction de la fertilité des femelles (chute de plus de 95% du taux de fécondation) causée par un défaut de fusion des gamètes. Lors d'expériences de fécondation *in vitro*, les spermatozoïdes adhérents à l'ovocyte CD9^{-/-} mais ne peuvent pas fusionner. En revanche, en s'affranchissant de cette étape de fusion, en injectant un spermatozoïde directement dans le cytoplasme de l'ovocyte CD9^{-/-}, le processus de fécondation peut se poursuivre (Kaji et al., 2000 ; Le Nouar et al., 2000 ; Miyado et al., 2000 ; Ziyat et al., 2006).

Les souris KO pour CD81 présentent également un défaut de fertilité ; moins sévère cependant que celui observé pour CD9. Ces souris ont des taux de fertilité de 40% inférieurs à la normale (Rubinstein et al., 2006).

Le double KO CD9 et CD81 est quant à lui complètement stérile, suggérant une interaction entre ces deux protéines (Rubinstein et al., 2006 ; Ziyat et al., 2006). Mais cette question est encore sujette à débat et a été dernièrement contredite par l'équipe de Miyado (Ohnami et al., 2012).

- **Les intégrines** : Parmi les molécules associées aux tétraspanines, se trouve la famille des intégrines dont un groupe est partenaire de la tétraspanine CD151. Il s'agit d'une famille de récepteurs transmembranaires impliqués dans les processus d'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire, dans la migration, la division et la réponse au stress mécanique. Ce sont également des molécules de signalisation à deux directions : de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur (inside-out) et à l'inverse de l'extérieur vers l'intérieur (outside-in) (**Bowen et Hunt, 2000 ; Wolf et al., 2011**). Elles ont été décrites pour la première fois par **Tamkun et al. (1986)**.

Leurs rôles dans l'interaction gamétique ont été rapportés en 1995, par une équipe qui a identifié l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ lors d'expériences d'inhibition de FIV (Fécondation *in vitro*) par l'anticorps GoH3 (**Evans et al., 1995**). L'intérêt pour cette famille de protéines a augmenté lors de travaux ultérieurs qui ont montré leur interaction avec les protéines de la famille des ADAMs notamment ADAM2 portées par la membrane spermatique (**Tarone et al., 1993 ; Evans et al., 1995**). L'équipe de **Barraud-Lange et al., (2007)**, a montré que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ était également présente à la surface du spermatozoïde. Toutefois, les travaux sur des animaux transgéniques portant sur les invalidations de gènes pour ces protéines de la membrane ovocytaire, ont ensuite montré que les lignées KO pour différentes intégrines sont fertiles (**Evans et al., 1995 ; He et al., 2003 ; Sengoku et al., 2004 ; Bayas et al., 2007**).

- **Les ancrés membranaires GPI-anchored proteins (GPI-APS)** : Sont des protéines "ancrées" à la membrane plasmique grâce à un glycolipide : le glycosyl-phosphatidylinositol.

Le rôle actif de la GPI-APS dans l'interaction gamétique a été découvert lors d'expériences de fécondation *in vitro*, menées en présence de phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC). Cette molécule clive les GPI anchored proteins. Les spermatozoïdes mis en présence d'ovocytes ayant subi ce traitement, adhèrent à la membrane plasmique de l'ovocyte mais ne fusionnent pas (**Coonrod et al., 1999**). La génération de lignées délétées de ces protéines uniquement dans l'ovocyte, montre que les spermatozoïdes s'accumulent dans l'espace périvitellin sans fusionner. Les expériences de fécondation *in vitro*, menées avec cette lignée, montrent un taux de fécondation diminué de 90% et un taux d'adhésion diminué de 40% (**Alfieri et al., 2003**).

3.2 Les acteurs spermatiques

- **ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease)** : Est une famille de protéines transmembranaires, caractérisée initialement grâce à des études d'analogie avec des

métalloprotéases contenues dans le venin de serpent. Les premières ADAMs de mammifères ont été découvertes à la surface de spermatozoïde de cochon d'Inde (**Primakoff et al., 1987 ; Wolfsbrg et white, 1996**). Cette famille de protéines a été appelée ainsi, car ses membres possèdent tous un domaine « métalloprotéase » et un domaine « désintégrine » (**Figure 5**) (**Murphy, 2008**).

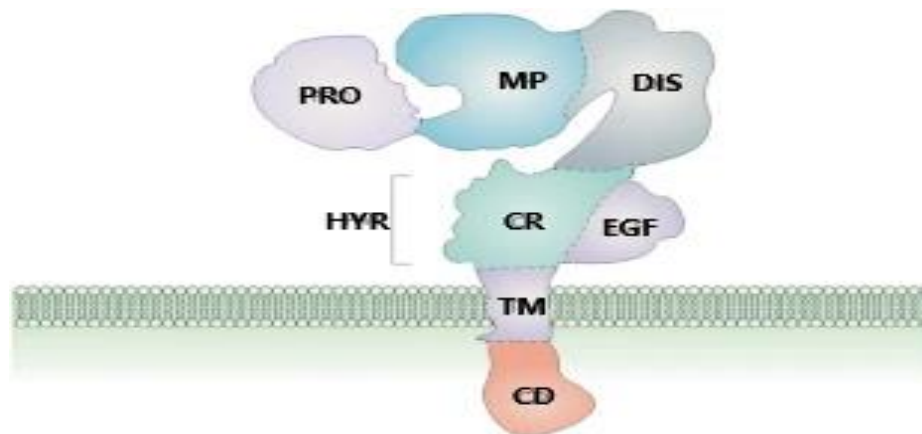


Figure 5: Diagramme schématisé de la structure de domaine de la famille ADAM (une désintégrine et une métalloprotéase) (Murphy, 2008)

Les protéines de la famille des ADAMs ont pendant longtemps été considérées comme des protéines jouant un rôle clé dans l'interaction gamétique. Mais l'apport des travaux sur les lignées transgéniques KO a montré que bien qu'elles semblent jouer un rôle important dans l'interaction gamétique, leur absence n'entraîne pas de stérilité totale. Leur rôle dans l'adhésion/fusion n'est pas complètement élucidé. La fertiline ou complexe PH-30 est constituée de deux sous-unités : la fertiline α dite ADAM1 et la fertiline β dite ADAM2 (**Primakoff et al., 1987 ; Blobel et al., 1992**). Des expériences d'immuno-précipitation ont montré que la fertiline β développait une liaison en trans avec l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ ovocytaire (**Eto et al., 2002**). Ces résultats ont alors été étayés par des tests d'inhibition de la fécondation qui ont montré une baisse importante du taux de fécondation, toutefois celle-ci était encore possible. La génération de souris KO pour la fertiline β a révélé différentes anomalies fonctionnelles, une chute importante du taux de fécondation mais pas de stérilité complète (**Nishimura et al., 2001**).

Les expériences d'inhibition de la fécondation *in vitro* ont montré qu'en bloquant le domaine désintégrine d'ADAM3 on observait 80% de baisse du taux d'adhésion et 90% de baisse de taux de fusion (**Yuan et al., 1990**). De même, les animaux transgéniques délétés pour la cystétine ne montre pas de stérilité totale. Cette protéine semble être impliquée dans le

processus d'adhésion du spermatozoïde avec la zone pellucide et non avec la membrane plasmique ovocytaire (Nishimura et al., 2001).

- **SPESP1 (Sperm Equatorial Segment protein)** : Est une protéine de la région équatoriale qui demeure intacte après la réaction acrosomique (Wolkowicz et al., 2003). Les anticorps dirigés contre cette protéine inhibent la fusion entre les spermatozoïdes humains et les ovocytes de hamster (Wolkowicz et al., 2008). Les spermatozoïdes issus de la lignée KO pour cette protéine montrent une baisse importante du taux de fécondation par défaut de fusion (Fujihara et al., 2010).
- **JUNO** : Est un membre de la famille des récepteurs au Folate (FOLR). Cette famille est constituée de FOLR1 (FR1), FOLR2 (FR2) et FOLR4 (FR4) chez les mammifères, et du FOLR3 (FR1) en plus chez les primates. FOLR1/2/3 lient la vitamine B9 (folate), par un mécanisme identifié. Les structures précises de FR1 et FR2 ont été établies et ont révélé que l'architecture globulaire des FR est stabilisée par de multiples ponts disulfures et reconnaît le folate dans une « poche » (Chen et al., 2013). Le FR4 (JUNO) ne présente pas cette « poche » et ne lie pas le folate (Bianchi, 2014). En revanche, il conserve une structure globulaire stabilisée par de multiples ponts disulfures (Figure 6) (Yamaguchi et al., 2007).

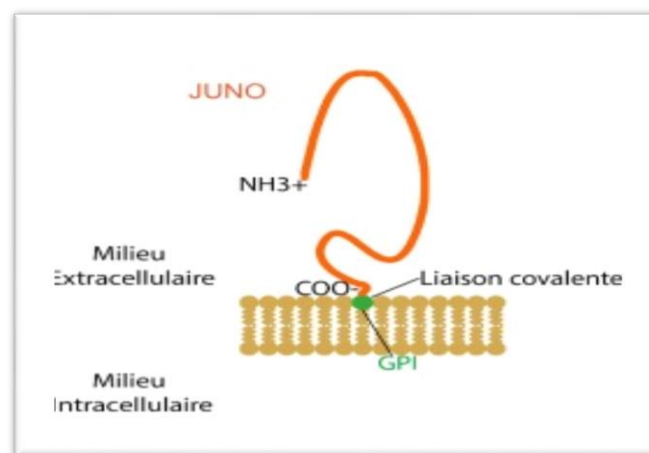


Figure 6: Schéma représentant la structure de JUNO (Bianchi et al., 2014)

JUNO est une GPI-AP localisée sur la membrane de l'ovocyte de plusieurs espèces et notamment la souris et l'homme. On la retrouve également sur un type cellulaire, un sous-groupe de cellules T régulatrices, les T CD4⁺ CD25⁺ chez la souris (**Yamaguchi et al., 2007**). Son rôle sur l'ovocyte n'a été clairement défini que lorsqu'il a été montré qu'elle était le récepteur d'IZUMO1 chez la souris. **Jean et al. (2019)**, ont étudié JUNO sur les ovocytes humains après la mise en évidence de son rôle crucial chez la souris, et ont montré qu'elle était également nécessaire pour la fécondation en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine JUNO humaine.

- **IZUMO 1 (Chapitre 2)**

4 Les étapes de la fécondation

L'interaction entre l'ovocyte et le spermatozoïde fécondant est un événement très spécifique : le spermatozoïde est la seule cellule capable de traverser la ZP et d'atteindre l'espace périvitellin (EPV) (**Allard et al., 2007**).

4.1 Attachement des spermatozoïdes sur la ZP

La membrane plasmique du spermatozoïde se fixe sur la zone pellucide (**Goudet et al., 2008**).

Deux mécanismes non exclusifs sont possiblement impliqués dans l'attachement des spermatozoïdes sur la zone pellucide et le blocage de la polyspermie. La première hypothèse est que les spermatozoïdes s'attachent à des O-glycanes portés par la ZP3 et activent ainsi les glycosidases, et la seconde, que les spermatozoïdes s'attachent au domaine N-terminal de la ZP2 et activent les protéases (**Avella et al., 2013**).

Par ailleurs, plusieurs protéines localisées sur la membrane acrosomique ou la membrane plasmique des spermatozoïdes sont impliquées dans l'attachement des spermatozoïdes à la ZP : β 1,4-galactosyltransférase, fucosyltransférase5, lactadhérines, Angiotensin Converting Enzyme1, dertiline α , acrosine, zonadhésine, spermadhésine, arylsulfatase, Sp56 (**Meslin et al., 2012 ; Avella et al., 2013**). L'attachement sur la zone pellucide pourrait impliquer des interactions récepteur-ligand multiples, avec la formation d'un complexe multimérique de reconnaissance de la ZP. De plus, l'interaction du spermatozoïde avec la zone pellucide serait facilitée par des protéines chaperonnes (**Bromfield et Nixon, 2013**).

4.2 Induction de la réaction acrosomique

L'induction de la réaction acrosomique (RA) permettra au spermatozoïde de traverser la zone pellucide. Seuls les spermatozoïdes capités sont susceptibles de faire cette réaction. La RA

est déclenchée par une interaction espèce-spécifique des molécules de la membrane du spermatozoïde avec les résidus sucrés de la ZP. Chez la souris, la RA est déclenchée par la fixation du spermatozoïde à la glycoprotéine ZPC/ZP3 de la ZP des ovocytes (**Wu et Sampson, 2013**). Cette fixation entraîne la dépolarisation de la membrane du spermatozoïde, laquelle active les protéines G, entraînant une élévation du pH, une activation des phospholipase C et une ouverture des canaux calciques (**Witte et Schafer-Somi, 2007**). Ces événements entraînent la fusion entre la membrane plasmique et la membrane acrosomique externe du spermatozoïde. Des fenestrations au travers de la membrane de l'acrosome se forment provoquant la libération du contenu de l'acrosome et l'exposition de la membrane acrosomique interne face à la ZP (**Allard et al., 2007**).

La RA aboutit au relargage progressif du matériel acrosomal dans l'environnement du spermatozoïde (**Figure 7**). Elle s'accompagne également de la relocalisation de la protéine IZUMO1 vers la région équatoriale de la tête spermatique, étape préalable à la fusion du spermatozoïde et de la membrane ovocytaire. Contrairement au dogme établi suivant lequel le spermatozoïde ne faisait sa RA qu'au contact de la ZP lors de sa liaison à la ZPC/ZP3 (libérant ainsi les enzymes lui permettant de la traverser). Les spermatozoïdes font également leurs RA avant d'atteindre la ZP et elles sont capables de traverser la zone pellucide d'un ovocyte en plusieurs fois (**Jin et al., 2011**). Aucun spermatozoïde avec un acrosome intact n'a été retrouvé dans l'espace périvitellin. La RA est donc bien un prérequis pour cette traversée. Après cette réaction, le spermatozoïde a une durée de vie limitée à quelques heures (**Allard et al., 2007**).

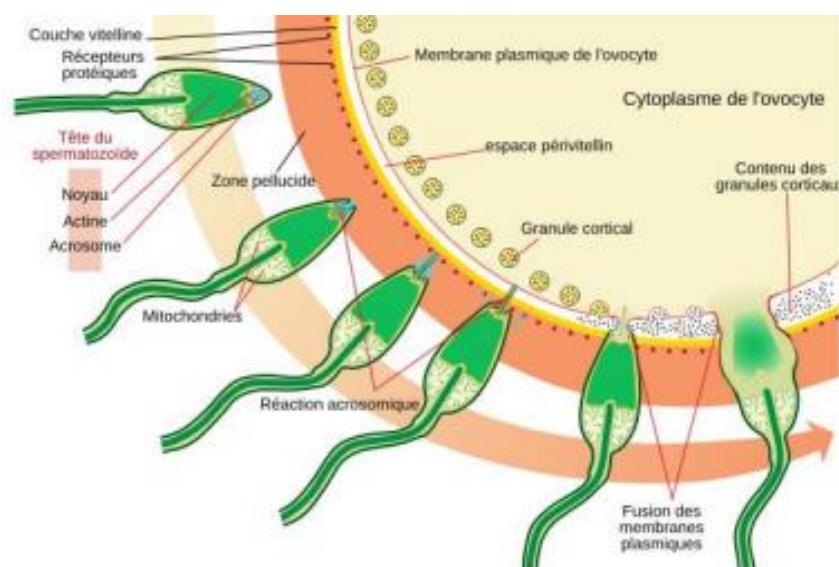


Figure 7: Représentation schématique classique des étapes de la réaction acrosomique (Ladyofhats et al., 2006)

4.3 Pénétration de la zone pellucide

Les mécanismes permettant la traversée de la zone pellucide par un spermatozoïde sont encore mal connus chez les mammifères. Cette traversée pourrait se faire par digestion enzymatique ou/et par la force mécanique des mouvements hyperactifs du spermatozoïde (**Bedford, 2008**).

4.4 Adhésion des gamètes

Après avoir traversé la zone pellucide, le spermatozoïde atteint l'espace périvitellin, puis se recouvre de fragments membranaires provenant de l'ovocyte, en une vingtaine de secondes chez la souris (**Miyado et al., 2000**). Les spermatozoïdes sont donc capables de capter des fragments de membrane ovocytaire et de les intégrer dans leur propre membrane. Ce transfert de matériel membranaire peut se faire grâce à deux mécanismes : la captation d'exosomes (microvésicules provenant des compartiments endosomiques de la cellule et captées à distance d'une cellule à l'autre) et/ou par trogocytose (échange de matériel membranaire nécessitant le contact entre les deux cellules concernées) (**Barraud-Lange et al., 2007**). Bien que la fonction de ce transfert ne soit pas complètement élucidée, il contribue probablement à déclencher la fonction de « fusion membranaire » du spermatozoïde (**Allard et al., 2007**).

Le spermatozoïde va ensuite adhérer à la membrane plasmique de l'ovocyte. De nombreuses molécules sont impliquées dans l'adhésion entre spermatozoïde et ovocyte : IZUMO1, ADAM15, cadhérines, intégrines α et β , tétraspanines CD9, CD81 et CD151 (**Meslin et al., 2012 ; Evans, 2012**). Le spermatozoïde ayant effectué sa RA, sécrète de la vitronectine, laquelle pourrait agir comme un « Velcro » entre les deux molécules d'intégrines $\alpha v \beta 3$, présentes à la fois sur la membrane ovocytaire et sur la membrane spermatique (**Boissonnas et al., 2010**). D'autres molécules sont également impliquées : GPI-AP (Glycosyl Phosphatidyl Inositol-Anchored Proteins), glycolipide qui attache des protéines au feuillet externe des membranes cytoplasmiques, ou les fertilines α (ADAM1) et β (ADAM2). Chez l'homme, le FEEc augmente l'index de fécondation c'est à dire le nombre de spermatozoïdes pénétrant dans des ovocytes humains immatures ou non fécondés dépellucidés (**Allard et al., 2007**).

4.5 Fusion des gamètes

Après l'adhésion du spermatozoïde à la membrane de l'ovocyte, le segment équatorial du spermatozoïde fusionne avec la membrane ovocytaire, et toute ou une partie du spermatozoïde pénètre à l'intérieur de l'ovocyte (**Figure 8**) (**Nixon et al., 2007**). Ce processus met en jeu des familles de molécules différentes de celles impliquées dans l'adhésion. Toutes les protéines ayant un rôle identifié dans la fusion gamétique sont exprimées à la fois sur la membrane

ovocytaire et sur la membrane spermatique, à l'exception d'IZUMO1 qui n'a pas été retrouvée sur l'ovocyte. Les tétraspanines, molécules organisatrices de membrane, jouent un rôle majeur. Chez une souris femelle porteuse d'une délétion du gène de la tétraspanine CD9, les ovocytes voient les spermatozoïdes pénétrer l'espace périvitellin mais la fusion membranaire n'a pas lieu (**Le Naour et al., 2000**).

La fusion dépend également de la protéine IZUMO1, apparentée aux immunoglobulines et indispensable à la capacité fécondante des spermatozoïdes (**Okabe et al., 1987**). En effet, les souris mâles et femelles ayant subi une délétion du gène IZUMO ne présentent comme seule anomalie que l'incapacité des spermatozoïdes à fusionner avec la membrane ovocytaire. (**Meslin et al., 2012**). Lors de la RA, la protéine IZUMO1 est relocalisée de la partie antérieure de la tête spermatique à la région post-acrosomale, zone de fusion avec l'ovocyte. Cette relocalisation apparaît nécessaire à la fusion et fait intervenir la protéine Tssk6, une sérine kinase exprimée après la méiose au cours de la spermatogenèse. Après inactivation de Tssk6, la relocalisation d'IZUMO1 n'a pas lieu, entraînant l'absence de fusion entre spermatozoïde et ovocyte et une stérilité des males Tssk6 $-/-$ (**Sosnik et al., 2009**).

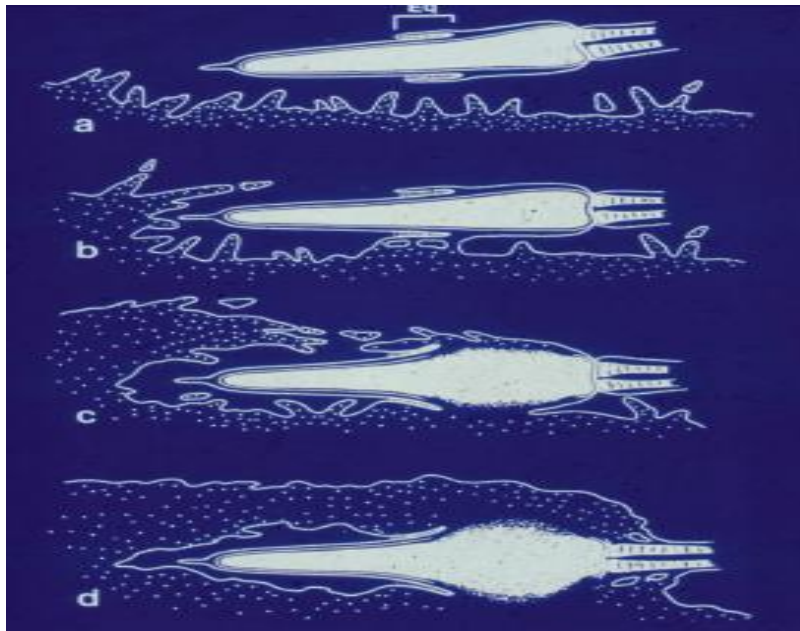


Figure 8: Schéma de la fusion membranaire des gamètes (Yanagimachi, 1978)

a : Le spermatozoïde se trouve dans l'espace périvitellin en regard de la région membranaire de l'ovocyte dotée de microvillosités ; **b** : Le spermatozoïde adhère à la membrane ovocytaire par son segment équatorial ; **c** : La fusion gamétique des membranes commence au niveau de la partie postérieure du segment équatorial ; **d** : La fusion des membranes s'étend de proche

en proche jusqu'à l'incorporation de la tête spermatique dans l'ooplasme. Le flagelle sera également intégré dans le cytoplasme ovocytaire

Chapitre II

1 IZUMO1

IZUMO 1 est une protéine transmembranaire de type1 (**Inoue et al., 2005**), qui se localise dans les membranes acrosomiques interne et externe des spermatozoïdes avant de subir une relocalisation dynamique à la surface cellulaire à la fin d'une réaction acrosomique (**Satouh et al., 2012**).

Les analyses western blot ont indiqué qu'IZUMO n'est exprimée que dans les testicules et est présente sur les spermatozoïdes matures. La protéine a été détectée par immunofluorescence sur des cellules vivantes uniquement après l'exocytose acrosomique, suggérant qu'il s'agit d'une protéine acrosomique transmembranaire, exposée à la surface du sperme après la réaction acrosomique (**Ellerman et al., 2009**).

En plus d'être trouvé chez la souris, IZUMO est présent chez l'homme, et les résultats d'expériences *in vitro* suggèrent que IZUMO joue également un rôle dans la fusion des gamètes humains (**Inoue et al., 2005**)

2 La famille IZUMO

Trois protéines IZUMO2, IZUMO3 et IZUMO4, ont été découvertes ; elles partagent une similarité de séquence locale avec le premier IZUMO découvert, qui a maintenant été renommé IZUMO1. Seul IZUMO4 s'est avérée être exprimée dans les testicules ainsi que dans les tissus non reproducteurs, les autres ont une expression spécifique aux spermatozoïdes/testicules. Bien qu'aucun test d'orthologie et de paralogie n'ait été effectué, des comparaisons de séquences, indiquent que les quatre protéines IZUMO ont huit résidus cystéines conservés au sein d'une région de 144 acides aminés avec quatre hélices α . Cette région de protéine a été nommée le domaine IZUMO (**Grayson et al., 2012 ; Inoue et al., 2013**).

3 Propriétés structurales

IZUMO est constituée de 397 acides aminés avec une grande région extracellulaire, une seule région transmembranaire et une courte queue cytoplasmique C-terminale qui ne semble pas essentielle dans la fécondation (**Inoue et al., 2013 ; Young et al., 2016**). Le domaine extracellulaire de 320 acides aminés, comprend un peptide signal en N-terminal, un domaine immunoglobuline unique de 145 acides aminés comprenant 8 résidus cystéines hautement conservés qui permettraient la formation d'un unique pont disulfure sur lequel un site de N-Glycosylation en position 204 (**Figure 9**) (**Inoue et al., 2005 ; Ellerman et al., 2009 ; Kim et al., 2013**).

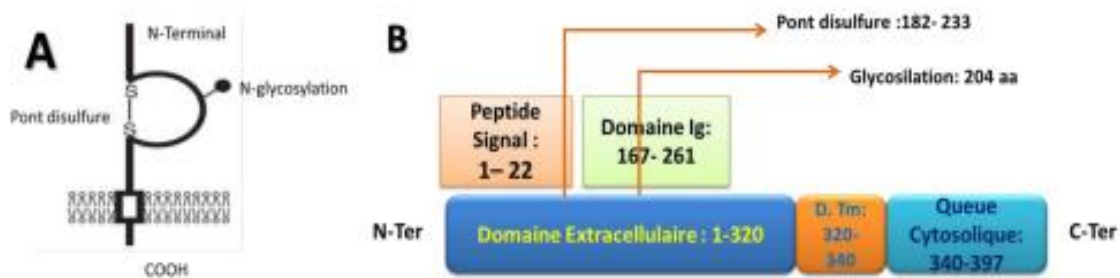


Figure 9: Structure de IZUMO (Inoue et al., 2005)

A : Représentation schématique de IZUMO tel que décrit par l'équipe d'Okabe. *B* : Schéma de la structure primaire d'IZUMO1.

4 Le rôle de IZUMO1 dans l'interaction gamétique

IZUMO1 est une protéine d'adhésion qui génère une adhésion avec l'ovocyte, forte et indispensable, grâce aux liaisons intercellulaires qu'elle forme avec JUNO (Inoue et al., 2013 ; Chalbi et al., 2014 ; Ravaux et al., 2018).

L'équipe d'Okabe confirme le caractère indispensable d'IZUMO1 dans l'interaction gamétique en générant par recombinaison homologue une lignée de souris IZUMO^{-/-}. Les femelles de cette lignée sont normalement fertiles, alors que les males délétés de IZUMO1 sont totalement stériles. En dépit d'un comportement sexuel standard et de spermatozoïdes de morphologie et motilité normales, l'analyse des ovocytes prélevés chez les femelles sauvages 24 heures après accouplement avec un male IZUMO^{-/-}, montre que les spermatozoïdes s'accumulent dans l'espace périvitellin, adhèrent à la membrane ovocytaire mais ne peuvent pas fusionner (Inoue et al., 2005).

Chapitre III

1 La contraception

La contraception est l'acte de prévenir la grossesse. Cela peut être un appareil, un médicament, une procédure ou un comportement (**Sarao et al., 2021**).

2 Contraceptifs hormonaux

2.1 Contraceptifs hormonaux combinés

Les contraceptifs hormonaux combinés (CHC) font partie des types de médicaments les plus couramment prescrits et les plus documentés (**Jones et al., 2012 ; Daniels et al., 2013**). Les œstrogènes et progestatifs synthétiques ont révolutionné la planification familiale moderne lorsque cette combinaison est apparue pour la première fois sur le marché sous forme de pilule en 1960. Aujourd'hui, les CHC peuvent être administrés par le biais d'une pilule, d'un spatch ou d'un anneau vaginal avec des taux d'échec similaires : moins de 1% avec une parfaite utilisation et 7% à 9% avec une utilisation typique (**Lopez et al., 2013 ; Chabbert-Buffet et al., 2017 ; Hatcher et al., 2018**)

Dans les CHC, les progestatifs et les œstrogènes inhibent l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien, qui contrôle le cycle de reproduction. Les progestatifs préviennent la grossesse en inhibant la poussée de l'hormone lutéinisante (LH), supprimant ainsi l'ovulation, épaississant la glaire cervicale, diminuant la motilité des trompes de Fallope et provoquant l'atrophie de l'endomètre (**Murphy et al., 2013**). Les œstrogènes préviennent la grossesse en supprimant la production de l'hormone folliculo-stimulante (FSH), qui empêche le développement d'un follicule dominant. Le progestatif est responsable de la majorité de l'action contraceptive et des effets secondaires ; l'ajout d'œstrogène aide à prévenir les saignements irréguliers ou imprévus (**Hatcher et al., 2018**).

2.2 Méthodes progestatives

Elles comprennent les pilules, les injections, les implants et les dispositifs intra-utérins (DIU). Sans œstrogènes concomitants, les méthodes progestatives présentent moins de risque de thromboembolie veineuse que les CHC (**Britton et al., 2020**).

3 Contraceptifs non hormonaux

Les méthodes non hormonales comprennent le diaphragme intra-utérine (DIU) au cuivre, les méthodes de barrière avec et sans spermicides et les méthodes comportementales. Les méthodes non hormonales présentent généralement moins de risques et d'effets secondaires car, par définition, elles n'impliquent pas d'exposition à des hormones exogènes ou synthétiques.

Comme pour les méthodes hormonales, l'efficacité, la sécurité et la facilité d'utilisation de diverses méthodes non hormonales sont des considérations importantes pour l'utilisateur et influenceront fortement les choix individuels (**Britton et al., 2020**).

La méthode non hormonale réversible la plus efficace est le DIU au cuivre, qui a un taux d'échec inférieur à 1% avec une utilisation à la fois typique et parfaite ; l'appareil peut être utilisé jusqu'à 10 ans et doit être inséré par un prestataire qualifié (**Hatcher et al., 2018 ; Copper, 2019**). Les ions cuivre sont spermicides. Le DIU au cuivre n'affecte pas l'ovulation ou le moment du cycle menstruel (**Hall et al., 2016**)

Les méthodes barrières sans spermicides, comprennent les préservatifs et les diaphragmes utilisés au moment des rapports sexuels. L'efficacité dépend fortement du comportement de l'utilisateur, et les taux d'échec avec une utilisation typique et parfaite varient considérablement. Pour le préservatif masculin, les taux d'échec avec une utilisation typique et parfaite sont respectivement de 13% et 2% ; pour le préservatif féminin, 21% et 5% respectivement ; et pour le diaphragme, 17% et 16% respectivement (**Hatcher et al., 2018**)

Les diaphragmes sont insérés dans le canal vaginal de manière à bloquer l'orifice cervical et peuvent être placés jusqu'à une heure avant le rapport sexuel. Les diaphragmes sont utilisés avec un spermicide pour augmenter leur efficacité (**Curtis et al., 2016**).

4 Méthodes comportementales

Elles comprennent le sevrage, l'aménorrhée de lactation et les méthodes basées sur la connaissance de la fécondité. Le retrait (souvent appelé « extraction ») consiste à retirer le pénis du canal vaginal pendant les rapports sexuels mais avant l'éjaculation. Les taux d'échec sont de 20% avec une utilisation parfaite (**Hatcher et al., 2018**). Il est couramment utilisé en conjonction avec d'autres méthodes et peut ne pas être considéré comme une « vraie » méthode, son utilisation peut être sous-déclarée (**Jones et al., 2014**).

La méthode de l'allaitement et l'aménorrhée repose sur la suppression naturelle du pic de l'hormone lutéinisante qui se produit pendant l'allaitement exclusif. Elle est très efficace lorsque les nourrissons sont exclusivement nourris au lait maternel à la demande, lorsque la femme n'a pas encore repris ses règles. Si l'allaitement n'est pas exclusif ou si le nourrisson a plus de six mois, l'efficacité diminue (**Murphy, 2013**).

Les FABM (Fertility Awareness Based Method) impliquent d'éviter les rapports sexuels non protégés pendant une fenêtre fertile estimée, qui est déterminée par une variété de stratégies

d'efficacité variable. Il existe des données limitées sur les taux d'échec pour chaque approche (**Peragallo et al., 2018**) ; mais collectivement, les FABM semblent avoir des taux d'échec de 15% avec une utilisation typique et de 0.4% à 5% avec une utilisation parfaite (**Hatcher et al., 2018**). Ces méthodes peuvent impliquer le suivi du cycle menstruel, de la température basale du corps, de la glaire cervicale ou des niveaux de LH afin de calculer la période fertile probable. Au milieu du cycle, la poussée de LH précédant l'ovulation est suivie d'une augmentation de la progestérone, provoquant une augmentation faible mais mesurable de la température basale du corps (**Johnson et al., 2018**).

Chapitre IV

1 Le docking moléculaire

Appelé aussi ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire, vise à prédire la structure et tous les mécanismes et interactions impliqués dans le processus de formation des complexes moléculaires « ligand-protéine » ou « protéine-protéine » à partir des molécules isolées. Cette approche dite *in silico*, est plus facile à réaliser, moins chère, et plus rapide que d'utiliser des méthodes *in vitro*. L'amarrage moléculaire permet la découverte de nouvelles molécules (par assemblage de deux ou plusieurs molécules), ou comprendre les propriétés des complexes moléculaires obtenues par cristallographie (**Lgaz et al., 2019**)

2 Principe du docking moléculaire

L'amarrage décrit le processus de placement de molécules (ligands) sur des sites actifs de la protéine cible dans l'espace tridimensionnel (3D). Deux aspects sont importants : prédiction de l'affinité du complexe « ligand-protéine » et prédiction de la position correcte (le ligand pénètre dans le site actif de la protéine). La prédiction d'affinité est liée à différents ligands parmi les collections, certaines sont plus appropriées que d'autres (**Schulz et al, 2004 ; Wang et al, 2004**)

3 Etapes du docking

Le processus de docking moléculaire implique deux étapes fondamentales qui sont le docking et le scoring.

- Le docking utilise des algorithmes pour la prédiction de la conformation du ligand ainsi que sa position et son orientation dans le site actif de la protéine (généralement appelés pose).
- Le scoring est l'évaluation de l'affinité de liaison entre le ligand et le récepteur. Il donne un score aux poses obtenues lors de la phase de docking (**Kitchen et al., 2004**).

4 Applications du docking moléculaire

La plus ancienne des applications est la prédiction du mode d'interaction et la plus récente consiste en l'optimisation des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur. L'interaction entre une petite molécule et une protéine enzymatique peut entraîner l'activation ou l'inhibition d'une enzyme. Si la protéine est un récepteur, la liaison du ligand peut entraîner un effet agoniste ou antagoniste. L'amarrage est le plus souvent utilisé dans le domaine de la conception de médicaments. La plupart des médicaments sont des molécules biologiques et l'amarrage peut être demandé pour :

- **L'identification des hits** : l'amarrage combiné avec une fonction de score peut être utilisé pour filtrer rapidement des bases de données de médicaments potentiels *in silico* pour identifier les molécules susceptibles de se lier à la protéine cible ;
- **L'optimisation des hits** : l'amarrage peut être utilisé pour prévoir l'orientation relative avec laquelle un ligand se lie à une protéine (c'est-à-dire le mode de liaison ou la pose). Cette information peut à son tour être utilisée pour concevoir des analogues puissants et sélectifs ;
- **La bioremédiation** : la fixation de ligand protéique peut également être utilisée pour prévoir les polluants qui peuvent être dégradés par les enzymes (**Gaba et al., 2010**).

Matériels et Méthodes

1 Logiciels et banques de données utilisés

- **PDB** (<https://www.rcsb.org/>) est la banque de données protéiques (Protein Data Bank), principale source de données de biologie structurale. Elle permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont principalement déterminées par deux méthodes : la cristallographie à rayons X et la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) (**Sthal et Rarey, 2001**).
- **ZINC** (<https://www.zinc.docking.org/>) est une ressource publique gratuite pour la découverte de ligands. La base de données contient plus de 20 millions de molécules disponibles dans le commerce dans des représentations biologiquement pertinentes qui peuvent être téléchargées dans des formats et sous-ensemble populaires prêts à l'emploi (**Sterling et Irwin, 2015**).
- **PyRex** est un logiciel libre, doté d'une interface utilisateur intuitive et fonctionnant sur tous les principaux systèmes d'exploitation (Linux, Windows et Mac OS) (**Dallakyan et Olson, 2014**).
- **Chimera** ou UCSF Chimera, est un programme pour la visualisation et l'analyse interactives des structures moléculaires et des données associées, conçu pour être utilisé par les biologistes structurels, les chercheurs biomédicaux et autres personnes intéressées par la structure et la fonction moléculaires. Chimera est une application de bureau dont les racines sont principalement dans l'analyse visuelle interactive (**Huang et al., 2014**).
- **PubChem** est une base de données chimique publique qui sert les communautés scientifiques ainsi que le grand public. Cette base de données collecte des informations chimiques à partir de centaines de sources de données et les organise en plusieurs collections de données, notamment Substance, Composé, BioAssay, Protein, Gene, Pathway et Patent. Ces collections sont liées les unes aux autres, permettant aux utilisateurs de découvrir des enregistrements connexes dans les diverses collections (des médicaments ciblant une protéine ou des gènes modulés par un produit chimique) (**Sungwan, 2021**).
- **Discovery Studio** : est un logiciel de solutions de conception moléculaire biologique pour les chimistes et les biologistes computationnels et facilite l'examen des propriétés des petites et grandes molécules. De plus, des meilleurs algorithmes de visualisation à 3D des interactions qui résultent par des stimulations de docking (**Seeliger et al., 2010**).

2 Méthodes

2.1 Préparation des molécules au docking

2.1.1 Récepteur

Premièrement, nous allons à la PDB pour télécharger le récepteur. IZUMO est disponible dans la banque, répertorié sous le code 5JK9. Il s'agit de l'extrémité C-terminale d'IZUMO s'étendant de l'acide aminé 148 à 160, déterminée par cristallographie à rayons X.

La **figure 10**, représente la structure 3D de la chaîne a de IZUMO, contenant l'extrémité C-terminale.

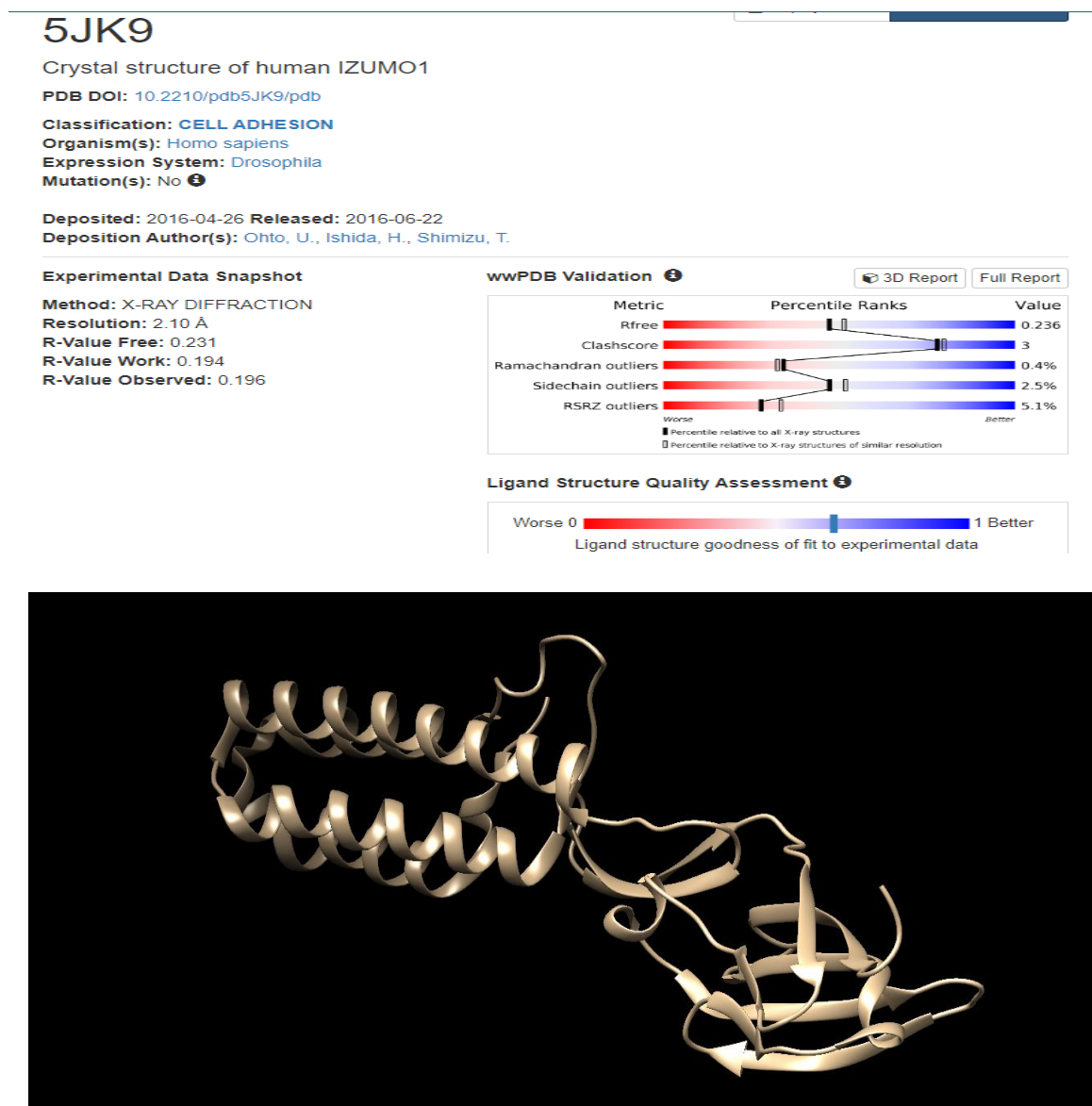


Figure 10: Structure 3D de la protéine chaîne a de IZUMO1

2.1.2 Ligand

Les structures des ligands sont obtenues à partir du site PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

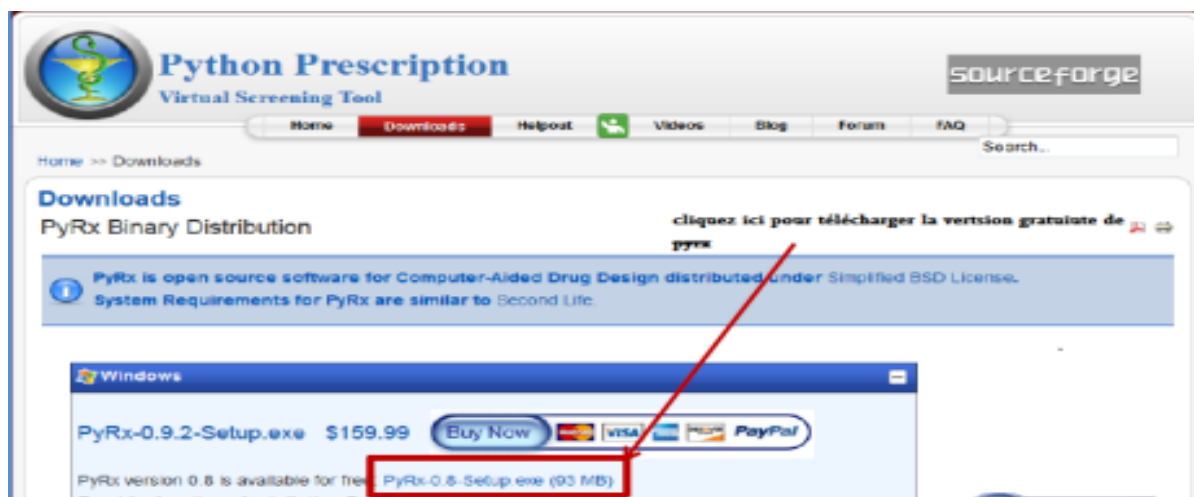
Pour télécharger les molécules FDA (Food and Drugs Administration), nous suivons les étapes suivantes :

- 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.

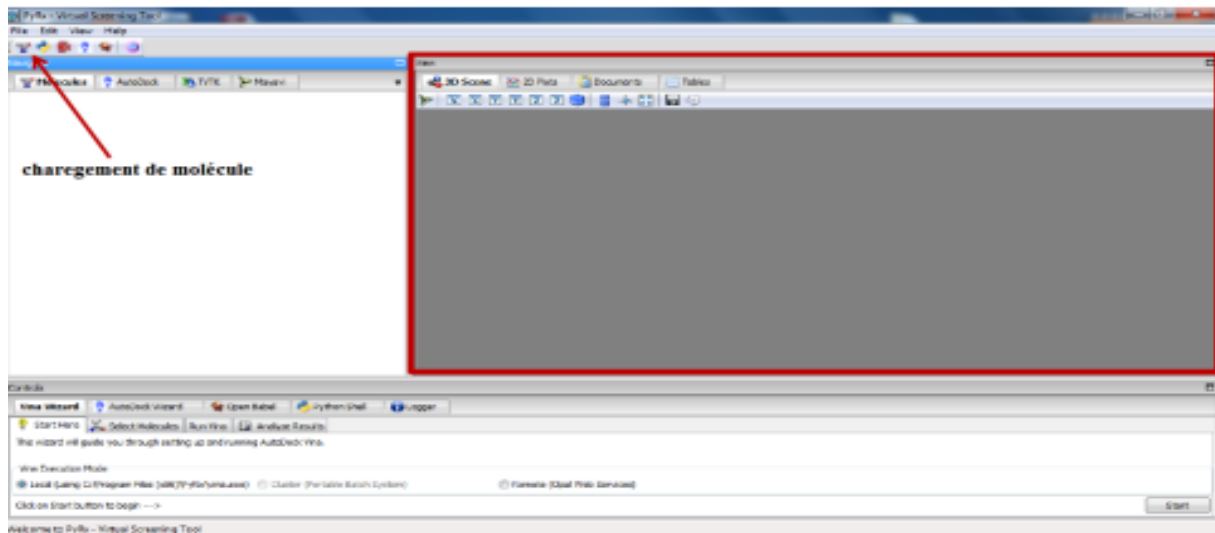
2.2 Docking moléculaire

Le docking moléculaire sur PyRx se déroule selon les étapes suivantes :

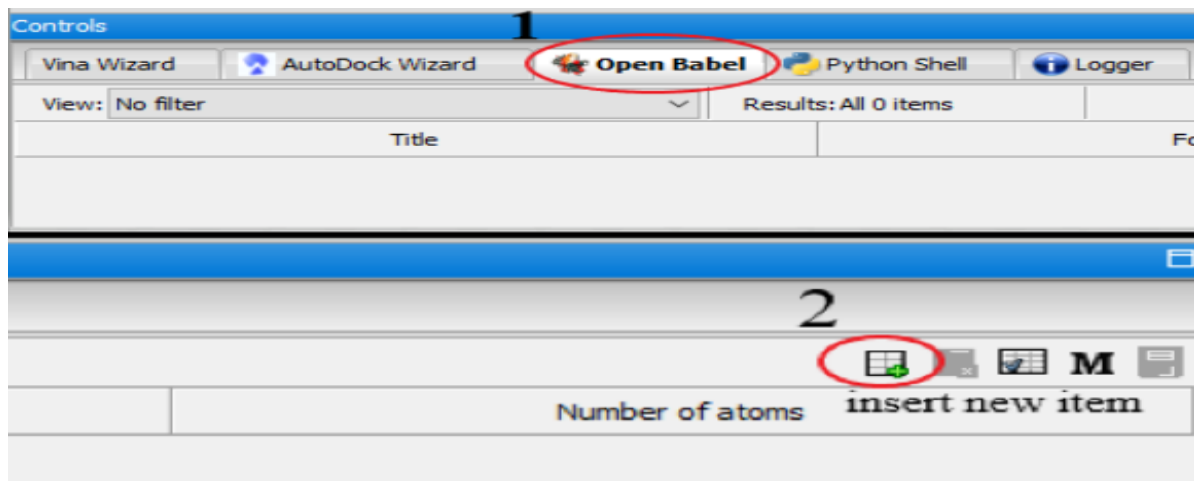
- Télécharger PyRx : <http://pyrx.sourceforge.net/downloads>



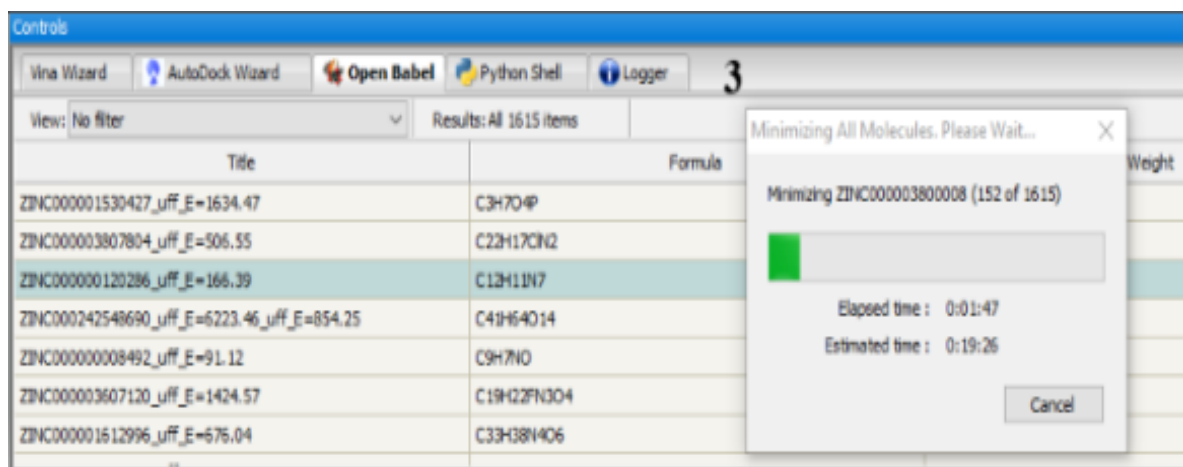
- Chargement des molécules dans l'espace de travail PyRx.
- Cliquer sur File puis sur Load Molecule et sélectionner le fichier 5JK9.



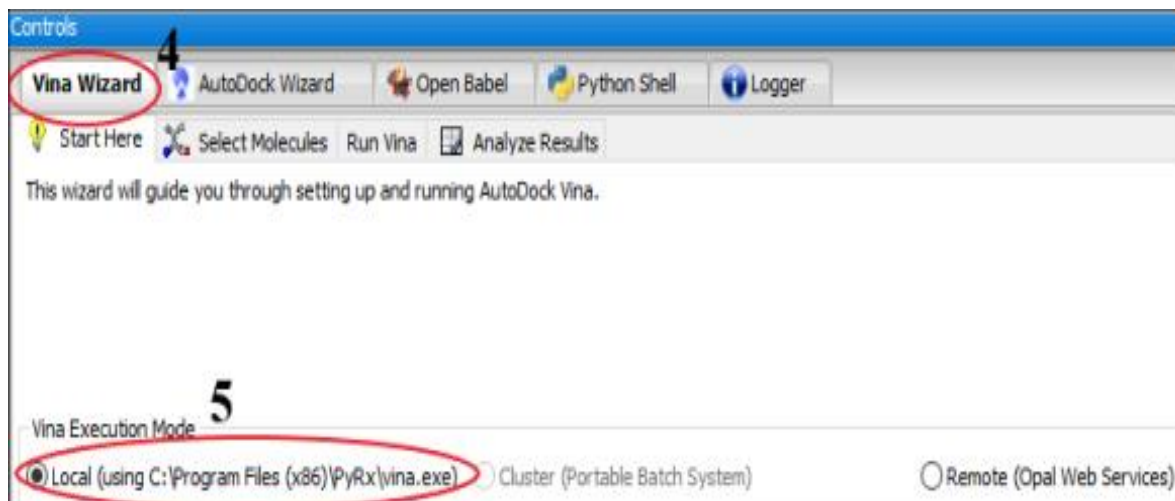
- Cliquer sur Open Babel/insert new item/ sélectionner la base de données FDA



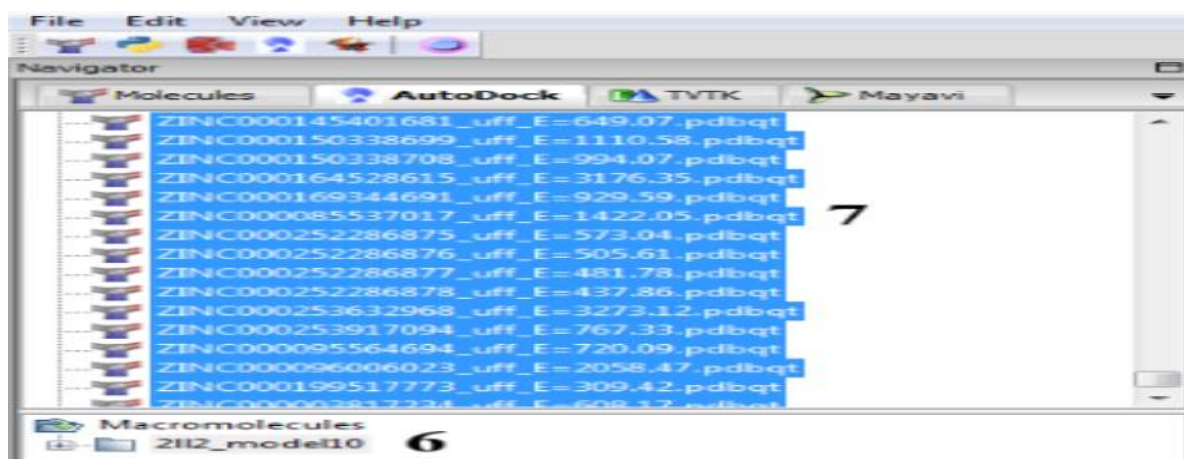
- Cliquer droit et sélectionner Minimize All.



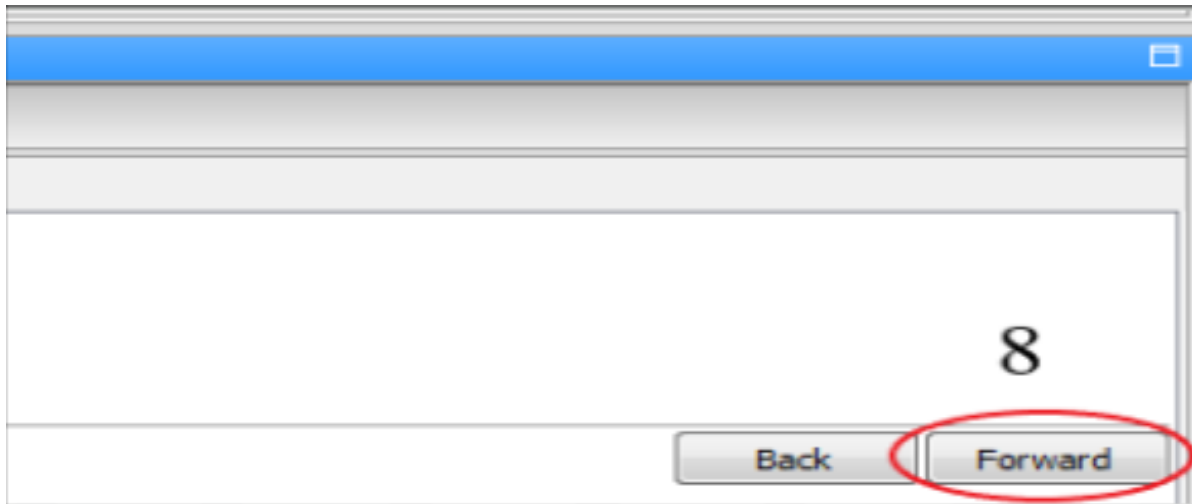
- Cliquer Vina Wizard → sélectionner Local /start /Add Macromolecule →sélectionner 5JK9.



- 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/et en fin sur forward.



Ensuite, on transforme le fichier de minimisation pdb en pdb.qt pour entrer dans un le programme Chimera.

Le docking moléculaire se poursuit sur Chimera selon les étapes suivantes :

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

UCSF CHIMERA
an Extensible Molecular Modeling System

Download Chimera

- Daily Builds
- Snapshot Releases
- Unsupported Releases
- Old Releases
- Bug Tracking System
- Licensing Information
- Experimental Chimera Features
- Plug-ins on the Web
- Graphics Driver Bugs
- Benchmark Results
- Chimera Source Code
- Cygwin Source Code

Tip: We recommend [ChimeraX](#) for higher performance and [many new features](#) instead of legacy Chimera.

Current Production Releases

- See the [release notes](#) for a list of new features and other information.

- Préparer les stimulations de docking : ouvrir avec UCSF Chimera la structure pdb du récepteur (IZUMO) puis les ligands, les structures de ces derniers sont téléchargé de ZINC (docking.org) sous forme SDF.

ZINC1612996 (Irinotecan)

In: aggregators anodyne bb fda for-sale in-stock natural-products
Google Wikipedia PubMed

Added	Availability	Since	Mwt	logP	Download
2005-10-18	In-Stock	2015-08-07	586.689	4.091	Download

Moi Formula Rings Heavy Atoms Hetero Atoms Fraction

C33H38N4O6 7 43 10 0.52

SMILES CCc1c2c(nc3ccc(OC(=O)N4CCC(N5CCCC5)CC4)cc13)-c1cc3c(c(=O)n1C2)COC(=O)C@

InChI InChI=1S/C33H38N4O6/c1-3-22-23-16-21(43-32(40)36-14-10-20(11-15-36)35-12-6-5-7-13-35)8-9-27(23)34-29-24(22)

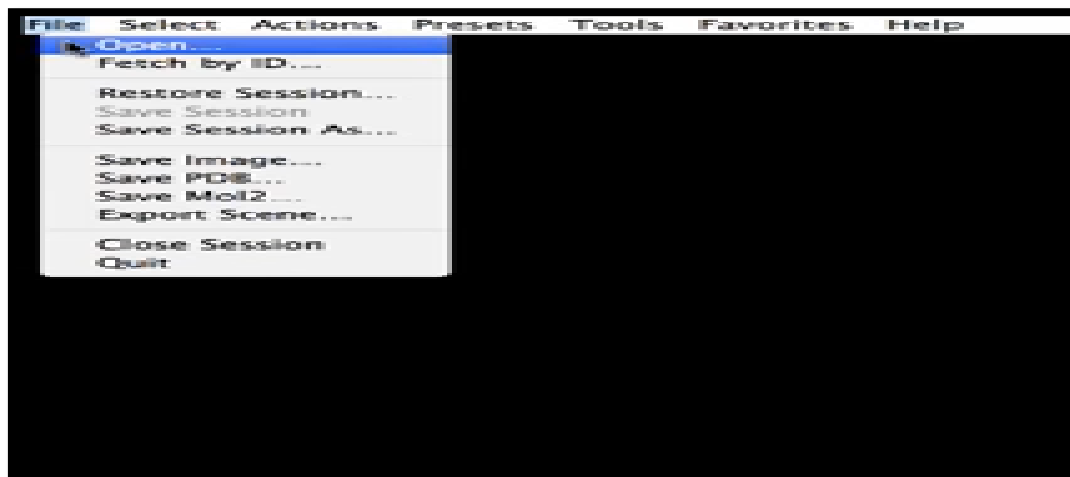
InChI Key UWKQSNFNGGAFS-XIFFEERXSA-N

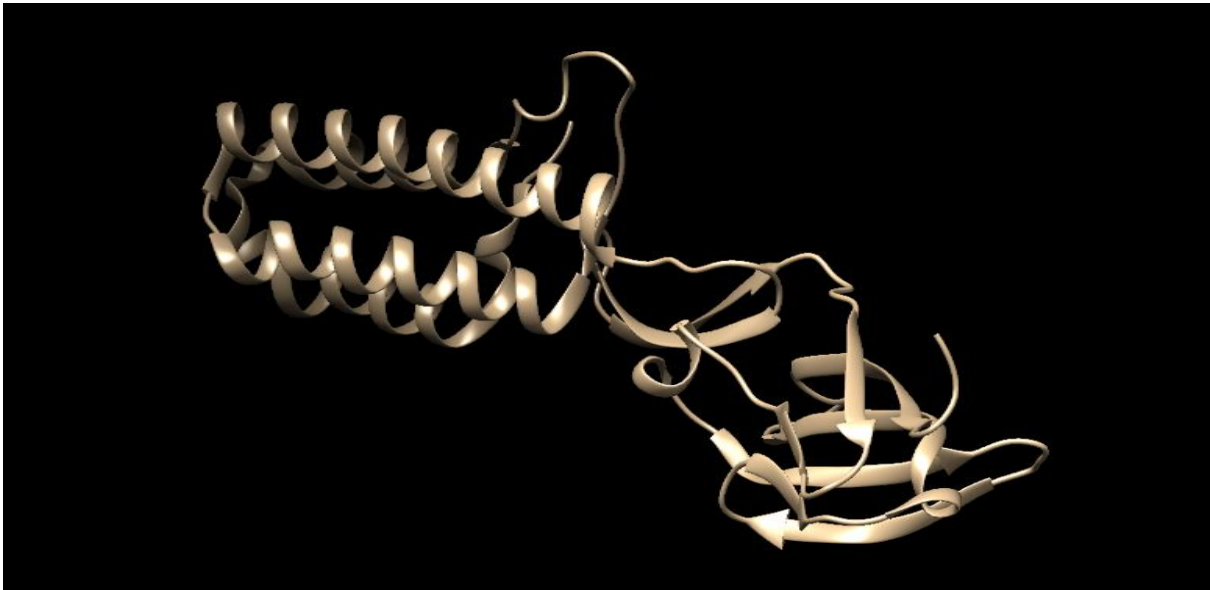
Available 3D Representations

pH.range Net charge H-bond donors H-bond acceptors tPSA Rotatable bonds Apolar desolvation Polar desolvation Download

2.2.1 Préparation du récepteur

- Cliquer sur File puis Open pour ouvrir le fichier 5JK9



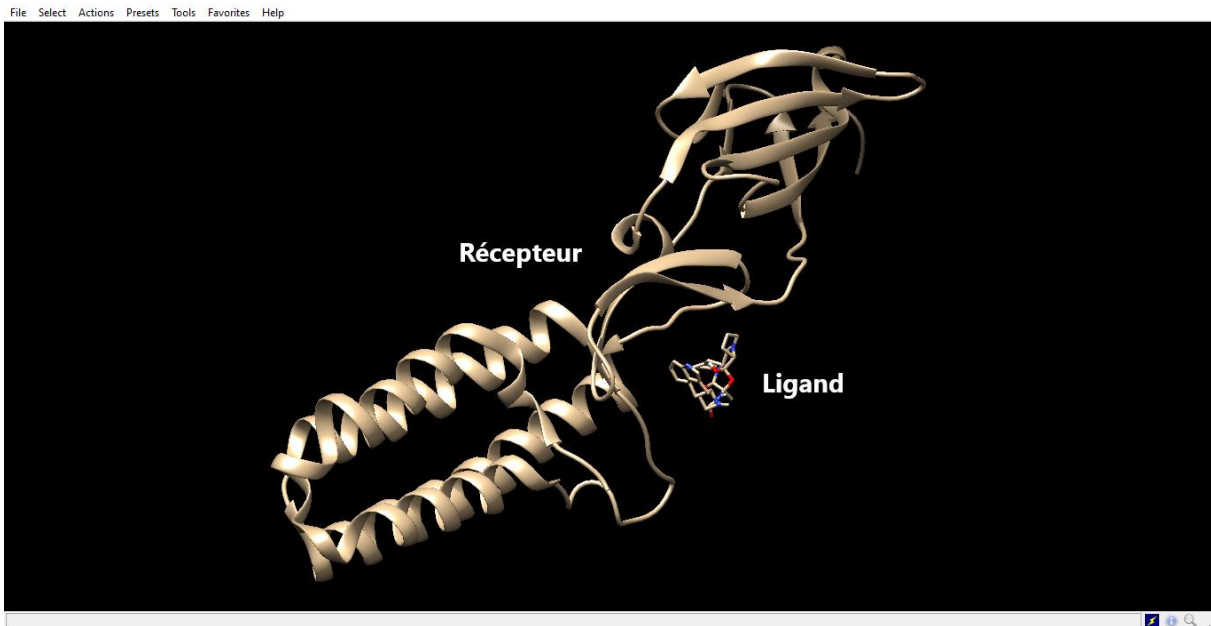


- Cliquer sur Tools puis sur Surface/Binding Analysis / Dock prep.
- Dans Dock prep sélectionner toute les options sauf « Delete non-complexed » et « WriteMol2 file » / cliquer sur OK/OK/OK



2.2.2 Préparation du ligand

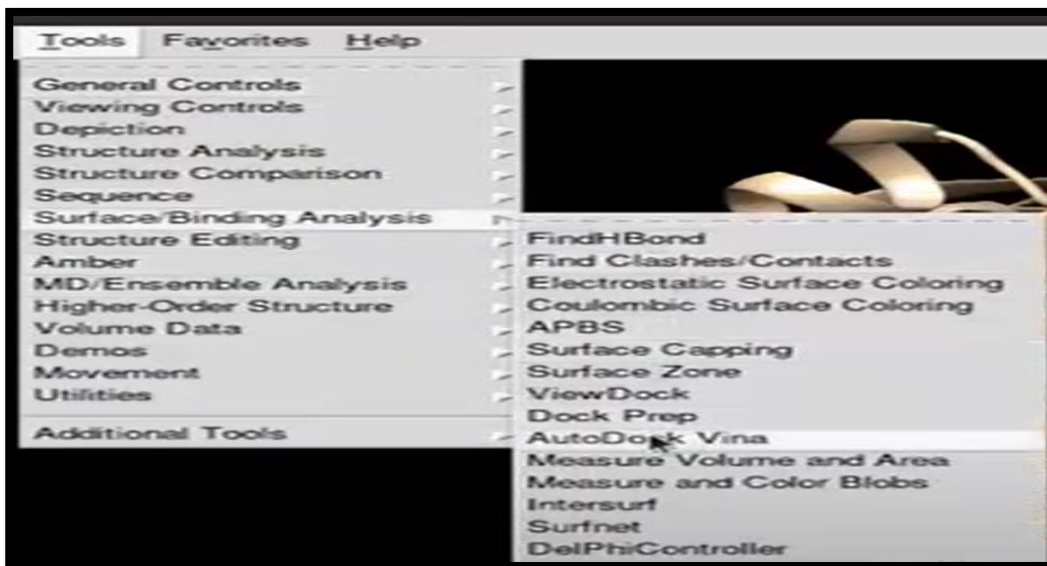
- Cliquer sur File puis Open/ On commence par ouvrir le premier ligand.



▪ 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 Brose, nommer le complexe/ puis sélectionner le récepteur et le ligand /, et cliquer sur button 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 le mouvement de la boîte de docking nous cochoons sur Resize.
- Ensuite cliquer sur Ok/ running.

L'amarrage moléculaire a maintenant commencé et une fois l'analyse terminée, l'interface « View Dock » est ouverte et le tableau de score ΔG apparaît.

Enfin, pour enregistrer les fichiers obtenus, cliquer sur file/save pdb/cocher le récepteur et le ligand (3.1) en cliquant sur cntrl /insérer le code de ligand dans file name /Save.

On recommence toutes ces étapes pour les autres ligands

Résultats
Et
Discussion

IZUMO1 est une protéine spermatique clé dans la fécondation, qui génère une adhésion avec l'ovocyte, forte et indispensable, grâce aux liaisons intercellulaires qu'elle forme avec JUNO, son partenaire ovocytaire. Dans le but de cibler cette protéine, en vue d'une approche de contraception non hormonale, nous avons entrepris une étude par docking moléculaire pour identifier des inhibiteurs d'IZUMO1 parmi des molécules pharmaceutiques connues et utilisées.

1 Criblage moléculaire

Le screening moléculaire par PyRx a permis de ressortir 1615 molécules susceptibles de cibler IZUMO1 en interagissant avec son extrémité C-terminale. Les meilleurs scores selon l'énergie de liaison ΔG sont donnés dans le **tableau 1**.

Le ΔG ou enthalpie libre ou encore énergie libre de Gibbs, est une fonction d'état introduite par Willard Gibbs. Elle correspond à l'énergie disponible dans une réaction pour effectuer un travail utile (Reichle, 2020).

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

Ligands	Zinc Code	ΔG (kcal/ml)
Paritaprevir	203757351	-9.5
Irinotecan	1612996	-8.8
Ergotamine	52955754	-8.8
Naldemedine	100378061	-8.7
Simeprevir	253632968	-8.6
Nilotinib	6716957	-8.5
Dihydroergotamine	3978005	-8.5

2 Docking moléculaire

Nous avons ensuite soumis les molécules retenues lors du screening au docking par Chimera. (tableau 2)

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

Ligands	Zinc Code	ΔG (kcal/ml)
Paritaprevir	203757351	-7.6
Nilotinib	6716957	-7.6
Ergotamine	52955754	-7.5
Irinotecan	1612996	-7.3
Naldemedine	100378061	-7.2
Simeprevir	253632968	-7.1
Dihydroergotamine	3978005	-7.1

- Toutes ces molécules, sont répertoriés dans la banque FDA. Elles appartiennent a des classes pharmaceutiques différentes :
- Paritaprévir est un agent antiviral à action directe destiné à être utilisé dans le cadre d'un traitement multi médicamenteux contre l'infection par le virus de de l'hépatique C. Le Paritapévire est contre indiqué chez les patients présentant une insuffisance hépatique sévère en raison du risque de toxicité. Parmi les effets indésirables liés au Paritaprevir, on peut citer l'anémie sévère, une diminution de l'hémoglobiline, une élévation de la bilirubine, prurit et asthénie. (**Dennis et al., 2015**).
- Nilotinib est une anti-tyrosine kinase de deuxième génération indiquée dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques en phase chronique ou accélérée (**Swadogo et al., 2014**). Les effets secondaires associés a la Naldemedine sont la thrombocytopenie, la myalgie, les céphalées. L'utilisation à long terme du Nilotonib présente une toxicité cardiovasculaire (**Wang et al., 2021**).
- Ergotamine est utilisée en pratique clinique pour le traitement de la migraine aiguë. Le traitement par l'Ergotamine peut provoquer des douleurs musculaires parfois sévères, un changement de la pression artérielle, une dépression myocardique, une vasoconstriction coronarienne, une vasoconstriction périphérique (**Goadsby et al., 2000**).
- Irinotecan est un inhibiteur de l'ADN topoiomérase 1 et est utilisé en tant qu'agent chimiothérapeutique crucial. Il est largement utilisé seul ou en association contre diverses tumeurs solides, en particulier pour le traitement du cancer colorectal métastatique. L'administration à long terme ou à forte dose de l'Irinotecan peut altérer le parenchyme hépatique, entraînant ainsi une hépato toxicité. Elle peut aussi augmenter le risque de

morbidité et de mortalité chez les patients atteints de CRCLM (cancer colorectal métastatique) (**Han et al., 2021**).

- Naldemedine est un antagoniste des opioïdes approuvé pour le traitement de l'OCI (constipation induite par les opoïdes) chez les adultes souffrant de douleur chronique non cancéreuse. Le Naldemedine provoque souvent nausées, diarrhées, vomissements, douleurs abdominales et la sensation de froid. (**Baker, 2017**).
- Simeprevir est un inhibiteur de la protéase du virus de l'hépatite C (VHC) de deuxième génération. Il a récemment été approuvé pour le traitement de l'hépatite C chronique de génotype 1. Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés associés aux schémas thérapeutiques contenant du Simeprevir comprennent la fatigue, les maux de tête et les nausées (**Izquierdo et al., 2014**).
- Dihydroergotamine est efficace pour le traitement de la migraine aiguë même chez les patients souffrant de migraine difficile à traiter. Les principaux effets indésirables de la Dihydroergotamine sont les étourdissements, les maux de tête, les nausées, les vomissements et la diarrhée (**Stephen et al., 2020**).

Il apparaît clairement d'après ce listing que toutes ces molécules ne peuvent pas être envisagées comme médicaments ciblant IZUMO1 dans le cadre d'une thérapie hormonale en raison de leurs effets secondaires plus ou moins graves. C'est pourquoi, pour le reste des analyses, nous n'avons retenu que trois d'entre elles : la Naldemedine, la Simeprevir et Dihydroergotamine ; en raison de leurs effets indésirables mineurs.

Comme le montrent les digrammes 2D, les trois molécules engagent, chacune un grand nombre de liaisons.

Entre la Naldemedine et IZUMO1, nous pouvons recenser :

- 2 liaisons hydrogènes formées entre N –ter de la Naldemedine et les résidus Lysine en position 131 et histidine en position 157 du C-ter de 5KJ9 (**figure 11**). 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 (**Élie, 2004**)

- 2 liaisons pi alcaline entre le ligand et le résidu Lysine en position 138, arginine en position 160 du récepteur 5JK9 (**figure 11**). La liaison pi alcaline est une liaison chimique covalente qui est créé entre deux atomes (**Allen et al., 2001**).
- Une liaison pi-pi empilée (empilement pi) entre le ligand et l'acide aminé histidine en position 157 de 5JK9 (**figure 11**).
- 3 liaisons carbone- hydrogène entre glutamine en position 130, tyrosine en position 134 et lysine en position 161 et le récepteur 5JK9 (**figure 11**)

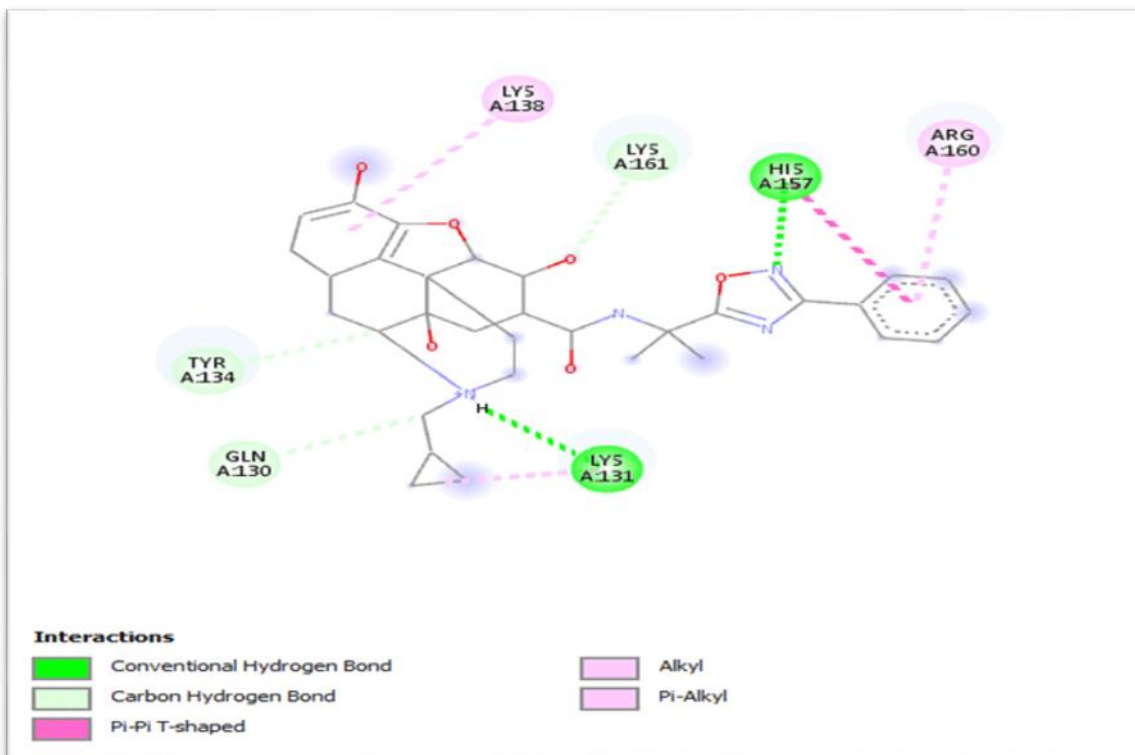


Figure 11: Digramme 2D de l'interaction Naldemedine-IZUMO1

L'interaction IZUMO-Dihydroergotamine engage :

Nous remarquons :

- Une liaison hydrogènes formée entre N –ter de la Dihydroergotamine et les résidus lysine en position 161 du C-terminal de 5JK9 (**figure 12**).

- 6 liaisons pi alcaline entre le ligand et le résidu tyrosine en position 134, valine en position 77 et méthionine en position 75, cystéine en position 185, histidine en position 157, tryptophane en position 145 du récepteur 5JK9 (**figure 12**).
- Une liaison pi-cation entre le ligand et le résidu lysine en position 161 du récepteur 5JK9 (**figure 12**).
- Une liaison carbone-hydrogène formées entre le Dihydroergotamine et le résidu arginine en position 160 du 5JK9 (**figure12**).

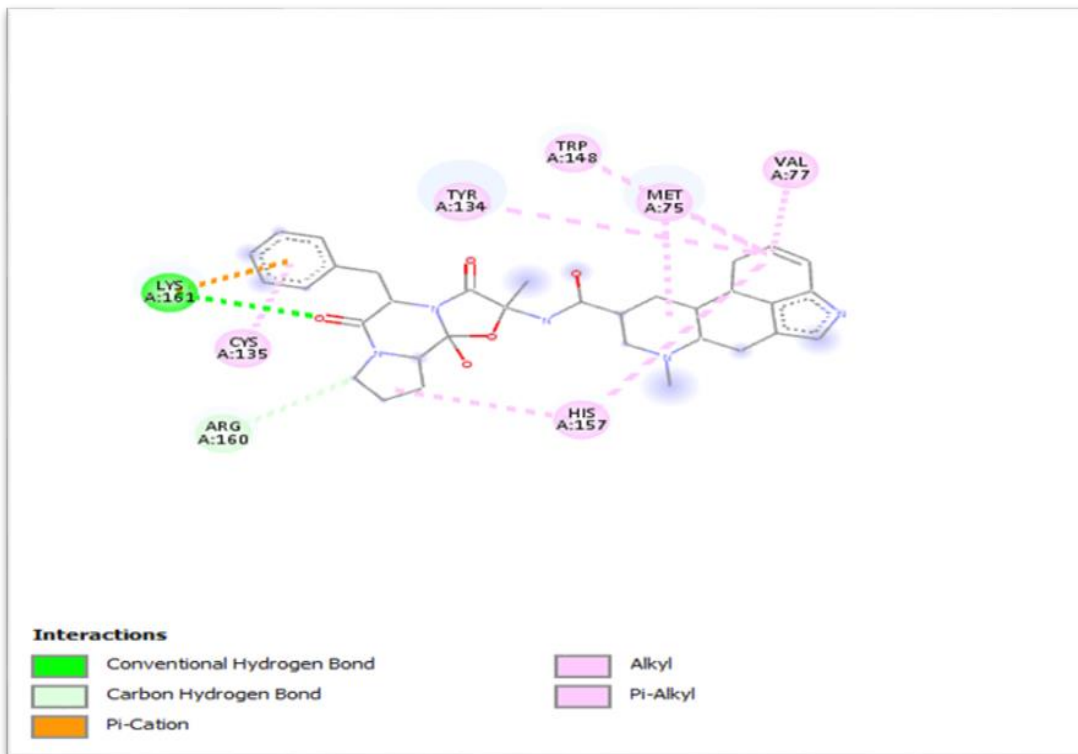


Figure 12: Digramme 2D de l'interaction Dihydroergotamine-IZUMO1

D'après la figure 13, le complexe Simeprevir-IZUMO1, présente :

- Deux liaisons hydrogènes formées entre N –ter de la Simeprevir et les résidus arginine en position 160 et lysine en position 161 du C-terminal de 5JK9 (**figure 13**). 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 (**Élie, 2004**)
- Une liaison alkyl entre le ligand et le résidu cystéine en position 135 du récepteur 5JK9 (**figure 13**).

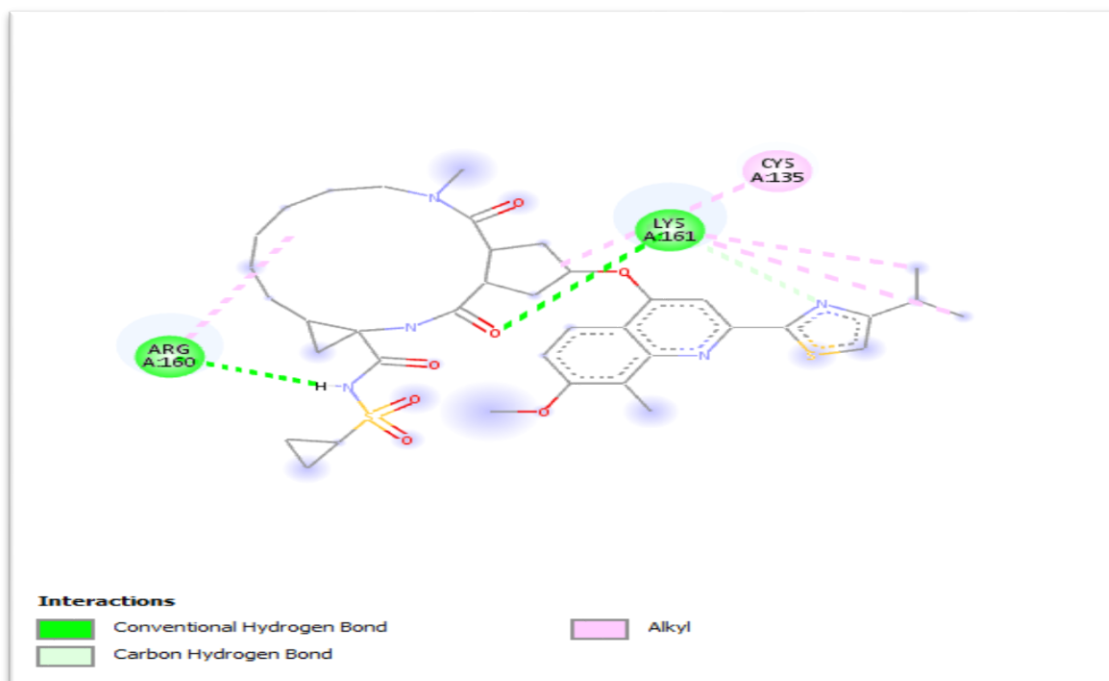


Figure 13: Digramme 2D de l'interaction Simeprevir-IZUMO1

CONCLUSION

Par une approche *in silico*, nous avons identifié 1615 molécules approuvées par la FDA et susceptibles d'interagir avec IZUMO1. Nous en avons retenu trois, la Naldemedine, un antiopioïde utilisé dans le traitement des constipations chroniques, la Dihydroergotamine, un médicament dérivé de l'ergot de seigle principalement utilisé dans le traitement de la migraine, et la Simeprevir, un inhibiteur de la protéase NS3/4A du virus de l'hépatite C chronique de génotype 1 et 4. Ces molécules, ont été sélectionnées d'une part à cause de leur affinité de liaison élevée avec IZUMO1 et d'autre part en raison de leurs effets secondaires mineures.

La Naldemedine, la Dihydroergotamine et la Simeprevir s'avèrent des candidats potentiels pour un repositionnement dans le cadre d'une contraception non hormonale ciblant IZUMO1. Cependant, des analyses de simulation moléculaire restent indispensables pour déterminer la stabilité de cette interaction au cours du temps. Toutefois, seuls des tests *in vivo*, pourraient confirmer ou infirmer cette interaction et potentiellement l'effet inhibiteur de la fécondation par ces molécules.

Références Bibliographiques

A

Alfieri J.A, Martin A.D, Takeda J, Kondoh G, Myles D.G, and Primakoff (2003). Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *Journal of cell science*; 116:2149-2155.

Avella M.A, Xiong B, Dean J (2013). The molecular basis of gamete recognition in mice and human; *Mol. Hum. Reprod.* 19:279-289.

Allingham, Floraino B (2021). Diversité génétique du couple protéines-recepteur IZUMO1-JUNO impliqué dans la reproduction humaine. *Plos one* ; 16(12) :24.

Allard M.A, Séjourné N, Chabrol H (2007). Vécu des différentes étapes d'un processus de fécondation *in vitro* (FIV). The experience of *in vitro* fertilization procedure (IVF). *Science Direct: Gynécologie Obstétrique & Fertilité*; 30:10.

Allen T W., Klink W H et Polyzou WN (2001). Analyse ponctuelle des facteurs de forme de deutons élastiques. *Examen physique C* ; 63 : 3.

B

Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright G, J (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature Publishing*; 508(7497):483-487.

Blakier H, Dziak E, Sojecki A, Librach C, Michalak M, Opas M (2002). Calcium-binding proteins and calcium- release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos. *Human reproduction*; 17(11): 2938-47.

Bowen J.A, and Hunt J.S (2000). The role of integrins in reproduction. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 223:331-334.

Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Saffar L, Gattegno L, Ducot B, Drillet A.S, Bomsel M, Wolf J.P, and Ziyat A (2007). Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC developmental biology*; 7:102.

Bayas M.V, Kearney A, Avramovic A, Van Der Merwe P.A, and Leckband D.E (2007). Impact of salt bridges on the equilibrium binding and adhesion of human CD2 and CD58. *The Journal of biological chemistry*; 282:5589-5596.

Bromfield E.G, Nixon B (2013). The function of chaperone proteins in the assemblage of protein complexes involved in gamete adhesion and fusion process. *Reproduction*; 145:31-42.

Bedford J.M (2008). Puzzles of mammalian fertilization-and beyond. *Int. J. Dev. Biol*; 52:415-426.

Barraude-Lange V, Naud-Barriant N, Bomsel M, Wolf J.P, Ziyyat A (2007). Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *Faseb J*; 21:3446-3449.

Boissonnas C.C, Montjean D, Lesaffre C, Auer J, Vaiman D, Wolf J.P, Ziyyat A (2010). Role of sperm $\alpha\beta 3$ integrin in mouse fertilization. *Dev. Dyn*; 239 :773-83.

Buffone M.G, Ijiri T.W, Cao W, Merdiushev T.A, hajanian HK., Gerton GL (2012). Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev* ; 79 :4-18.

Blobel C.P, Wolfsberg T.G, Turck C.W, Myles D.G, Primakoff P, and White J.M (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*; 356:248-252.

Borg C, Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin J.P, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Apetoh L, R  b   C, Chiringhelli F (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest*; 120(2):457-471.

Britton L. E, Alspaugh A, Greene M.Z, Mclemore R.M (2020). An Evidence-Based Update on Contraception. *Am J Nurs*; 120(2): 22-33.

Baker D.E (2017).Formulaire d'examen des médicaments : Naldemedine. *Hosp Pharm* ; 52(7) ; 464-468.

C

Charrin S, Le nouar F, Silvie O, Milhiet P.E Boucheix C, Rubinstein E (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *The Biochemical journal*; 420: 133-154.

Classon B.J, Williams F.A, Willis A.C, Seed B, Stamenkovic (1989). The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rate MRC OX-44 antigen. *The journal of experimental medicine*; 169: 1497-502.

Classon B.J, Williams F.A, Willis A.C, Seed B, Stamenkovic I (1990). The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rat MRC OX-44 antigen. *The journal of experimental medicine*; 172(3):1007.

Chen M.S, Tung K.S, Coonrod S.A, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade P.W, Herr J.C, White J.M (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6\beta 1$: implication for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 96(2):11830-5.

Chen C, Ke J, Zhou X.E, Yi W, Brunzelle J.S, Li J, Yong E, Xu H.E, Merchen K (2013). Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature*; 500(7463):486-489.

Coonrod S, Naaby-Hansen S, Shetty J, and Herr J (1999). PI-PLC releases a 25-40 KDa protein cluster from the hamster oolemma and affects the sperm penetration assay. *Molecular human reproduction*; 5:1027-1033.

Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule T, Ndzoudi A, Boucheix C, Rubenstein E, Wolf J.P, Ziyat A, Perez E, Pincet F, Gourier C (2014). Binding of sperm protein IZUMO1 and its egg receptor JUNO drives CD9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development*; 141(19): 3732-9.

Copper S (2019). Prescribing information ParaGard T380A intrauterine copper contraceptive

Curtis K.M, Tepper K.N, Jatlaoui T.C, Berry-Bibee E, Horton L.G, Zapata B.L, Simmons B.K, Pngano H.P, Jamieson D.J, Whiteman K.M (2016). U.S. medical eligibility criteria for contraceptive use. *MMWR Recomm Rep*; 65(3): 1-103.

D

Dallakyan S, Olson A J (2014). Criblage de bibliothèques de petites molécules par amarrage avec PyRx. *Biologie chimique* ; 243-250.

Denis J .C, Pharm D, Leonard J, Levien L.T, Baker D.E (2015). Ombitasvir/Paritaprévir /Ritonavir andbDasabuvir. *Hosp Pharm* ; 50(5) : 396-412.

E

Evans J.P, Kopf G.S, and Schultz R.M (1995). Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction. *Developmental biology*; 187:79-93.

Evans J.P (2012). Sperm-egg interaction. *Ann. Rev. Physiol*; 74 :477-502.

Eto K, Huet C, Tarui T, Kupriyanov S, Liu H, Puzon-McLaughlin W, Zhang X, Sheppard D, Engvall E, Takada Y (2002). Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implication for sperm-egg binding and other cell interaction. *The Journal of biological chemistry*; 277(20): 17804-10.

Evans C, Christian M.S, Cleghorn C.L, Greenwood D.C, Cade G.E (2012). Systematic review and meta-analysis of school- based interventions to improve daily fruit and vegetable intake in children aged 5 to 12 y. *The American journal of clinical nutrition*; 96(4)

Ellerman D.A, Pei J, Gupta S, Snell W.J, Myles D, Primakoff P (2009). IZUMO is part of multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Mol Reprod Dev*; 76(12): 118-1199.

Elie F (2004). Liaison hydrogène et autres liaisons chimiques. *ResearchGate* ; 14.

F

Fawcett D.W (1975). The mammalian spermatozoon. *Developmental biology*; 44(2): 394- 436.

Familiari G, Hein R, Relucenti M, Nottola S, Sathananthan U (2006). Ultrastructural dynamics of human reproduction, from ovulation to fertilization and early embryo development. *International review of cytology*; 249(06): 53-141.

Fujihara Y, Murakami M, Inoue N, Satouh Y, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M (2010). Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *Journal of cell science*;123(9):1531-6.

G

Gupta S.K, Bhandari B (2011). Acrosome reaction: Relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian journal of andrology*; 13(1): 97-105.

Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J (2010). Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucid proteins. *Science*; 329(59888):216-219.

Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P (2008). Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates *Biol Reprod*; 78:796-806.

Gadella B.M, Evans P.G (2011). Membrane fusions during mammalian fertilization. *Adv Exp Med Biol*; 713:65-80.

Gaba M, Punam G, Sarbjot S (2010). An overview on Molecular Docking. *Int. J. Drug Dev.Res* ; 2 : 219-2331.

Goadsby P.J, Tfelt-Hansen P, Saxena P.R, Dahlof C, Pascual J, Lainez M, Henri P, Diener H.C, Schoenen J, Ferrari M.D (2000). L'ergotamine dans le traitement aigu de la migraine : bilan et consensus européen. *Cerveau* ; 123(1) :9-18.

H

Han J, Zhang J, Zhang C.H (2021). Irinotecan- induced Steatohepatitis : Current Insights. *Oncol avant* ; 11 : 754891.

Hatcher R.A (2018). Contraceptive technology. 21st. Atlanta. Managing Contraception

Hall A.M, Kulter B.A (2016). Intrautérine contraception in nulliparous women: a prospective survey. *J Fam Plann Reprod Health Care*; 42(1): 36-42.

He Z.Y, Brakebusch C, Fassler R, Kreidberg J.A, Primakoff P, and Myles D.G (2003). None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors and essential for sperm-egg binding and fusion. *Developmental biology*; 254:226-237.

Hemler M.E(2014). Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nature reviews. Cancer*; 14:49-60.

Hotta H, Ross H.A, Huebner K, Isobe M, Wendeborn S, Chao M.V, Ricciardi R.P, Tsujimoto Y, Croce C.M, Koprowski H (1988). Molecular Cloning and characterization of an Antigen Associated with Early Stages of Melanoma Tumor Progression 1. *Cancer research*; 48:2955-2962.

Huang C.C, Meng E C, Morris J.H., Pettersen E.F, Ferrin T.E (2014). Amélioration de UCSF Chimera via des services Web. *Recherche sur les acides nucléiques* ; 42(1) : 478-484.

I

Inou N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, and Yanagimachi R (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*; 108:20008-20011.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M (2005). The immunoglobulin superfamily protein IZUMO is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*; 434(70-30): 234-8.

Inoue M, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagihara Y (2013). Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development*; 140: 3221-3229.

Izquierdo L, Helle F, Francois C, Castelain S, Duverlie G, Brochot E (2014). Simeprevir for traitement of hepatitis C virus infection. *Pharmacogénomique Pers Med* ; 7 : 241-249.

J

Jones R.K, Lindberg L.D, Higgins J.A (2014). Pull and pray or extra protection. Contraceptives strategies involving withdrawal among US adult women. *Contraception*; 90(4): 416-21.

Johnson S, Lorrae M, Zinaman M (2018). Can apps and calendar methods predict ovulation with accuracy. *Curr Med Res Opin*; 34(9):1587-94.

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba S.A, Chiba K, Herohashi N (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad. Sci USA*; 108:4892-4896.

Jean C, Haghghirad F, Zhu Y, Chalbi M, Ziyat A, Rubinstein E, Gourier C, Yip P, Wolf J.P, Lee J.E, Boucheix C, Barraud-Lange V (2019). JUNO, the receptor of Sperm IZUMO1, is expressed by the human oocyte and is essential for human fertilization. *Human Reproduction*; 34(1):118-126.

K

Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient. *Nature genetics*; 24(2):279-82.

Karamanou M, Poulakou-Rebelakou E, Tzetis M, Androustos G (2010). Anton van Leeuwenhoek (1632-1723). Father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. *Rev.Argent. Microbiol*; 42:311-314.

Kim E, Kim J.S, Lee Y, Song B.S, Sim B.W, Kim S.U, Saitoh T, Yazawa H, Nunoya T, Chang K.T(2013). Molecular cloning, characterization of porcine IZUMO1, an IgSF family member. *Reprod Domest Anim*; 48(1): 90-7.

Kichen D.B, Decornez H, Furr J. R, Bajorath J (2004). Docking and scoring in virtual screening for discovery: methods and applications. *Nature reviews Drugs discovery*; 3(11): 935-949.

L

Lgaz H, chung I, Salghi R, Ali I.H, Chaouiki A, El Aoufir Y, Khan M (2019). On the understanding of the adsorption of Fenu greek gum on mild steel in an acidic medium: Insights from experimental and computational studies. *Appl Surf. Sci*; 463: 647-658.

Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*; 287 :319-321.

Le Nouar F, Rubinstein E, Gasmin C, Prenat M, Boucheix C (2000). Severely Redact Female Fertility in CD9-Deficient Mice. *Sciences* ; 287 : 1998-2000.

M

Maecker H.T, Todd S.C, Levy S (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; 11: 428-442.

March K, Jerry A (1985). *Chimie organique avancée : réactions, mécanismes et structure.* New York : Wiley.

Miyado k, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Sciences (New York, N.Y.)*; 287(5451) :321-4.

Meslin C, Mugnier S, Callebaut I, Laurin M, Pascal G, Poupon A, Goudet G, Monget P (2012). Evolution of genes involved in gamete interaction: evidence for positive selection, duplications and losses in vertebrates *PLoS ONE*; 7(9):44548.

McCann M, Potter L.S(1994). Progestin-only oram contraception : a comprehensive review. *Contraception* ;50(6) :7824(94)90115-5.

Murphy P.A (2013). Contraception, In: Schuiling KD, Likis. *Women's gynecologic health*; 209-60

Murphy G (2008). The ADAMs: signaling scissors in the tumor microenvironment. *Nature reviews cancer*; 8:932-941.

N

Nixon B, Aitken R.J, McLaughlin E.A (2007). New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Mol. Life Sci* ; 64 :1805-1823.

Nishimura H, Cho C, Branciforte D.R, Myles D.G, and Primakoff P (2001). Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Developmental biology*; 233:204-213.

O

Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A (2012). CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte *Biology open*; 1(7): 640-7.

Okabe M, Adachi T, Takada K, Oda H, Yagasaki M, Kohama Y, Mimura T (1987). Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *J. Reprod. Immunol*; 11:91-100.

O'Connell K, Davis A.R, Kerns J (2007). Oral contraceptives : Side effects and depression in adolescent girls. *Contraception* ;75(4) :299-304.

P

Primakoff P, Hyatt H, and Tredick-Kline J (1987). Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *The Journal of cell biology*; 104:141-149.

Primakoff P, Hyatt H, Tredick-kline J (1987). Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *The Journal of cell biology*; 104(1): 141-9.

Peragallo U. R, Polis B.CH, Jensen E.T, Greene M.E, Kennedy E, Stanford J.B (2018). Effectiveness of fertility awareness-based methods for pregnancy prevention: a systematic review. *Obstet Gynecol*; 132(3):591-604.

R

Raveaux B, Favier S, Perez E, Gourier CH (2018). Egg CD9 protein tides correlated with sperm oscillations tune the gamete fusion ability in mammal. *J Mol Cell Biol*; 10(6):494-502.

Reichle D E (2020). Traitement de l'énergie par les animaux. Le cycle mondial du carbone et le changement climatique ; 55-78.

Rubinstein E, Ziyat A, Prenant M, Wrobel E, Wolf J.P, Levy S, Le Naour F, and Boucheix C(2006a). Reduced fertility of female mice licking CD81. *Developmental biology*; 290:351-358.

Rubinstein E, Ziyat A, Wolf J.P, Le Naour F, and Boucheix C(2006b). The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Seminars in cell & developmental biology*; 17 :254-263.

Runge K.E, Evans J.E, He Z, Gupta S, Mc Donald K.L, Stahlberg H, Primakoff P, Myles D.G (2007). Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Developmental biology*; 304: 317-25.

S

Sabitini R, Cagiano R (2006). Comparaison profiles of cycles control, side effects and sexual satisfaction of three hormonal contraception. *Contraception* ; 74(3) :220-223.

Sala-Valdes M, Aliane N, Greco C, Rubinstein E, Boucheix C (2012). Targeting tetraspanins in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*; 16 :985-997.

Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, Horikawa M, and Ishikawa M (2004). Integrins are not involved in the process of human sperm-olemmal fusion. *Human reproduction*; 19:639-644.

Sosnik J, Miranda P.V, Spiridonov N.A, Youn S.Y, Fissore R.A, Johnson G.R, Visconti P.E (2009). Tssk6 is required for IZUMO relocalization and gamete fusion in the mouse. *J. Cell. Sci*; 122:2741-2749.

Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M (2012). Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci*; 125(21): 4985-90.

Schulz-Gasch T, Stahl M (2004). Scoring Function for Protein-ligand Interactions: A Critical Perspective. *Drug Discov Today: Technologies*; 1: 231-239.

Sarao S.M, Bansode O.M, Cooper B. D (2021). La contraception. StatPearls Publishing LLC.

Stein K.K, GO J.K, Lane W.S, Primakoff P, and Myles D.G (2006). Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics*; 6:3533-3543.

Seeliger D, De Groot (2010). Ligand Docking and binding site analysis with PyMol and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design* ; 24(5) :417-422.

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

Stahl M, Rarey M (2001). Detailed analysis of scoring functions for virtual screening. *J. Med. Chem* ; 44 :1035.

Sungwan K (2021). Exploring chemical information in PubChem. *Current Protocols* ;1 :217.

Swadogo S, Hien F.M, Ouédraogo M.S, Drabo Y.J (2014). Evolution of chronic myeloid leukemia on nilotinib after failure of imatinib. *Pan Afr Med* ;18 :142.

Stephen B, Stephen D, Silberstein M.D, Shrewsbury M, Hoekman J (2020). Dihydroergotamine (DHE)-then and now : A narrative review. *Headache* ; 60(1) : 40-57.

T

Tamkun J.W, DeSimone D.W, Fonda D, Patel R.S, Buck C, Horwitz A.F, Hynes R.O (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*; 46(2):271–82.

Trone G, Russo M.A, Hirsch E, Odorisio T, Altruda F, Silengo L, and Siracusa G (1993). Expression of beta1 integrin complexes of the surface of unfertilized mouse oocyte. *Development*; 117:1369-1375.

W

Wang R, Lu Y, Fang X, Wang S (2004). An Extensive Test of 14 Scoring Functions Using the PDB bind Refined Set of 800 Protein-ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Comp. Sci* ; 44 : 2114-2125.

Wang Z, Jian L, Yan H, Xu Z, Luo P (2021). Adverse events associated with nilotinib in chronic myeloid leukemia : mechanisms and management strategies. *Expert Rev Clin Pharmacol* ; 14(4) : 445-456.

Wu L, Sampson N, S (2013). Fucose, mannose, and β -N-acetylglucosamine glycopolymers initiate the mouse sperm acrosome reaction through convergent signaling pathways. *ACS Chem. Biol*; 9(2):468-475.

Witte T.S, Schafer-Somi S (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. SCI*; 102:181-193.

Wolfsberg T.G, and White J.M (1996). ADAMs in fertilization and development. *Développemental biology* ; 180 :389-401.

Wolf J.P, Barraud-Lange V, Ziyat A, Pont J.C, Serres C, Ar J, et Lefèvre B (2011). Interaction gamétique au cours de la fécondation.

Wolkowicz M.J, Digilio L, Klotz K, Shetty J, Flickinger C.J, and Herr J.C (2008). Equatorial segment protein (ESP) is a human alloantigen involved in sperm-egg binding and fusion. *Journal of andrology*; 29:272-282.

Wolkowicz M, Shetty J, Westbrook A, Klotz K, Jayes F, Mandal A, Flickinger C.J, Herr J.C (2003). Equatorial segment protein defines a discrete acrosomal sub compartment persisting throughout acrosomal biogenesis. *Biology of reproduction*; 69(3):640-7.

Y

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S (2007). Control of immune Responses by Antigen-Specific Regulatory T Cells Expressing the Folate Receptor. *Immunity*; 27(1):145-159.

Yoshinaga K, Toshimori.K (2003). Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech* ; 61(1) : 39-45.

Yuan R, Primakoff P, Myles D.G (1997). A role for the Disintegrin Domain of Cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *The Journal of Cell Biology*; 137(1): 105-112.

Yanagimachi R (1978). Sperm-egg association in animals. *Curr Top Dev Biol*; 12:83-105.

Young S.A, Miyata H, Satouh Y, Muto M, Larsen M.R, Aitken R.J, Ikawa M (2016). CRISPR/CAS9-mediated mutation revealed cytoplasmic tail is dispensable for IZUMO1 function and male fertilized. *Reproduction*; 152(6): 665-672.

Z

Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulsi O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf J.P (2006). CD9 controls the formation of clusters that contains tetraspanins and the integrin $\alpha 6 \beta 1$, which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of cell sciences*; 119(3): 416-24.