



HAL
open science

Le complexe nsp14:nsp10 du SARS-CoV-2 stabilisé par un nanobody

Pierre Gauffre, Anaïs Gaubert, Maria Mate-Perez, Bruno Canard, François Ferron

► **To cite this version:**

Pierre Gauffre, Anaïs Gaubert, Maria Mate-Perez, Bruno Canard, François Ferron. Le complexe nsp14:nsp10 du SARS-CoV-2 stabilisé par un nanobody. XXVèmes Journées Francophones de Virologie, Apr 2023, Paris, France. *Virologie*, 27 (2), pp.48-49, 2023, 10.1684/vir.2023.993 . hal-04246262

HAL Id: hal-04246262

<https://hal.science/hal-04246262>

Submitted on 17 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Pierre Gauffre^{1*}, Anaïs Gaubert¹, Maria Mate-Perez¹, Bruno Canard^{1,2}, François Ferron^{1,2}

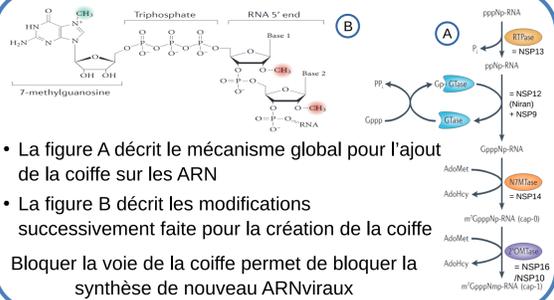
1. Architecture et Fonctions des Macromolécules Biologiques (AFMB), UMR 7257/CNRS, Aix-Marseille Université
2. European Virus Bioinformatics Center, Leutrargraben 1, 07743 Jena, Germany

*Contact: Pierre.Gauffre@univ-amu.fr

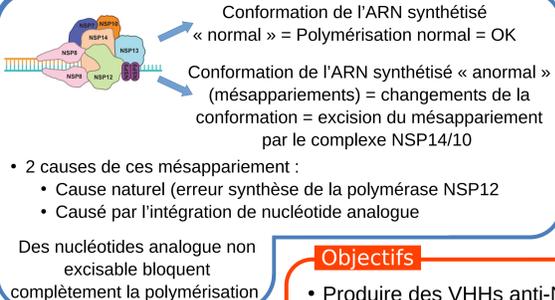
Abstract

- Le Complexe de Réplication / Transcription (RTC) du génome viral des Coronavirus possède un système de correction des erreurs médié par une exonucléase (ExoN)
- Cette fonction ExoN est portée par la protéine non structurale 14 (nsp14) sur sa partie N-terminale, et régulée par un co-facteur la protéine non structurale 10 (nsp10)
- Nsp14 est une protéine multi-domaines bi-fonctionnelle et possède en C-terminal un domaine N7-Méthyltransferase (MTase) impliqué dans le processus de formation de la coiffe des ARN viraux (ARNv)
- Ces deux activités enzymatiques font de la nsp14 une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre les Coronavirus (ciblant soit le domaine Mtase, soit ExoN ou les deux)
- L'obtention d'une structure à haute résolution par cristallogénèse de la NSP14 en entier permettrait notamment des essais de docking et de co-cristallisation permettant la recherche d'inhibiteurs

Activité N7-Met : Voie pour la coiffe des ARN +



Activité ExoN : Excision des mésappariements



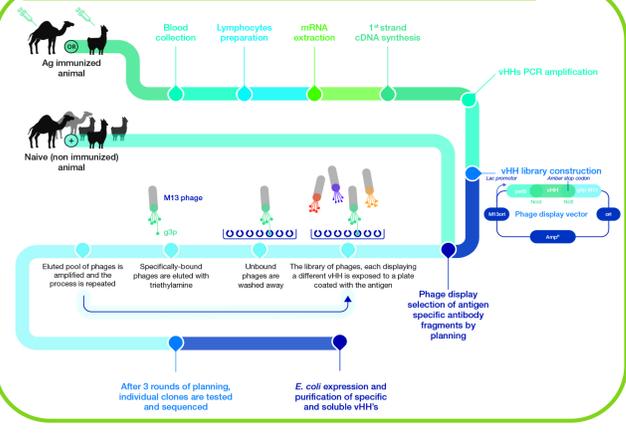
Problématiques

- Plusieurs essais de cristallisation du complexe nsp14:nsp10 ont été menés, mais contrairement à SARS-CoV-1, aucune condition de cristallogénèse du complexe ou de la NSP14 seule entière n'a encore été publiée
- Cela est certainement dû à une trop grande flexibilité entre les domaines ExoN et N7-Met de nsp14, et à un domaine amino-terminal peu structuré en l'absence de nsp10

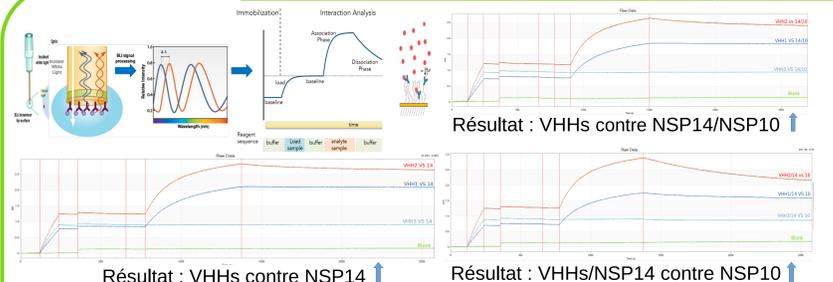
Objectifs

- Produire des VHHs anti-NSP14 de SARS-CoV-2 pour réduire la flexibilité du complexe nsp14:nsp10
- Analyser l'affinité des VHHs obtenus contre la NSP14 et du complexe NSP14/NSP10
- Réaliser des essais enzymatiques sur les activités ExoN et N7-Met en présence des VHHs obtenus
- Tester l'influence des VHHs obtenus sur la cristallisation de la NSP14 et du complexe NSP14/NSP10
- Développer un protocole de cristallisation de NSP14 pour réaliser des co-cristallisation avec des inhibiteurs potentiels

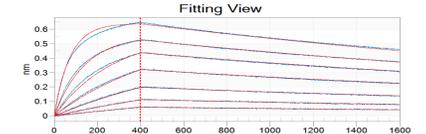
Production des VHH anti-NSP14 de SARS-CoV-2



Premiers essais d'interactions en BLI (Bio-layer interferometry)



Gamme de dilution (en double référent) pour le calcul du Kd du VHH1



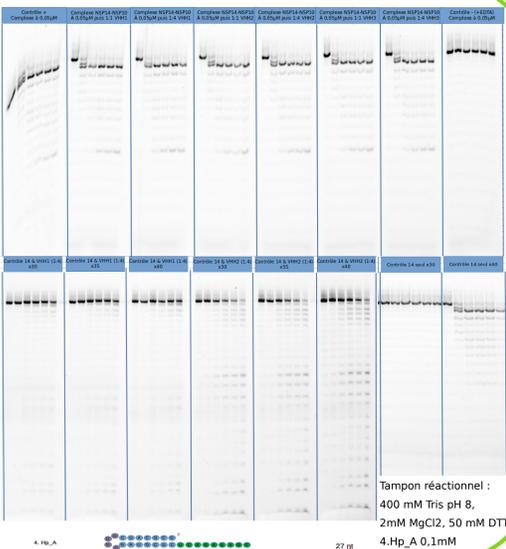
Conc. (nM)	KD (M)	Req/ Rmax(%)	Full X^2	Full R^2
100	2,13E-09	97,9	0,4251	0,9988
50	2,13E-09	95,9	0,4251	0,9988
25	2,13E-09	92,2	0,4251	0,9988
12,5	2,13E-09	85,4	0,4251	0,9988
6,25	2,13E-09	74,6	0,4251	0,9988
3,13	2,13E-09	59,5	0,4251	0,9988
1,56	2,13E-09	42,3	0,4251	0,9988

- Plusieurs essais d'interaction en BLI entre les différents partenaires ont été réalisés :
 - Les 3 VHHs obtenus ont été testés séparément contre la NSP14
 - Puis l'ajout de la NSP10 au complexe VHHx/NSP14
 - Ou l'interaction des VHHs avec le complexe NSP14/NSP10 préalablement formé

- Résultats : Les VHH 1 et 2 semblent bien fixer la NSP14 mais avec une dissociation beaucoup plus lente pour le VHH1
- L'ajout de NSP10 ou la fixation du complexe 14/10 laisse supposer que les VHHs entrent en compétition avec la NSP10

Caractérisation de l'effet des VHHs sur l'activité ExoN du complexe NSP14/NSP10

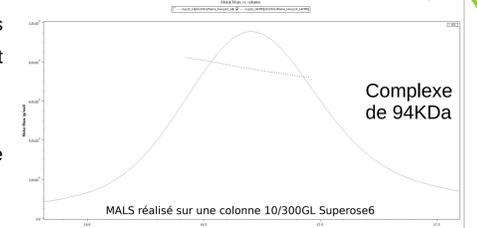
- Il ne semble pas y avoir de différence significative de la dégradation du Hp par le complexe NSP14/NSP10 en présence de VHHx.
- Le même résultat a été constaté en ajoutant 20x plus de VHHx que de complexe NSP14/NSP10
- Il a été constaté qu'il fallait environ 35 fois plus de NSP14 seule pour avoir une activité de dégradation similaire à celle du complexe entier, ce qui est cohérent avec la littérature
- Sur la NSP14 seule en présence du VHH1, il a été observé une légère activité constante, peu importe la quantité de NSP14
- Pour l'ajoute du VHH2 à la NSP14 seule, il a été observé une forte activité de dégradation dégréneré



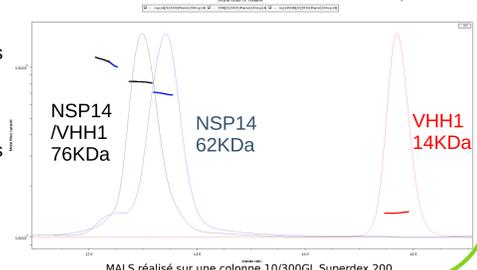
Homogénéité des complexes : SEC-MALS

- Les différents complexes ont été assemblés à RT, puis purifiés sur une colonne 10/300GL Superdex 200, avant d'être à nouveau concentrés
- Le complexe NSP14/NSP10/VHH1 semble avoir une homogénéité relative
- Le VHH1 seul semble très homogène
- La NSP14 seul semble alterner entre une forme très majoritaire en monomère et un dimère très minoritaire
- Le complexe NSP14/VHH1 semble avoir des meilleurs homogénéité et stabilité dans le temps

MALS: Complexe NSP14/NSP10/VHH1 ↓

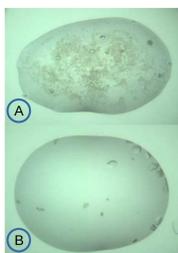


MALS: Complexe NSP14/VHH1 ↓



Premiers essais de cristallogénèse & essais de diffraction

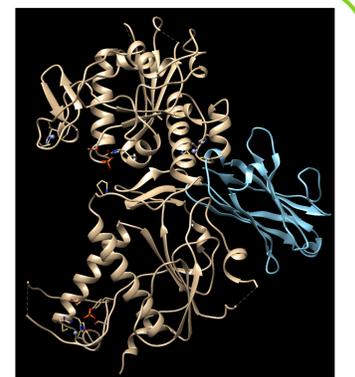
- Des essais de cristallogénèse sur des screenings commerciaux ont été réalisés avec :
 - La protéine NSP14 seule
 - Le complexe NSP14/NSP10
 - Le complexe NSP14/NSP10/VHH1 (figure A)
 - Le complexe NSP14/VHH1 (figure B)
- Seules les deux dernières conditions ont permis l'obtention de cristaux
- Et seule la dernière condition l'a permise dans des gouttes claires (Figure B)



- La structure des cristaux avec NSP14/NSP10/VHH1 ont montré que seules NSP14/VHH1 étaient en réalité cristallisées
- Au cours des optimisations :
 - À des cristaux qui diffractaient à basse résolution jusqu'à 6Å
 - Puis des cristaux qui diffractaient entre 4,5 et 4Å, légèrement maclés
 - Et maintenant, nous avons des cristaux qui diffractent entre 3,5 et 3Å

Première structure & poursuite des optimisations

- Les premières données collectées ont permis de faire un premier modèle à basse résolution de la NSP14 en entier, stabilisé par nanobody. Celui-ci sera enrichi par les prochaines optimisations
- Les optimisations de la cristallisation de NSP14 de SARS-CoV-2 en entier se poursuivent, notamment sur les conditions de cristallogénèse et de cryo-protection
- Une expérience de SAXS va également être réalisée sur la NSP14 pour connaître les épitopes reconnus respectivement par les 3 VHH obtenus



Hypothèse de l'emplacement du VHH

Conclusions

- Trois nanobodies obtenus ont été caractérisés en BLI
- Seul le VHH1 a été sélectionné pour sa faible dissociation au cours du temps pour la cristallogénèse
- Le VHH1 a un Kd de 2nM contre la NSP14 seule estimée en BLI, et 6nM pour le VHH2
- Les premiers cristaux diffractés ont permis d'obtenir une structure de nsp14 seule et entière à 3,4Å
- D'autres essais d'optimisation des conditions de cristallogénèse et de cryo-protection sont en cours
- Une analyse de l'influence des VHHs sur l'activité des ExoN a été réalisée

Perspectives

- Une expérience de SAXS de la NSP14 contre chacun des 3 VHH va être réalisée
- Une analyse de l'influence des VHHs sur l'activité des N7-Met sera prochainement réalisée
- Les améliorations de la cristallisation de la NSP14 entière, stabilisation par des nanobody, vont permettre l'obtention d'une structure complète de plus en plus résolue

Remerciements

