

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

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

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 est portée par la protéine non structurale 14 (nsp14), régulée par un co-facteur la protéine non structurale 10 (nsp10). Nsp14 est une protéine multi-domaine bi-fonctionnelle ; en N-terminal se trouve le domaine ExoN et en C-terminal un domaine N7-Méthyltransferase (MTase) impliqué dans le processus de formation de la coiffe des ARN viraux (ARN_v), permettant ainsi la formation du cap-0. Ces deux activités enzymatiques font de la nsp14 une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre les Coronavirus. L'obtention d'une structure à haute résolution par cristallogénèse permettrait notamment des essais de docking et de co-cristallisation pour la recherche d'inhibiteurs. Plusieurs essais de cristallisation du complexe nsp14:nsp10 de SARS-CoV-2 ont été menés, mais contrairement à SARS-CoV-1, aucune condition de cristallogénèse du complexe en entier 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 absence de nsp10.

Pour réduire la flexibilité du complexe nsp14:nsp10, des nanobodies (VHHs de camelidé) ciblant nsp14 ont été sélectionnés et purifiés. Trois nanobodies ont ainsi été obtenus, puis caractérisés en Bio-layer interferometry (BLI) pour déterminer leurs affinités et stabilité vis à vis du complexe. Sur les trois produits, seul le n°1 montre une affinité pour le complexe nsp14:nsp10 en entier. Ces premières données nous ont permis d'entamer des essais de cristallogénèse de ce complexe nsp14:nsp10 stabilisé par le nanobody n°1. Les premiers cristaux réalisés ont permis d'obtenir une première structure de nsp14 seul à 3,4Å. D'autres essais d'optimisation des conditions de cristallogénèse sont en cours. En parallèle, les effets individuels de chacun des nanobodies sur l'activité enzymatique du complexe sont en cours.