

# Mécanisme d'interaction entre la molécule EGCG et la protéine NS1 du virus influenza

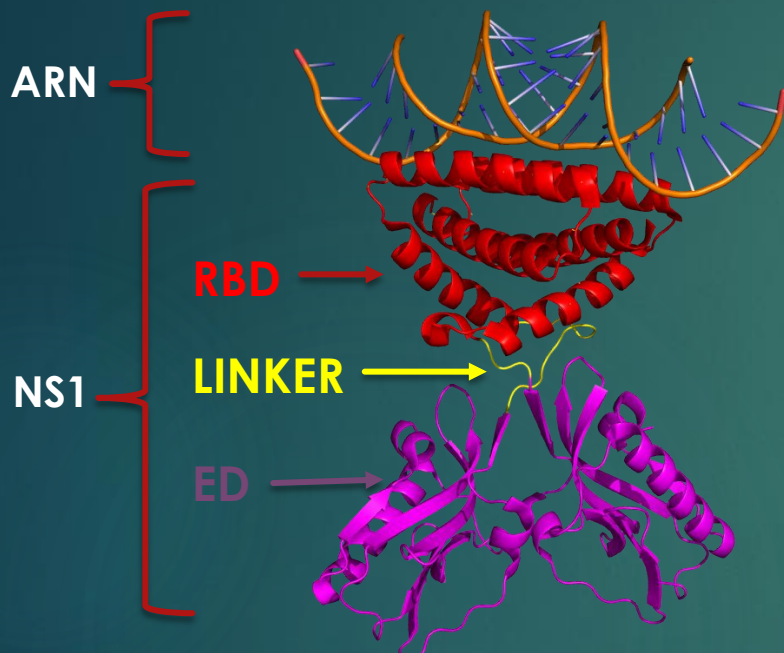
ÉTUDIANT : RADJASANDIRANE RAGOUSANDIRANE

L3 BI

RESPONSABLE : DELPHINE FLATTERS

# La protéine NS1

2



▶ Protéine virale composée de deux chaînes

▶ Chaîne A (en vert)

▶ Chaîne B (en bleu)

▶ Trois domaines :

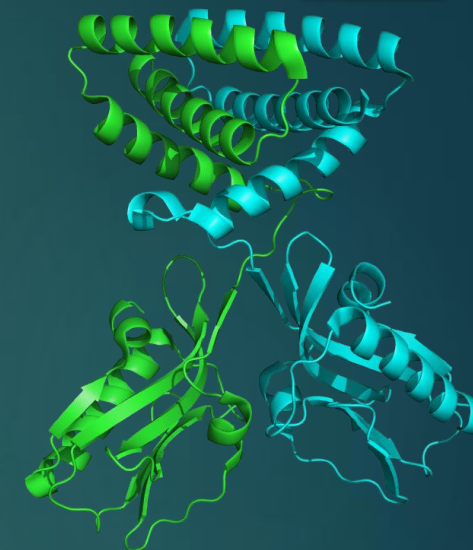
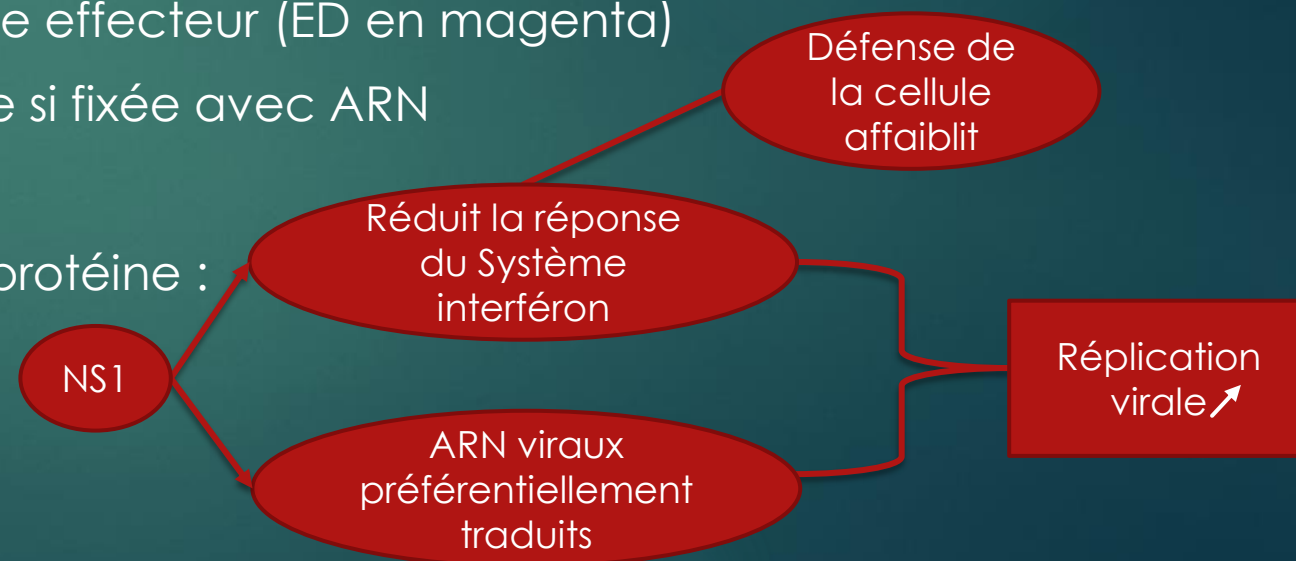
▶ RNA Binding Domain (RBD en rouge)

▶ le linker (en jaune)

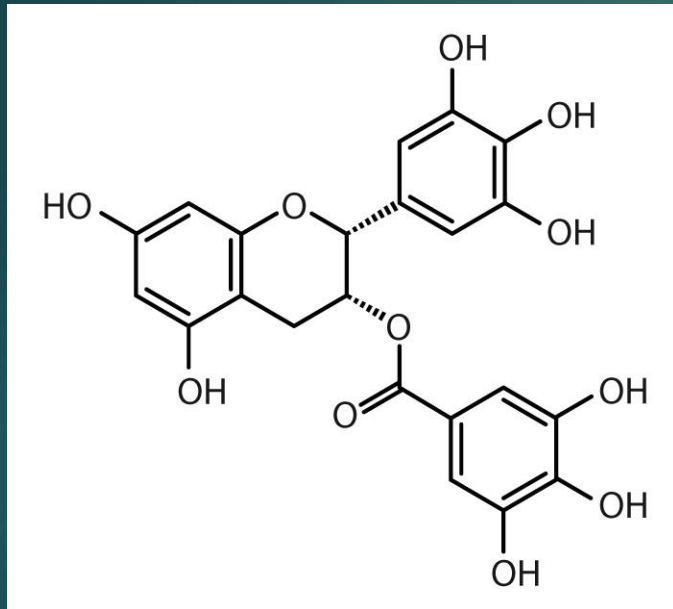
▶ un domaine effecteur (ED en magenta)

▶ Protéine active si fixée avec ARN

▶ Activité de la protéine :



# Le ligand EGCG : un inhibiteur potentiel de la protéine NS1 ?



► EGCG se trouve dans le thé vert, il est connu pour de nombreux bienfaits :

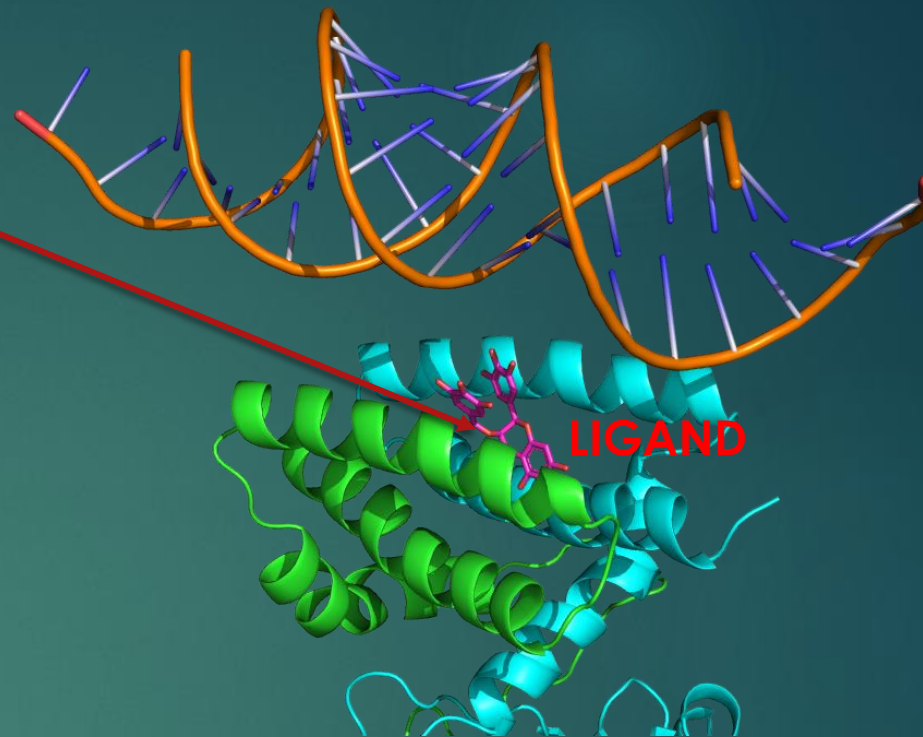
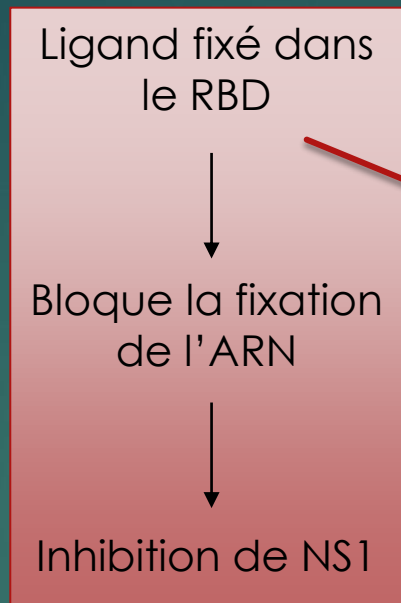
- Effet protecteur contre le cancer (Hussain et al., 2005, *Int J Cancer*)
- Préserve les cellules cérébrales (Lee et al., 2004, *J Neurosci Res*, Guo et al., 2007, *Biol Psychiatry*)

► Inhibe l'activité de NS1 mais le mécanisme d'interaction n'est pas décrit dans la littérature (Engel, 2013, *Antiviral research*)

Objectif : Nous allons tester si le EGCG pourrait se lier dans la région du RBD et ainsi inhiber l'interaction de NS1 avec l'ARN

# Hypothèse

## Démarche



- ▶ À partir d'une approche d'amarrage moléculaire (docking), on prédit les régions de NS1 où le ligand se fixe préférentiellement en testant plusieurs conformations possibles de la protéine NS1
- ▶ Sélection d'une liste de conformations de NS1 pour lesquelles le ligand se fixe préférentiellement dans le RBD (« poses » de docking avec une énergie d'interaction favorable)
- ▶ Étude des propriétés de la zone d'interaction où se lie le ligand, appelée cavité ou poche  
Cette étude permettra de mieux comprendre le mécanisme qui permettrait de bloquer la liaison à l'ARN et donc d'inhiber la protéine

## ► Données :

- La protéine NS1 est dynamique, elle n'a pas la même conformation au cours du temps, nous avons sélectionné 68 conformations différentes de NS1 issues de la Dynamique Moléculaire
- Ligand EGCG extrait de la base de données ZINC

## ► Outils :

- **Pymol** : Visualiser les conformations, les résultats de dockings...
- **Python** : Automatiser toutes les tâches répétitives, manipuler les données
- **PockDrug** : Récupérer les poches détectées pour chaque conformation et prédire la « druggabilité » ( Probabilité d'interagir avec une molécule de type médicament)
- **AutoDock Tools** / **MarvinSketch** : Préparer les conformations et ligand pour le docking
- **Vina** : Réaliser les dockings



# Protocole

6

Pour les 68 conformations :

- Enlever eau
- Ajout d'Hydrogènes polaires
- Ajout de charges de Gasteiger
- Choix de la zone de docking

Pour le ligand:

- 2D → 3D via **MarvinSketch**
- Ajout de charges de Gasteiger
- Détection des axes de rotations de la molécule

**PockDrug**

Préparer les conformations et ligand pour le Docking

**AutoDock Tools et MarvinSketch**

**Vina**

Script Bash pour automatiser les 68 dockings

Réaliser les Dockings (en aveugle) et sélection des meilleures poses du ligand (d'après l'énergie d'interaction)

**Pymol + Python**

Scripts Python

Étude des données

Scripts Python

Détection des poches pour chaque conformation

Prédiction de la druggabilité des poches

Scripts Python

Récupérer les valeurs d'énergies d'interaction et de druggabilités des poches sélectionnées

Pour chaque conformation  
Déterminer les poches qui ont le ligand (Calcul de distance)

Scripts Python

Réalisation de graphiques

Vue globale des résultats de dockings en fonction des valeurs :  
- d'énergies d'interaction  
- de druggabilités

Déterminer les conformations qui ont le ligand dans le RBD (proche du résidu 38, calcul de distance)

**Liste de conformations recherchées**

Script Python pour automatiser l'analyse des 68 conformations sur le serveur PockDrug et le téléchargement des poches

# Résultats

7

## ► Analyse des résultats de dockings pour toutes les conformations :

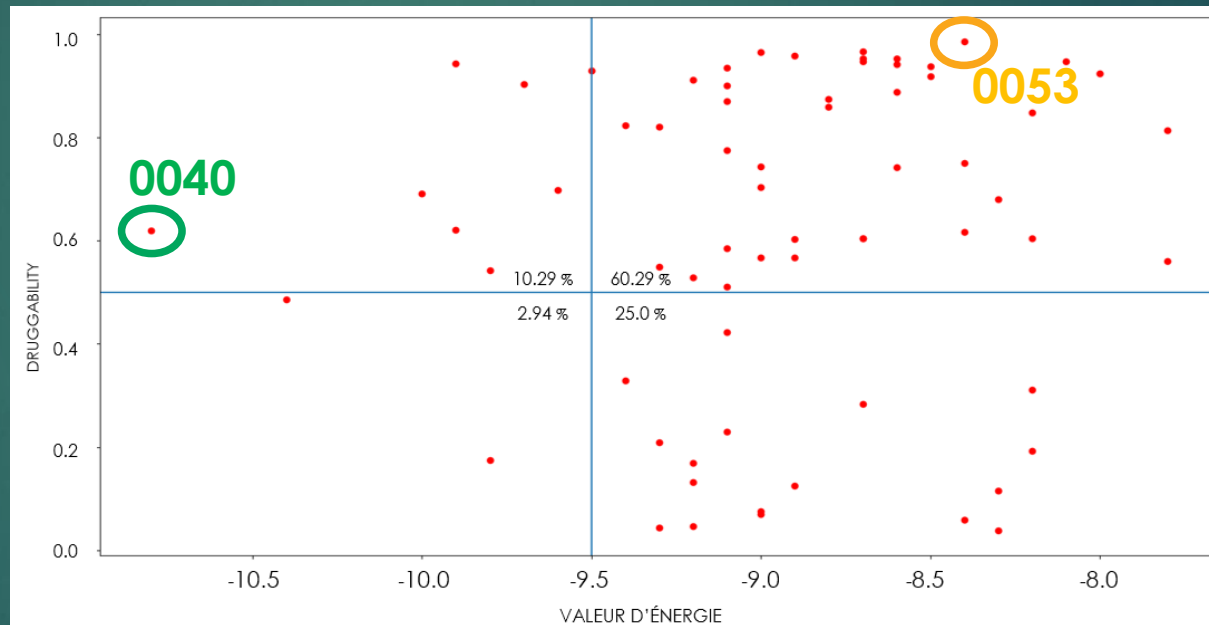
PARTIE EN HAUT A GAUCHE

Energie	Druggability	Conformation	Poche
-10.8	0.62	0040	pocket0
-10.0	0.69	0029	pocket0
-9.9	0.62	0030	pocket0
-9.9	0.94	0120	pocket0
-9.8	0.54	0026	pocket0
-9.7	0.9	0130	pocket5
-9.6	0.7	0108	pocket0

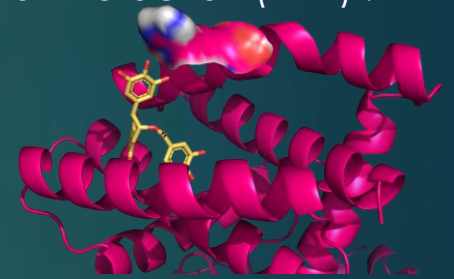
Nombre de conformations : 7

- Plus la druggabilité est élevée et plus l'énergie est négative, plus le résultat est intéressant
- On se focalise donc sur la partie en haut à gauche pour sélectionner les conformations qui ont un bon résultat de docking

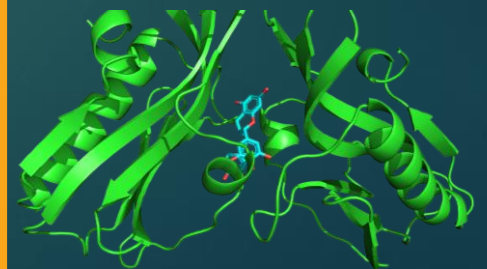
Valeur de prédiction de la druggabilité des poches en fonction de l'énergie d'interaction entre le ligand et NS1



Pose ayant la meilleure énergie d'interaction (RBD) :



Pose associée à la poche de druggabilité la plus élevée (ED) :



- Globalement, on a une bonne druggabilité sur la plupart des conformations
- Sur les 68 conformations, nous avons 7 conformations qui sont bien réceptives au docking du ligand EGCG (druggabilité > 0.5 et énergie d'interaction < -9.5 kcal/mol)

# Résultats

8

- On veut maintenant les conformations qui ont le ligand proche du résidu 38 (= dans le RBD)

## 1) Sélection des poses de docking pour lesquelles le ligand EGCG est situé dans la région de liaison à l'ARN :

Il a été montré dans une étude (Carrillo et al., 2014, *Journal of virology*) que le résidu 38 était crucial pour la fixation de l'ARN sur le RBD de NS1.

→ Calcul de la distance entre le centre d'inertie du ligand et le résidu 38 de NS1 (Pymol + Python) :

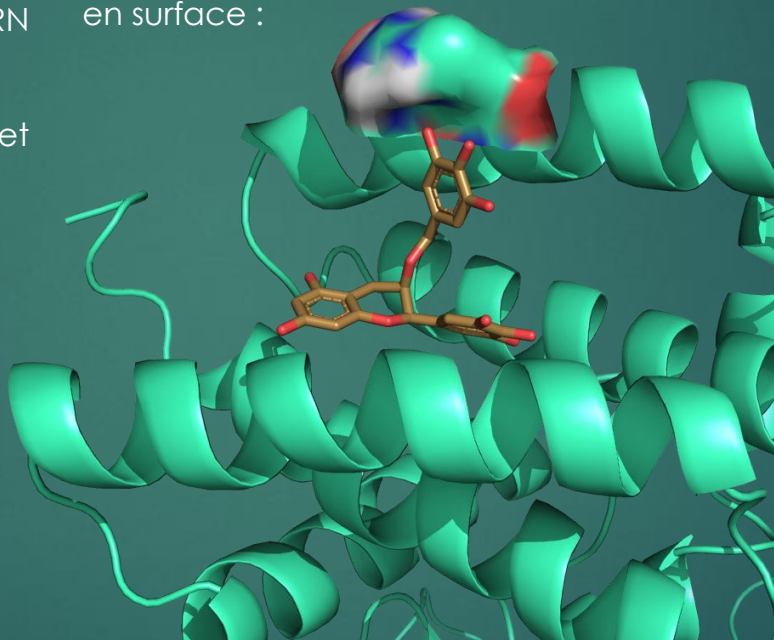
19 conformations sont retenues avec le ligand dans le RBD

Conformation	Distance	Energie
0108	8.028900187123854	-9.6
0029	8.03720211160448	-10.0
0138	8.228623311981774	-9.1
0120	8.913586385710822	-9.9
0116	8.946120768032088	-9.4
0040	9.539624351422187	-10.8
0101	9.839053341386665	-8.1
0140	9.923828334906652	-9.1
0036	10.074803521077287	-9.1
0134	10.765545342080342	-8.6
0015	10.881350078496505	-9.4
0045	10.934097425098905	-8.7
0112	11.498780407549459	-8.7
0139	11.818069011772215	-9.1
0026	11.945243938972196	-9.8
0035	11.949122712863211	-7.8
0030	13.007174140287411	-9.9
0019	14.793329457994222	-9.0
0018	15.120948954746998	-8.2

Nombre de conformations ayant le ligand proche du résidu 38 : 19

## 2) Exemple de conformation (0120) sélectionnée qui a le ligand dans le RBD

Le résidu 38 est représenté en surface :



## 3) Interaction entre le ligand et NS1

Nous pouvons charger une conformation et son ligand sur le site PLIP afin d'obtenir des informations sur les interactions entre le ligand et la protéine

Salentin, S. et al. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucl. Acids Res.* (1 July 2015) 43 (W1): W443-W447. doi: 10.1093/nar/gkv315

**Hydrogen Bonds**			**Salt Bridges**		
RESNR	RESTYPE	RESCHAIN	RESNR	RESTYPE	RESCHAIN
35	ARG	A	19	ARG	A
35	ARG	A	215	ARG	B
38	ARG	A	231	ARG	B
231	ARG	B	231	ARG	B

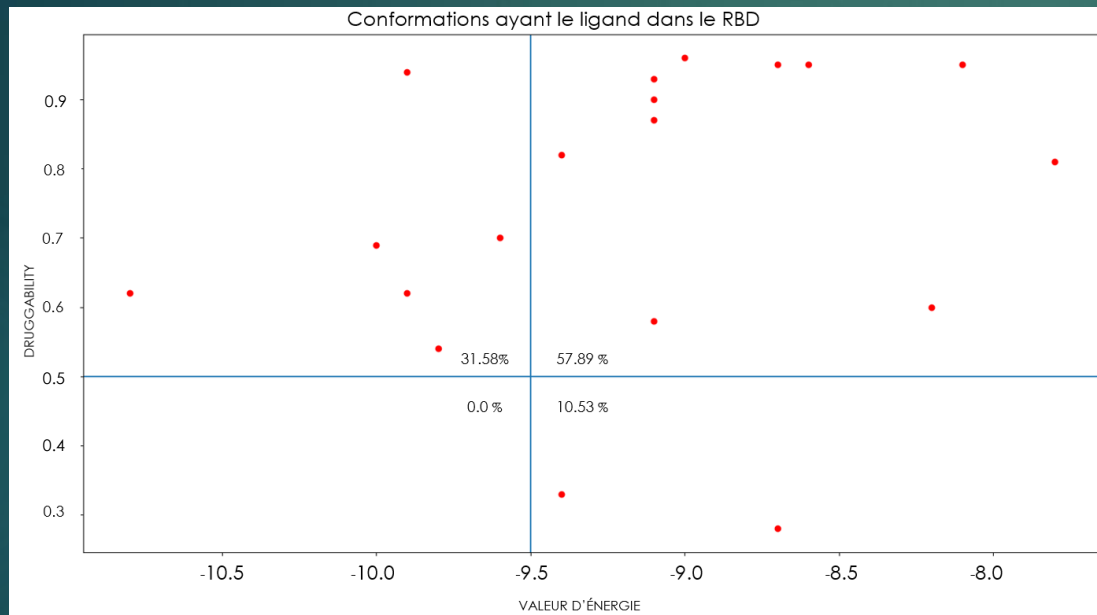
- Pour la conformation 0120, avec la plus haute druggabilité (0,94), le ligand fait une liaison hydrogène avec le résidu 38, et un pont salin avec le résidu 35, ce qui est un très bon résultat car la zone autour du résidu 38 est obstruée, cela devrait empêcher l'ARN de se fixer au RBD



# Résultats

9

- ▶ Graphique montrant les résultats de dockings pour les 19 conformations ayant le ligand dans le RBD :



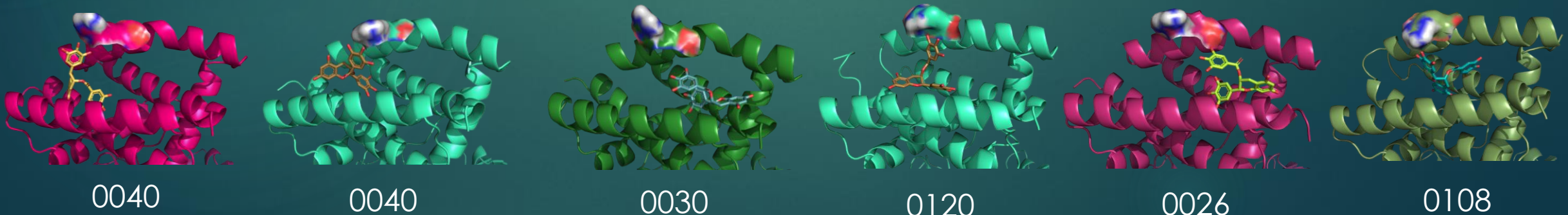
Parmi toutes ces conformations qui ont le ligand dans le RBD, on en sélectionne 6 qui ont une druggabilité > 0.5 et une énergie d'interaction < -9.5 kcal/mol

PARTIE EN HAUT A GAUCHE

Energie	Druggability	Conformation	Poche
-10.8	0.62	0040	pocket0
-10.0	0.69	0029	pocket0
-9.9	0.62	0030	pocket0
-9.9	0.94	0120	pocket0
-9.8	0.54	0026	pocket0
-9.6	0.7	0108	pocket0

Nombre de conformations : 6

Ces 6 conformations constituent la liste des conformations qui nous intéressent pour l'inhibition de l'interaction de NS1 avec l'ARN



# Conclusion

10

- ▶ Nous avons sélectionné quelques conformations de NS1 qui sont susceptibles d'accueillir un ligand dans le RBD proche du résidu 38, ce qui aura pour conséquence de bloquer le chemin d'accès entre l'ARN et le résidu 38 / RBD, et donc l'inhibition de l'activité de NS1
- ▶ Ces conformations sont des « images » de la NS1 pour un temps donné car la structure de NS1 est constamment en mouvement (prise en compte de la flexibilité de sa structure tridimensionnelle)  
EGCG peut être utilisé comme molécule antivirale et se fixera dans le RBD lorsque NS1 sera dans une conformation qui figure sur la liste

Il faut réaliser des tests supplémentaires pour avoir plus de fiabilités dans ces résultats, par exemple réaliser de nouveaux dockings sur de nouvelles conformations sélectionnées afin de valider les résultats et en utilisant plusieurs logiciels de prédiction des interactions protéine-ligand (manipulation/paramétrage/fonction d'énergie d'interaction ou fonction de score pour classer les poses)

## ► Articles sur NS1

- Engel, Daniel A. "The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target." *Antiviral research* 99.3 (2013): 409-416.
- Carrillo, Berenice, et al. "The influenza A virus protein NS1 displays structural polymorphism." *Journal of virology* 88.8 (2014): 4113-4122.

## ► Articles sur les bienfaits de EGCG

- Lee H, Bae JH, Lee SR. Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. *J Neurosci Res.* 2004;77(6):892-900. doi:10.1002/jnr.20193
- Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2005;113(4):660-669. doi:10.1002/ijc.20629
- Guo S, Yan J, Yang T, Yang X, Bezard E, Zhao B. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biol Psychiatry.* 2007;62(12):1353-1362. doi:10.1016/j.biopsych.2007.04.020
- Furuta, Takumi, et al. "Concise synthesis of dideoxy-epigallocatechin gallate (DO-EGCG) and evaluation of its anti-influenza virus activity." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17.11 (2007): 3095-3098.

## ► Module Python pour automatiser les tâches web : <https://selenium-python.readthedocs.io/index.html>

## ► AutoDock Tools : <http://autodock.scripps.edu/downloads>

## ► Vina : <http://vina.scripps.edu/download.html>

- Tutoriel Vina et ADT : <http://vina.scripps.edu/tutorial.html>

## ► MarvinSketch : <https://chemaxon.com/products/marvin>

- Documentation : <https://docs.chemaxon.com/display/docs/MarvinSketch+User%27s+Guide>