

Étude in silico des effets inhibitrices des Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin sur le Protéine VP30 de Ebola Virus

[In silico study of the inhibitory effects of Oleuropein, Kaempferol, and Quercetin on the VP30 protein from Ebola Virus]

Yassine Kasmi

Department of Biology,
Faculty Polydisciplinary Safi,
Cadi Ayyad University,
Morocco

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the ***Creative Commons Attribution License***, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Ebola is a severe viral disease that spreads in West Africa countries, whose a search of an effective Drug is a necessity. The VP30 protein is known as an essential activator of transcription for Ebola virus. In another, Oleuropein, Kaempferol, and Quercetin are a bio-active components, originally from several plants, and which are known by their ability of inhibiting viral transcription activators such HIV. In this context we tested in silico by molecular modeling the ability of these substrates to inhibit VP30 by Building in the active sites, and the application of new pharmaceutical compounds, although direct manipulation in vitro or in vivo is limited by the terms of Biosafety - it is reserved for laboratory level BSL-4 - which slow the search process. The Oleuropein, Kaempferol, and Quercetin components are linked with the active sites of VP30 with a free energy score estimated near $-8\text{Kcal} / \text{mol}$ and an average distance of 1.8 angstrom. We conclude that Oleuropein, Kaempferol, and Quercetin components may be effective treatment for Ebola Virus and essentially Kaempferol which has very ambitious Pharmacodynamics and kinetic owners, the things that make the component to be a candidate to be an effective Drug. Other experimental studies in vitro and in vivo are required to confirm.

KEYWORDS: Ebola Virus, docking, Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin, ligand, inhibitor.

RESUME: Ebola virus c'est une sévère maladie virale qui se propage dans les pays West d'Afrique, dont la recherche des Drug efficaces est une nécessité. La protéine VP30 est connue comme un activateur indispensable pour Ebola Virus. En outre Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin sont des composants Bioactives de plusieurs végétaux, et qui sont connus par leur capacité inhibitrice des Activeurs de transcription viraux telle de VIH. Dans ce contexte nous testions par modélisation moléculaire in silico la capacité de ces substrats à inhiber la VP30 par Building dans les sites actifs, malgré que la manipulation directe in vitro ou in vivo est limité par les conditions de Biosécurité – dont elle est réservée pour laboratoire de niveau BSL-4 - ce qui retarde le processus de recherche. Les composants Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin sont liés avec les sites actifs de VP30 avec un score d'énergie libre estimé près -8Kcal/mol , et une distance moyenne de 1.8 angström. Nous concluons que Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin peuvent être des composants thérapeutiques efficaces pour Ebola Virus et essentiellement Kaempferol qui a des propriétaires pharmacodynamiques et cinétiques très ambitieux, les choses qui font le composant de se porter candidat pour être un Drug efficace, et que des confirmations in vitro et in vivo sont nécessaires.

MOTS-CLEFS: Ebola Virus, docking, Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin, ligand, inhibiteur.

1 INTRODUCTION

Depuis le début de l'année 2014, des cas de maladie à virus Ebola ont été rapportés dans quatre pays d'Afrique : Guinée, Libéria, Sierra Léone et Nigeria.^{4,5,8} Le vendredi 8 août 2014, l'Organisation mondiale de la santé (WHO) a annoncé que le virus Ebola représentait une « *urgence de santé publique de portée mondiale* ». Dont il faut une « *réponse internationale coordonnée* » pour « *arrêter et faire reculer la propagation internationale d'Ebola* », selon l'WHO. Mais le Travail avec des virus infectieux Ebola est limitée à niveau de biosécurité (BSL) 4 laboratoires, la chose qui présente un obstacle important pour l'étude de ces virus.

La maladie Ebola virus, c'est une sèvre maladie et souvent mortelle chez l'homme, causé par un virus est dite **Zaire ebolavirus**, or **EBOV**, dont environ 90% des cas infectés décès.⁽¹⁾

Le virus est transmis à l'homme à partir d'animaux sauvages et se propage dans la population humaine par transmission d'humain à humain⁽¹⁾⁽²⁾ ; Chauves-souris frugivores de la famille Pteropodidae sont considérés comme l'hôte naturel du virus Ebola.⁽¹⁾ Le genre d'Ebola virus appartient a la Famille des *Filoviridae*,⁽¹⁾ ordre des *Mononegavirales* selon la Comité international de taxonomie des virus⁽⁶⁾. Dans ce genre on cite 5 espèces : ebolavirus Zaïre, ebolavirus Soudan, ebolavirus Reston, ebolavirus Forêt de Taï, et ebolavirus Bundibugyo.⁽⁸⁾ ebola virus est caractérisé par un génome a simple brin ARN avec sens négatif,⁽⁵⁾ avec un génome de longueur d'environ de 19 kb, puisque il appartient au *Filoviridae*, son diamètre situe à 80 nm avec une forme filamenteuse torsadés (d'où le nom) d'une manière générale jusqu'à 1,1 µm de longueur,⁽⁵⁾ mais à condition que les particules 14 µm ont été détectés dans des tissus de la culture⁽¹⁰⁾.

Les patients gravement malades ont besoin de soins de soutien intensif. Aucun traitement spécifique ni vaccin licence est disponible pour une utilisation chez les personnes ou les animaux.⁽¹⁾ La première reconnaissance de cet agent se fait par Prof. S. R. Pattyn, en 1977.⁽²⁾

La structure d'Ebola virus caractérisée par la protéine VP24 traduit par la région 10.345- 11.100, qui a des rôles essentiels pour le virus citant : qu'elle est un immunosuppresseur⁽¹¹⁾, d'où ils permettent au virus de contrôler le système immunitaire inné⁽¹²⁾, il se lie avec STAT1 directement en provoquant des effets antagonistes aux interférons¹³.

VP40 a des rôles d'assemblage de la matrice et d'autres rôles, polypeptide non modifié peut assembler dans des structures différentes pour différentes fonctions.¹⁴

« Les NP, VP30, VP35, et L sont protéines associées avec l'ARN génomique dans un complexe ribonucléoprotéique (Elliott et al., 1985). Utilisant d'un système de réplication artificiel, (Mühlberger et al. (1999) ont démontré que les protéines NP, VP35 et L sont essentielles pour la réplication et l'encapsidation du génome de EBOV. Bien que VP30 ne soit pas essentielle pour la réplication, il est apparu nécessaire pour la transcription efficace dans ce système. Le NP, VP35, VP30, et les protéines L ont également été montré récemment d'être essentiel pour la récupération des infectieuses EBOV-Z à partir d'ADNc clonés (Volchkov et al., 2001). En plus d'être un composant essentiel du complexe de réplication, VP35 a été également récemment impliquée comme un antagoniste d'interféron (Basler et al., 2000). VP35 peut donc faciliter la réplication virale dans les cellules infectées par le blocage de l'induction de réponses immunitaires antivirales normalement induits par la production de l'interféron »¹⁵

Cette étude a pour but de tester la possibilité de liaison entre les protéines de réplication et de transcription « VP30 », « VP35 » et les substrats chimiques suivantes : Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin, qui sont connus par leur capacité d'inhiber les Activateurs de la réplication et de la transcription viraux.^{20, 21, 22, 23, 24}

La bioinformatique a arrivé un outil principal dans le domaine de recherche pharmaceutique et surtout la recherche des nouvelles Drug, la chose qui permet de minimiser le coût de rechercher et de découvrir des nouvelles médicaments.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Data Bank

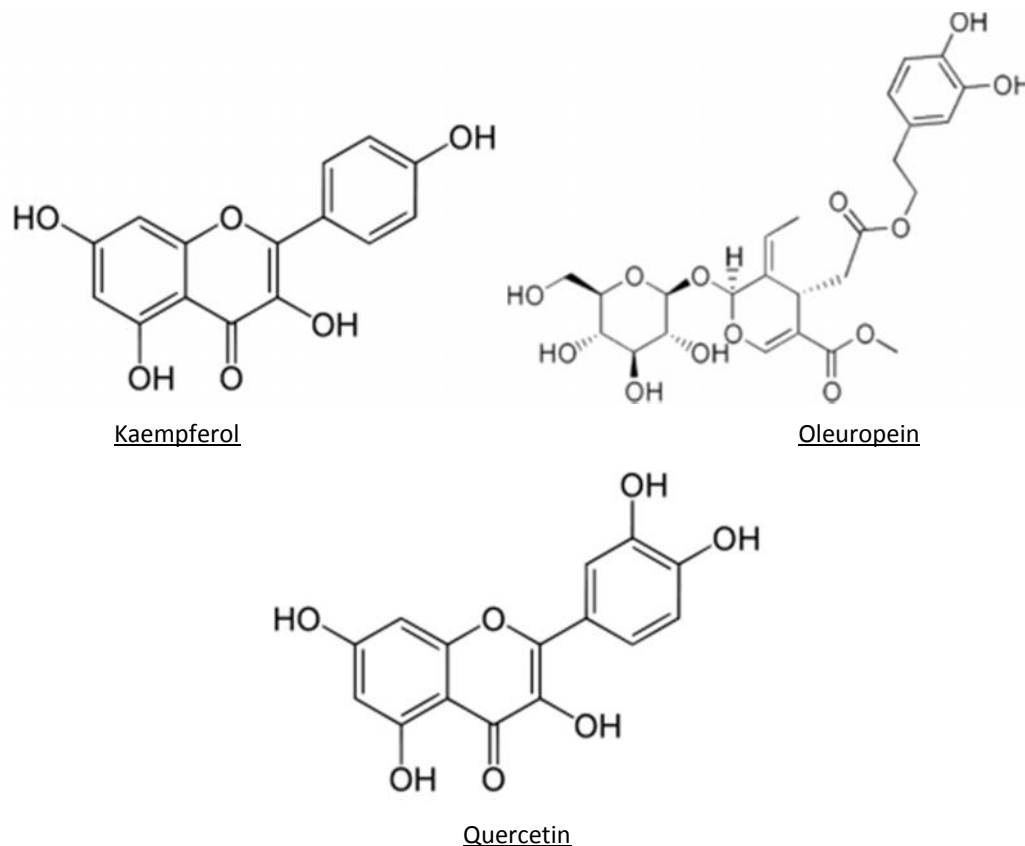
La définition et la configuration des structures des protéines est une étape essentielle dans cette recherche, nous sommes basés sur les banques des données « NCBI » et « RCSB Protein Data Bank », pour réaliser cette étape, ainsi que la définition de leurs ID utilisé pendant les études par les logiciels.

Au même temps les bases des données « ZincDocking » et « RCSB Protein Data Bank » sont les bases des données appliquées pour atteindre la structure 3D des molécules dans le fichier SD MDL, Protein Data Bank (PDB), formats Tripos MOL2.

B. Logiciel et Serveur

SwissDock est un serveur qui permet de réaliser des calculs d'énergie libre, énergie des liaisons, énergie et ainsi que permet de Prédiction cible des ligands.

« ArgusLab.4.0 est le programme de la structure électronique qui est basé sur la mécanique quantique, il prédit les énergies potentielles, les structures moléculaires; l'optimisation de la géométrie de la structure, les fréquences de vibration des coordonnées des atomes, longueur de la liaison, l'angle de liaison et les réactions voie (Peng et al., 1995). »²⁵



C. Méthodes

Pour étudier le score d'inhibition de VP30, on est basé essentiellement sur la comparaison des valeurs l'énergie libre obtenu par les calculs des logiciels ainsi que leur VdW qui permet de savoir la distance entre les molécules.

Les sites actifs de Ebola virus sont obtenus d'après le recherche réalisais via Bettina Hartlieb, et all sous titre : "Oligomerization of Ebola Virus VP30 Is Essential for Viral Transcription and Can Be Inhibited by a Synthetic Peptide," publié le 24 October2003, à The Journal of Biological Chemistry AFFINITY SITES, (référence 27)

3 RESULTATS ET DISCUSSION

Les acides aminés 94-112 de VP30 est une région indispensable pour oligomérisation à ce protéine, dont une grappe de quatre résidus leucine est d'une importance critique ; une mutation d'un seul de ces résidus leucine a donné lieu à des molécules d'oligomérisation VP30 déficiente qui ne sont plus en mesure de soutenir la transcription spécifique à EBOV.²⁷

L'analyse de la séquence d'acides aminés VP30 a révélé un motif de QXXR aux acides aminés 228 à 231 qui est spécifique de la DEA (D / H) de la boîte hélicases d'ARN.²⁷ (Fig2)

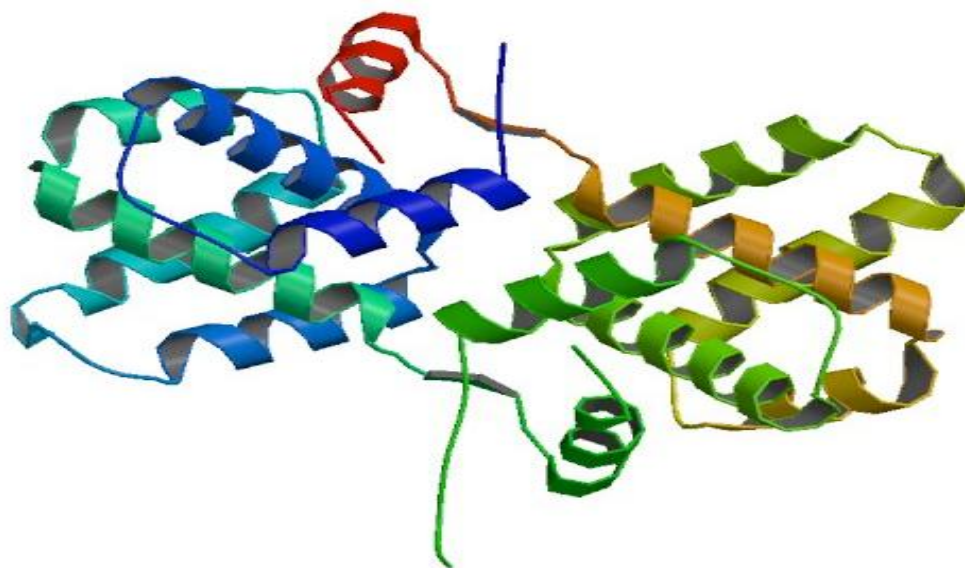


Figure1 : La structure cristalline du domaine C-terminal du virus Ebola VP30, les chaînes de protéines sont colorées à partir de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale en utilisant un arc (spectral) dégradé de couleur « RCSB »

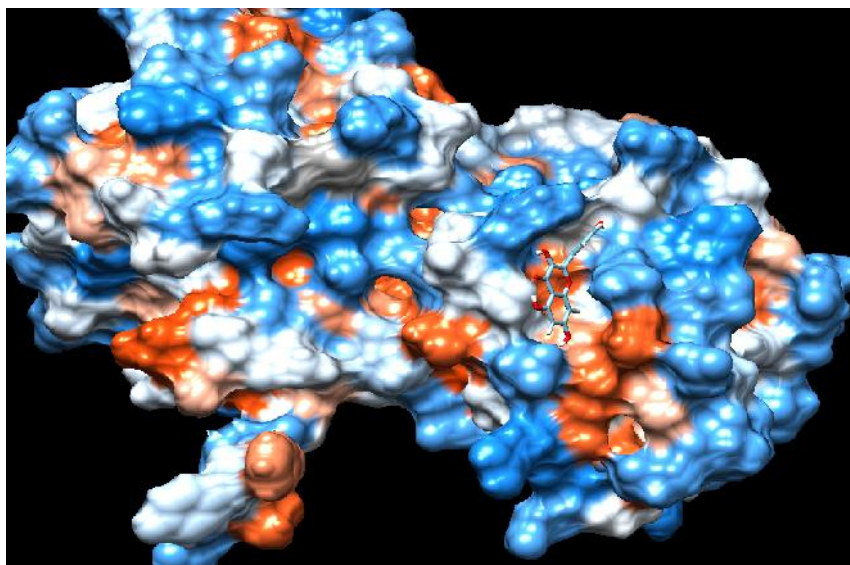


Fig 2 : Oleuropein lie à un site Actif obtenu par SwissDock

Les résultats obtenus par le Docking entre VP30 et « Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin », sont comme suivantes par Kcal/mol :

Tableau 1 : Résultats obtenu par SwissDock pour le Building entre la VP30 et les ligands aux sites actifs.

Composant	ΔG	FullFitness	SolvFull	Xlog P
Oleuropein	-8.54	-1271.05	-1508.18	-0.36
Kaempferol	-7.91	-1249.14	-1491.21	2.43
Quercetin	-8.64	-1304.83	-1503.72	1.94

Tableau 2 : Résultats obtenu par ArgusLab.4.0 pour le Building entre la VP30 et les ligands aux sites actifs avec Site Box Size: 60 x 60 x 59.75 angströms

Composant	Energie	FullFitness	Xlog P
Oleuropein	-7.95	-7.02	-0.36
Kaempferol	-8.06	-7.43	2.43
Quercetin	-7.98	-7.25	1.94

L'Oleuropein se lie dans 34 sites avec la protéine VP30 parmi celle-ci les sites actifs des acides aminés 94-112 et 228 à 231, (fig4) dont O numéro 2 se lie avec TRH230 par une distance 2.24 angströms ainsi que avec O7 avec une distance de 2.3 angströms, H numéro17 se lie avec SER234 avec une distance de 2 angströms, ce dernier lie aussi au H numéro18 avec une distance de 2.08 angströms, une autre liaison entre H5 et GLN203 à une distance de 2.57 angströms. Avec une énergie libre estimée est -8.54 Kcal/mol via SwissDock et une énergie de -7.95 Kcal/mol en ArgusLab.4.0, Malgré tout cela leur XlogP ou **partition coefficient** est très bas. Ce composant est prédit via Swiss Target Prediction qu'il cible les Facteurs de transcription chez l'homme.

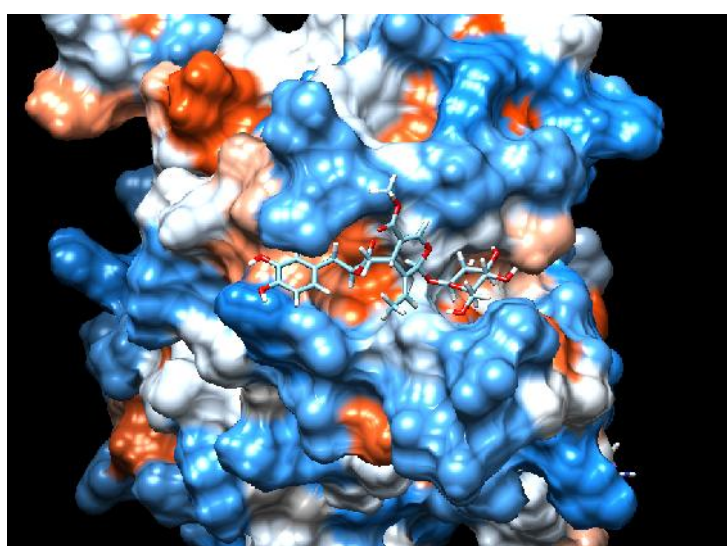


Fig 4 : Oleuropein au site actif 228 à 231.

Kaempferol se lie dans 40 sites avec la protéine VP30 parmi celle-ci les sites actifs des acides aminés 94-112 et 228 à 231, Fig5, dont H16 se lie avec Glu223 par une distance 1.8 angströms, O2 se lie avec GLY219 avec une distance de 2.03 angströms. Avec une énergie libre estimée est -7.79 Kcal/mol via SwissDock et une énergie de -8.05 Kcal/mol en ArgusLab.4.0, en outre leur XlogP ou **partition coefficient** égale 2.45 ce que donnent des propriétaires pharmacologiques et pharmacodynamiques et cinétiques encourageants. Ce composant est prédit via Swiss Target Prediction qu'il cible les Facteurs de transcription chez l'homme avec une Probabilité près de 100%.

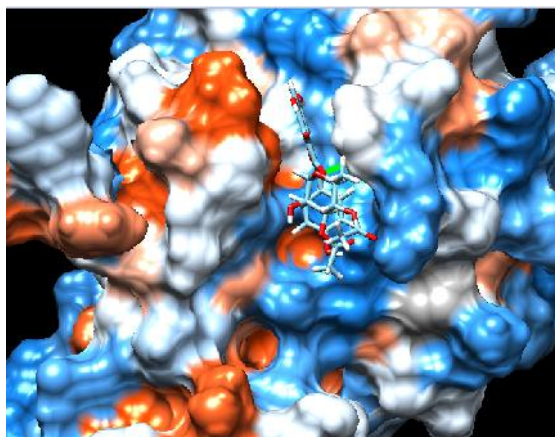


Fig5 : Kaempferol au site actif

Quercetin se lie dans 43 sites avec la protéine VP30 parmi celle-ci les sites actifs des acides aminés 94-112 et 228 à 231, Fig6, au site actif le Quercetin se dipose sans se lie à aucun acide amine, en plus, il se fixe au site en autre lieu en mettant une liaison entre H10 etSER7. Avec une énergie libre estimée est -7.79 Kcal/mol via SwissDock et une énergie de -8.05 Kcal/mol en ArgusLab.4.0, en outre leur XlogP ou **partition coefficient** égale 1.94 ce que donnent des propriétaires pharmacologiques encourageants. Ce composant est prédit via Swiss Target Prediction qu'il cible Ser_Thr Kinase, Metallo Protease et des enzymes chez l'homme avec une Probabilité près de 90%.²⁸

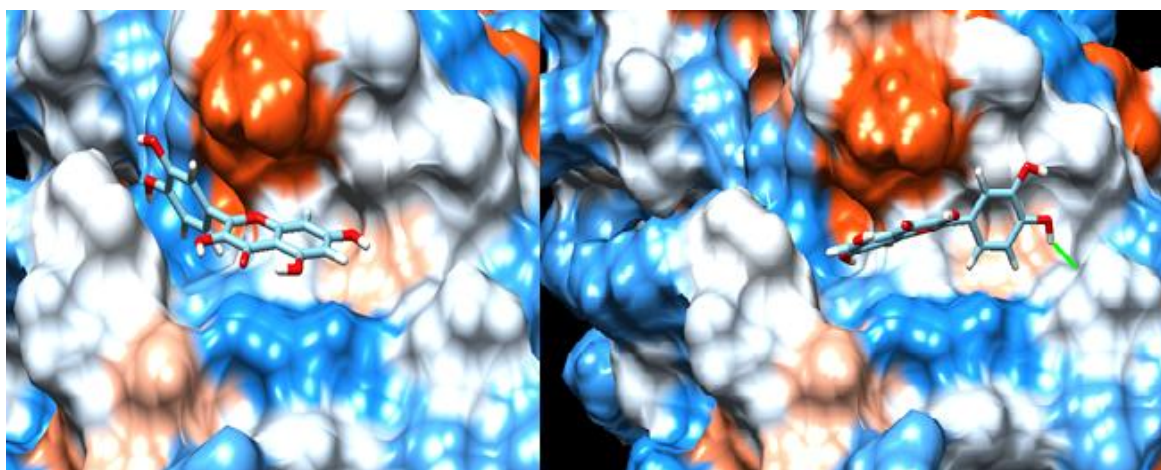


Fig6 : Quercetin en site actif

Fig7 : Quercetin en site actif SER163

4 CONCLUSION

On conclut qu'Oleuropein, Kaempferol, et Quercetin produisent des liaisons par les sites actifs inhibiteurs de la VP30 d'Ebola Virus, essentiellement le site actif des acides aminés 228 à 231. Et que tous ces substrats peuvent être le sujet des nouveaux projets de recherches in Vitro et in vivo afin de trouver des nouveaux Drug.

Kaempferol est le meilleur ligand inhibiteur pour Ebola Virus.

5 REMERCIEMENTS

Nous remercions Mr Adil AHIR pour son aide pendant le traitement de cette recherche.

REFERENCES

- [1] Ebola virus disease Fact sheet N°103 Updated April 2014, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/>
- [2] Bowen, E. T., G. Lloyd, W. J. Harris, G. S. Platt, A. Baskerville, and E. E. Vella. 1977. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet*:571-573.
- [3] Kuhn, Jens H.; Becker, Stephan; Ebihara, Hideki; Geisbert, Thomas W.; Johnson, Karl M.; Kawaoka, Yoshihiro; Lipkin, W. Ian; Negrodo, Ana I et al. (2010). "Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: Classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations". *Archives of Virology* 155 (12): 2083–103. Doi: 10.1007/s00705-010-0814-x. PMC 3074192. PMID 21046175.
- [4] Maladie à virus Ebola 1er août 2014, ministère de la santé française. <http://www.sante.gouv.fr/maladie-a-virus-ebola.html>
- [5] Derek Gatherer, The 2014 Ebola virus disease outbreak in west Africa, Published online ahead of print May 2, 2014, doi: 10.1099/vir.0.067199-0, *J Gen Virol* May 2014 vir.0.067199-0, Received 22 April 2014. Accepted 28 April 2014.
- [6] 6. Ki-ley M.P. Bowen E.T.W.b, Eddy G.A.c , Isaäcson M.d, Johnson K.M.a, McCormick J.B.a, Murphy F.A.e, Pattyn S.R.f, Peters D.g, Prozesky O.W.h, Regnery R.L.a, Simpson D.I.H.b, Slenczka W.i, Sureau P.j, van der Groen G.f, Webb P.A.a, Wulff H.a, Filoviridae: " a Taxonomic Home for Marburg and Ebola Viruses ?", 1982, *Intervirology* 1982;18:24–32 (DOI:10.1159/000149300)
- [7] Kuhn, Jens H.; Becker, Stephan; Ebihara, Hideki; Geisbert, Thomas W.; Johnson, Karl M.; Kawaoka, Yoshihiro; Lipkin, W. Ian; Negrodo, Ana I et al. (2010). "Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: Classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations". *Archives of Virology* 155 (12): 2083–103. doi:10.1007/s00705-010-0814-x.PMC 3074192. PMID 21046175.
- [8] Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire, 16 MAY 2014, 89th year / 16 MAI 2014, 89e année, No. 20, 2014, 89, 205–220, <http://www.who.int/wer>
- [9] Nancy Sullivan, Zhi-Yong Yang et Gary J. Nabel, « *Ebola Virus Pathogenesis: Implications for Vaccines and Therapies* », *Journal of Virology*, vol. 77, n° 18, septembre 2003, p. 9733-9737 (PMID 12941881, PMCID224575 DOI 10.1128/JVI.77.18.9733-9737.2003.
- [10] Geisbert TW, Jahrling PB (1995). "Differentiation of filoviruses by electron microscopy". *Virus research* 39(2–3): 129–150. PMID 8837880.
- [11] Adrianna P. P. Zhanga, Zachary A. Bornholdta, Dafna M. Abelsona and Erica Ollmann Saphire, "Crystal Structure of Marburg Virus VP24", Published ahead of print 26 February 2014, doi: 10.1128/JVI.03565-13 *J. Virol.* May 2014 vol. 88 no. 10 5859-5863, W. I. Sundquist, Editor.
- [12] Etude du rôle de la protéine VP24 dans la réplication, la pathogénicité et l'adaptation du virus Ebola par Mathieu Mateo, Soutenue en 2010 à Lyon, École normale supérieure (Sciences), Sous la direction de Viktor Volchkov.
- [13] Adrianna P. P. Zhang, Zachary A. Bornholdt, Tong Liu, Dafna M. Abelson, David E. Lee, Sheng Li, Virgil L. Woods, Jr, and Erica Ollmann Saphire, "The Ebola Virus Interferon Antagonist VP24 Directly Binds STAT1 and Has a Novel, Pyramidal Fold" *PLoS Pathog.* Feb 2012; 8(2): e1002550. Published online Feb 23, 2012. doi: 10.1371/ journal. ppat. 1002550 PMCID: PMC3285596, Félix A. Rey, Editor.
- [14] Zachary A. Bornholdt, Takeshi Noda, Dafna M. Abelson, Peter Halfmann, Malcolm R. Wood, Yoshihiro Kawaoka, and Erica Ollmann Saphire. "Structural Rearrangement of Ebola Virus VP40 Begets Multiple Functions in the Virus Life Cycle". *Cell* 154, 763–774, August 15, 2013 ©2013 Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.015>
- [15] Julie A. Wilson, Mike Bray, Russell Bakken, Mary Kate Hart. "Vaccine Potential of Ebola Virus VP24, VP30, VP35, and VP40 Proteins ". *Virology* 286, 384–390 (2001) doi:10.1006/viro.2001.1012, available online at <http://www.idealibrary.com>
- [16] Mu¨hlberger, E., Weik, M., Volchkov, V. E., Klenk, H.-D., and Becker, S.(1999). Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J. Virol.* 73, 2333–2342.
- [17] Elliott, L. H., Kiley, M. P., and McCormick, J. B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* 147, 169–176.
- [18] Basler, C. F., Wang, X., Mu¨hlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H.-D., Garcí'a-Sastre, A., and Palese, P. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12289–12294.
- [19] Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Mu¨hlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O., and Klenk, H.-D. (2001). Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* 291, 1965–1969.
- [20] Roberta Masella, Rosaria Vari, Massimo D'Archivio, Roberta Di Benedetto, Paola Matarrese, Walter Malorni, Beatrice Scazzocchio, and Claudio Giovannini, "Extra Virgin Olive Oil Biophenols Inhibit Cell-Mediated Oxidation of LDL by Increasing the mRNA Transcription of Glutathione-Related Enzymes1", *J. Nutr.* April 1, 2004 vol. 134 no. 4 785-791.

- [21] Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Huang PL. "Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: part II. integrase inhibition." *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 23;354(4):879-84. Epub 2007 Jan 22. PMID: 17261269 [PubMed - indexed for MEDLINE] PMCID: PMC1857318.
- [22] Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Huang PL. "Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: part I. integrase inhibition." *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 23;354(4):879-84. Epub 2007 Jan 22. PMID: 17261269 [PubMed - indexed for MEDLINE] PMCID: PMC1857318.
- [23] Laura MacPherson, Jason Matthews, "Inhibition of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription by resveratrol or kaempferol is independent of estrogen receptor α expression in human breast cancer cells", *Sciencedirect* Volume 299, Issue 2, 28 December 2010, Pages 119–129, Received 10 May 2010, Revised 11 August 2010, Accepted 13 August 2010, Available online 16 September 2010, DOI: 10.1016/j.canlet.2010.08.010.
- [24] Nose, K. (2002, November 20). Inhibition by flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase II. *Sciencedirect*, Volume 33,(Issue 23,), 3823–3827.
- [25] AFSHAN NAZ, KHALIDA BANO, FARHAT BANO, NAJAF ABBAS GHAFOR AND NAHEED AKHTAR. "CONFORMATIONAL ANALYSIS (GEOMETRY OPTIMIZATION) OF NUCLEOSIDIC ANTITUMOR ANTIBIOTIC SHOWDOMYCIN BY ARGUSLAB 4 SOFTWARE". *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.22, No.1, January 2009, pp.78-82.
- [26] Peng C, Ayali PY, Schlegel HB and Frisch MJ (1995). Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J. Comp. Chem.*, 16: 49-51.
- [27] Bettina Hartlieb, Jens Modrof, and Elke Mühlberger, Hans-Dieter Klenk and Stephan Becker. "Oligomerization of Ebola Virus VP30 Is Essential for Viral Transcription and Can Be Inhibited by a Synthetic Peptide," October 24, 2003 *The Journal of Biological Chemistry* AFFINITY SITES, 278, 41830-41836. doi: 10.1074/jbc.M307036200.
- [28] Gfeller D., Michielin O. & Zoete V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules, *Bioinformatics* (2013) 29:3073-3079.