



HAL
open science

Approches nouvelles pour l'étude des interactions protéine-protéine

Benoît Beganton, Etienne Coyaud, Alain Mangé, Jérôme Solassol

► **To cite this version:**

Benoît Beganton, Etienne Coyaud, Alain Mangé, Jérôme Solassol. Approches nouvelles pour l'étude des interactions protéine-protéine. *Médecine/Sciences*, 2019, 35 (3), pp.223-231. 10.1051/med-sci/2019035 . hal-02371907

HAL Id: hal-02371907

<https://hal.umontpellier.fr/hal-02371907>

Submitted on 20 Nov 2019

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.

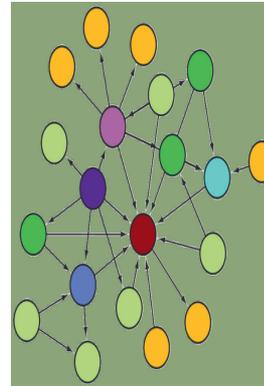
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

► Le protéome est un système dynamique où les interactions protéine-protéine occupent une place essentielle pour modéliser ensemble le phénotype cellulaire. L'identification de ces interactions a toutefois longtemps représenté un obstacle important en protéomique tant les techniques disponibles ne permettaient pas de rendre compte de ces dynamiques d'interactions. Le développement récent du BioID et de l'APEX, deux technologies de marquage de proximité, ouvre aujourd'hui de nouvelles perspectives. Dans cette revue, nous décrivons les outils disponibles pour étudier les interactions protéine-protéine et discutons des progrès récents apportés par les marquages de proximité pour compléter notre vision du protéome et ainsi mieux comprendre les mécanismes cellulaires. ◀

Les interactions protéine-protéine (IPP) jouent un rôle fondamental à tous les niveaux de la cellule que ce soit dans le métabolisme, la signalisation, la prolifération cellulaire, la communication intercellulaire ou encore dans le maintien de l'architecture membranaire. Tous ces processus et fonctions biologiques font intervenir une multitude de protéines qui agissent de concert dans des systèmes complexes et interconnectés. Mais la compréhension d'un processus cellulaire, qu'il soit physiologique ou pathologique, ne se résume plus à la simple identification des partenaires d'un complexe. Elle doit également permettre d'appréhender les principes d'association entre protéines au sein des réseaux d'interactions étudiés. L'analyse des réseaux biologiques et des connexions protéiques directes ou indirectes, transitoires ou durables, nécessite des approches systémiques complexes à la croisée entre différentes disciplines comme la biochimie, la protéomique, la biologie cellulaire ou la bio-informatique. La prise en compte de l'aspect multidimensionnel de l'étude des réseaux d'interaction, et notamment celui de la dynamique spatio-temporelle, pour l'identification des IPP et la construction des interactomes qui en résultent a conduit

Approches nouvelles pour l'étude des interactions protéine-protéine

Benoît Béganton¹, Etienne Coyaud², Alain Mangé¹, Jérôme Solassol¹



¹Département de pathologie et oncobiologie, Laboratoire de biologie des tumeurs solides, CHU de Montpellier, Univ. Montpellier, CHU Arnaud de Villeneuve, avenue du Doyen Giraud, 34295 Montpellier, France ; Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), Inserm U1194, Univ. Montpellier, 34070 Montpellier, France.

²Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, Toronto, Canada. j-solassol@chu-montpellier.fr

ces dernières années à des défis technologiques importants.

Ainsi, afin de répondre à ce challenge, plusieurs techniques ont été développées (Figure 1). Parmi elles, les techniques conventionnelles *in vitro*, comme la purification par affinité (ou l'immunoprécipitation) ou le système double hybride chez la levure, bien que performantes, apparaissent insuffisantes. En effet, ces techniques n'identifient que les interactions fortes sans tenir compte du contexte cellulaire, ne donnant ainsi qu'un reflet partiel des IPP. Elles permettent de mettre en évidence des interactions directes dans des complexes à forte affinité, mais elles ne tiennent pas compte, ou difficilement, de la dynamique spatio-temporelle. De nombreuses IPP ont toutefois pu être identifiées par ces techniques, dont beaucoup sont encore référencées dans des bases de données telles que BioGrid, IntAct, Mint ou DIP.

Récemment, de nouvelles approches ont été proposées pour répondre à ces écueils et permettre d'identifier des interactions *in cellulo* et *in vivo* tout en tenant compte de leurs dimensions spatio-temporelle et transitoire. Il s'agit de techniques de marquage de proximité par des systèmes enzymatiques (ou *proximity-dependent labeling*) comme le BioID (*proximity-dependent biotinylation identification*) ou l'APEX (*engineered ascorbate peroxidase*). Ces approches ouvrent de nouvelles perspectives pour l'identification d'interacteurs en contextes physiologique et pathologique. Elles permettent d'affiner les cartographies des réseaux d'interactions protéiques au niveau cellulaire et appréhendent plus finement les dérégulations des IPP que l'on sait être impliquées dans de nombreuses pathologies.

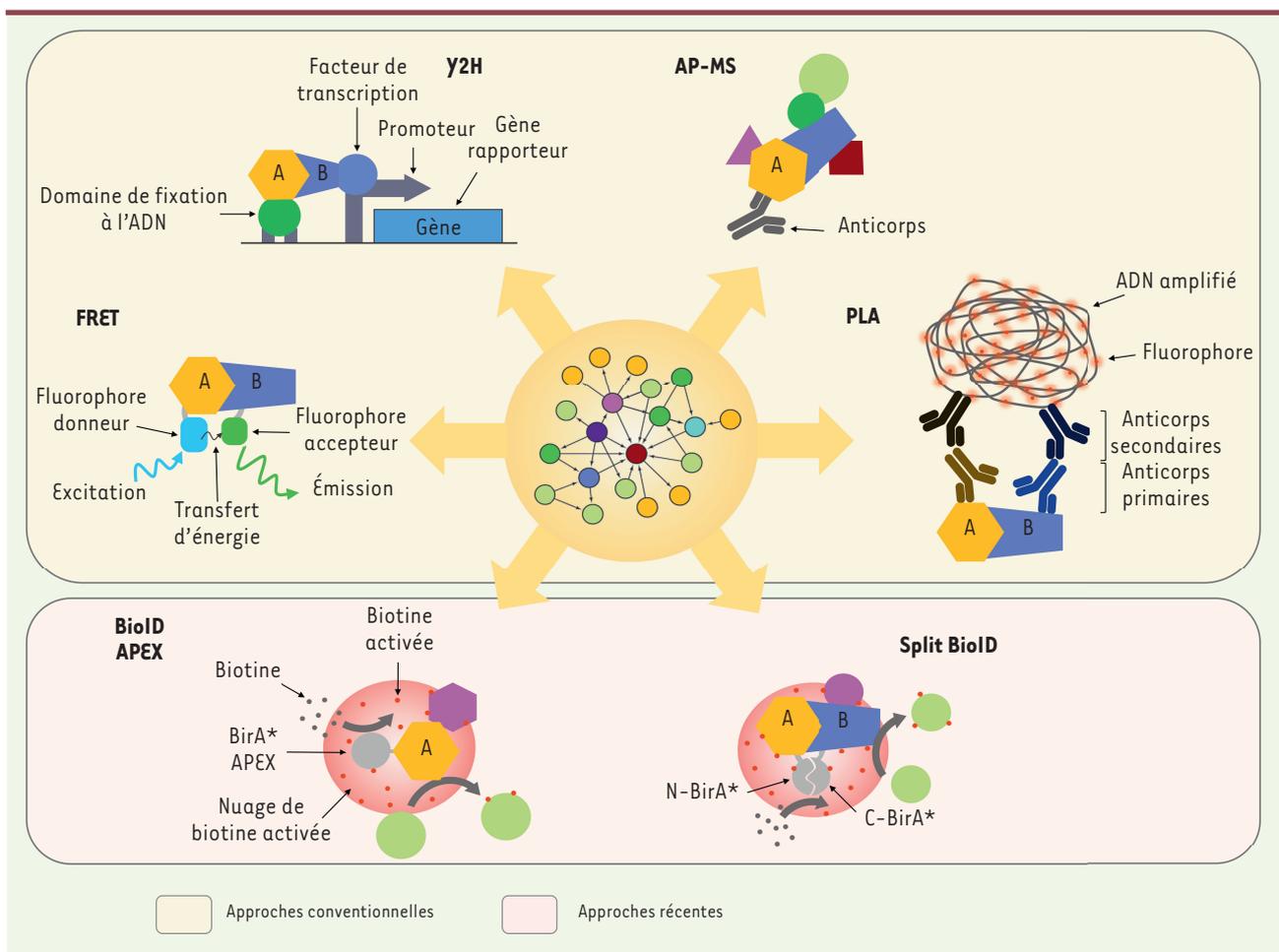


Figure 1. Vue d'ensemble des techniques d'identification des interactions protéine-protéine. Le réseau d'interaction, au centre du disque orange, peut être construit au moyen d'approches conventionnelles (Y2H, AP-MS, FRET, PLA) ou d'approches récentes (APEX, BioID, Split-BioID). Les techniques d'APEX, BioID et AP-MS sont principalement utilisées pour caractériser le réseau d'interactions d'une protéine « A » sans *a priori* d'interactions. À l'inverse, les techniques de Y2H, FRET et PLA sont principalement utilisées pour valider une interaction supposée entre une protéine « A » et une protéine « B ». Les techniques présentées ne sont pas exhaustives. AP-MS : *affinity purification-mass spectrometry* ; APEX : *engineered ascorbate peroxidase* ; BioID : *proximity-dependent biotinylation identification* ; FRET : *Förster resonance energy transfer* ; PLA : *proximity ligation assay* ; Y2H : *yeast-two-hybrid*.

Au travers de cette revue, nous nous proposons de présenter les principales technologies appliquées à l'étude des IPP en nous focalisant plus particulièrement sur les approches *in vivo* de type BioID et APEX, lesquelles nous semblent être, à ce jour, les techniques les plus prometteuses pour l'étude des réseaux d'interactions.

Approches conventionnelles et exploration des réseaux d'IPP

Les purifications par affinité

La purification par affinité, et notamment par immuno-affinité, est une des stratégies les plus couramment utilisées pour identifier les partenaires d'une protéine d'intérêt. Elle consiste, à partir d'un lysat cellulaire plus ou moins complexe, en la purification d'une protéine d'intérêt associée à ses partenaires à l'aide d'un anticorps spécifique [1] (Figure 1). Le lysat protéique peut être obtenu à partir de cellules en

culture ou d'extraits tissulaires en utilisant des conditions de lyses douces et non-dénaturantes essentielles pour préserver au mieux les IPP. Un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt est ajouté au lysat cellulaire. Le complexe protéines-anticorps est ensuite purifié à l'aide de billes de sépharose couplées aux protéines A ou G, lesquelles possèdent une très forte affinité pour la région Fc des immunoglobulines G (IgG) utilisées. Une série de lavage avec une stringence plus ou moins forte permet d'éliminer d'éventuels faux positifs¹. Les complexes protéiques sont ensuite élués des billes en utilisant différents tampons variant en fon-

¹ Les faux positifs sont des composants sans relation avec la protéine d'intérêt qui sont isolés par la méthode.



Approche	Complexes protéiques, compartiments ou fonctions cellulaires ciblés	Protéine d'intérêt	Nombre d'interacteurs uniques identifiés	Nombre moyen d'interacteurs identifiés par protéine	Nombre d'interactions identifiées	Réf	
AP-MS	Tout compartiment		2 235	7	6 463	[4]	
	Tout compartiment		1 092	11 485	11	NA	[51]
	Tout compartiment		1 125	5 400	5	28 500	[3]
	Tout compartiment		2 594	7 668	3	23 744	[6]
	Tout compartiment		5 891	10 961	2	56 553	[5]
Y2H	Tout compartiment		7 200	1 549	NA	2 754	[52]
	Tout compartiment		4 456	5 632	NA	3 269	[53]
	Signalisation cellulaire		473	1 126	NA	2 626	[54]
	Protéines hépatiques		5 026	3 484	NA	2 582	[55]
	Tout compartiment		15 517	4 303	NA	13 944	[56]
BioID	Voie de signalisation Hippo		19	337	18	487	[22]
	Cils cellulaires		58	1 774	31	7 092	[23]
	Histone et complexe Mediator		5	452	90	543	[57]
	Facteur de transcription	SOX2		82	82	82	[24]
	Transport nucléo-cytoplasmique		16	1 252	78	ND	[58]
	Granules de stress et <i>P-bodies</i> associés à l'ARN		119	1 792	15	7 424	[59]
APEX	Matrice mitochondriale	Peptide signal	495	NA	495	[35]	
	Espace intermembranaire mitochondrial	Peptide signal	127	NA	127	[40]	
	Jonction RE-MP	STIM1	38	38	38	[60]	
	Cils cellulaires	NPHP3	162	162	622	[61]	
	Granules de stress	G3BP1	123	123	123	[37]	

Tableau 1. Sélection d'études d'interactomes. Comparativement aux techniques d'AP-MS et de Y2H, le BioID et l'APEX permettent d'identifier plus largement les interacteurs de protéines d'intérêt. AP-MS : *affinity purification-mass spectrometry* ; APEX : *engineered ascorbate peroxidase* ; BioID : *proximity-dependent biotinylation identification* ; NA : non applicable ; ND : non disponible ; RE-MP : réticulum endoplasmique-membrane plasmique ; Y2H : *yeast-two-hybrid* ; STIM1 : *stromal interaction molecule 1* ; NPHP3 : *nephrocystin 3* ; G3BP1 : *G3BP stress granule assembly factor 1* ; SOX2 : *SRY (sex-determining region Y)-box 2*.

tion des analyses ultérieures : *western-blot* ou ELISA pour confirmer des interactions supposées, et spectrométrie de masse pour identifier plus largement les protéines constituant les complexes purifiés [2]. La grande popularité de cette technique a conduit à sa large utilisation et à la publication d'articles majeurs décryptant les réseaux d'interactions protéine-protéine à l'échelle entière du protéome, et notamment humain (Tableau 1). Ces articles ont mis à disposition une quantité

massive de données utilisées par l'ensemble de la communauté scientifique et ont été à l'origine d'avancées majeures des connaissances en biologie [3-5].

Cette approche présente un certain nombre d'avantages (Tableau II). Grâce aux conditions de lyse douce, il est possible de purifier la protéine d'intérêt et ses interacteurs dans des conditions quasi physiologiques,

Approche	AP-MS	APEX	BioID	FRET	PLA	Y2H
Mécanisme	Purification par affinité de complexes protéiques (principalement par immunoprécipitation)	Marquage proximal avec de la biotine activée	Marquage proximal avec de la biotine activée	Émission de fluorescence par transfert d'énergie de résonance entre fluorophores	Détection de fluorescence conjuguée à de l'ADN amplifié	Expression d'un gène rapporteur par complémentarité de deux domaines fonctionnels
Période d'identification	À un instant donné	Quelques minutes	~24 heures	À un instant donné	À un instant donné	À un instant donné
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> Identification d'interactions directes Possibilité d'étiqueter la protéine cible Peut être quantitative 	<ul style="list-style-type: none"> Marquage <i>in vivo</i> Identification d'interactions fortes, faibles et transitoires Adapté à l'étude de protéines membranaires Faux-positifs limités 	<ul style="list-style-type: none"> Marquage <i>in vivo</i> Identification d'interactions fortes, faibles et transitoires Adapté à l'étude de protéines membranaires Faux-positifs limités 	<ul style="list-style-type: none"> Identification d'interactions directes Identification de l'interaction <i>in vivo</i> Visualisation de la localisation de l'interaction 	<ul style="list-style-type: none"> Facilité technique et rapidité de l'expérience Visualisation de la localisation de l'interaction Possibilité d'étiqueter les protéines cibles 	<ul style="list-style-type: none"> Facilité de culture Outils moléculaires à disposition nombreux Automatisation des cribles
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> Non adapté à l'étude de protéines membranaires Risque de faux-positifs 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessite de générer une protéine de fusion Taille de l'enzyme APEX (~28 kDa) Stress oxydatif par le substrat (peroxyde d'hydrogène) 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessite de générer une protéine de fusion Taille de l'enzyme BirA* (~32 kDa) La biotinylation peut perturber le comportement cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessite des anticorps validés en immunochimie Expérience onéreuse 	<ul style="list-style-type: none"> Utilisation de matériel fixé Nécessite des anticorps validés en immunochimie Expérience onéreuse 	<ul style="list-style-type: none"> Contexte cellulaire non pertinent Modifications post-traductionnelles non-exhaustives Taux élevé de faux-positifs
Applicable sur modèles cellulaires ou animaux	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	NA
Applicable sur échantillons cliniques	Oui	Non	Non	Non	Oui	NA
Lecture	Spectrométrie de masse <i>Western-blot</i>	Spectrométrie de masse <i>Western-blot</i>	Spectrométrie de masse <i>Western-blot</i>	Microscopie	Microscopie	Culture par sélection

Tableau II. Particularités, avantages et inconvénients des techniques d'identification des IPP. AP-MS : affinity purification-mass spectrometry ; APEX : engineered ascorbate peroxidase ; BioID : proximity-dependent biotinylation identification ; FRET : Förster resonance energy transfer ; NA : non applicable ; PLA : proximity ligation assay ; Y2H : yeast-two-hybrid.

dans leur conformation native et en préservant leurs modifications post-traductionnelles. Par des analyses séquentielles, il est également possible d'étudier les IPP au cours du temps en réponse, par exemple, à un stimulus. La relative simplicité de sa mise en œuvre en fait une approche de choix pour caractériser les réseaux d'interactions protéiques des cellules eucaryotes et pour en révéler toute l'étendue et la complexité [3, 6]. Parmi les inconvénients des approches de purification par immuno-affinité, on peut noter qu'elles ne permettent pas, ou très difficilement, d'étudier des interactions protéiques transitoires ou de faible affinité. Par ailleurs, les conditions de lyse et de lavage à faible stringence, nécessaires à la purification des complexes protéiques, présentent des écueils majeurs parmi lesquels on retrouve l'impossibilité d'étudier ou de caractériser des protéines faiblement solubles comme les protéines membranaires, ainsi que l'existence de nombreux faux positifs associés aux complexes purifiés sans qu'ils en soient spécifiques (Figure 2). Enfin, cette technique nécessite d'utiliser des anticorps ayant une haute spécificité et une forte affinité pour la protéine d'intérêt, limitant fréquemment les possibilités d'étude de certaines protéines pour lesquelles ces anticorps n'existent pas ou n'ont pas ces qualités.

Pour des cellules en culture, la protéine d'intérêt peut également être étiquetée avec un peptide (GFP [*green fluorescent protein*], FLAG-TAG², etc.), ce qui permet d'utiliser des anticorps de hautes spécificité et affinité vis-à-vis de ces étiquettes et d'améliorer les étapes de purification. C'est le principe utilisé par la méthode TAP (*tandem affinity purification*) qui utilise un double étiquetage de la protéine et une double purification d'affinité afin d'augmenter la spécificité et limiter le taux de faux positifs [7]. D'autres approches, comme le « *pull-down* » qui repose sur des protéines « appât » réactives, permettent de s'affranchir de l'utilisation d'anticorps spécifiques.

Le système de double-hybride chez la levure

Développée à la fin des années 1980 [8], l'approche *double-hybride* utilise la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour explorer des IPP binaires. Ce système est fondé sur la complémentarité de différents domaines isolés de facteurs de transcription de la levure pour activer un gène rapporteur et ainsi produire un signal quantifiable : la protéine d'intérêt est fusionnée à un domaine de fixation à l'ADN et les protéines cibles à un domaine d'activation de la transcription. Si les deux protéines interagissent entre elles, le complexe devient fonctionnel et active la transcription d'un gène rapporteur (Figure 1). Les domaines de fixation à l'ADN et d'activation sont généralement issus du facteur de transcription GAL4. Plusieurs gènes rapporteurs peuvent être utilisés, comme des gènes contrôlant la croissance de la cellule ou le gène *lacZ* codant la β -galactosidase nécessaire au crible blanc/bleu révélateur de l'IPP³ [9]. Il peut s'agir d'approches séquentielles évaluant des interactions supposées, l'une après les autres, ou d'approches matricielles à haut débit. Ces dernières sont fondées sur le criblage de banques d'ADN complémentaires et permettent de tester plus

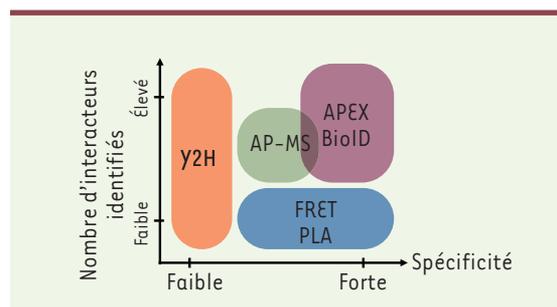


Figure 2. Spécificité et résolution des techniques d'identification des interactions protéine-protéine. Répartition des techniques d'AP-MS, APEX, BioID, FRET, PLA et Y2H, selon le nombre d'interactions identifiées par expérience (résolution) et la spécificité des interactions protéiques observées. Sont représentées certaines des techniques d'identification à haut/moyen débit (APEX, BioID, Split BioID, AP-MS, Y2H) ou à bas débit (Y2H, FRET, PLA). Les techniques de marquage de proximité (APEX, BioID) sont aujourd'hui les techniques les plus résolutes et les plus spécifiques. Le terme BioID utilisé dans la figure correspond au BioID et au Split-BioID. AP-MS : *affinity purification-mass spectrometry* ; APEX : *engineered ascorbate peroxidase* ; BioID : *proximity-dependent biotinylation identification* ; FRET : *Förster resonance energy transfer* ; PLA : *proximity ligation assay* ; Y2H : *yeast-two-hybrid*.

de 6 000 interactions différentes en un nombre réduit d'expériences [10,11]. L'ensemble de ces méthodes a permis des analyses à l'échelle du protéome, en particulier humain, et a révélé, comme pour les purifications d'affinité, de larges réseaux d'interactions incluant plusieurs centaines, voire parfois plusieurs milliers de partenaires (Tableau I). D'autres études, à une échelle plus réduite, ont permis d'identifier des mécanismes biologiques de maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington [12], ou des interacteurs de protéines surexprimées dans plusieurs cancers [13]. Le système *double-hybride* a donc été très largement utilisé ces dernières années et a permis de déterminer un grand nombre d'interactions référencées dans les bases de données. Cependant, il présente un certain nombre d'inconvénients (Tableau II). S'il permet, en effet, d'identifier des IPP binaires permanentes, il révèle difficilement les interactions transitoires et, à l'inverse, un trop grand nombre d'interactions qui ne sont pas physiologiques (avec des taux de faux positifs estimés entre 25 et 45 %) [14] (Figure 2). De plus, plusieurs interactions ne sont pas identifiées par cette technique en raison de problèmes liés à l'apparition d'une toxicité, à l'altération de la structure des protéines fusionnées à GAL4, aux modifications post-traductionnelles propres aux levures qui sont parfois inadaptées aux

² Un peptide de 8 acides aminés de séquence DYKDDDDK.

³ La β -galactosidase permet d'obtenir des clones de levures de couleur bleue lorsqu'elle est exprimée.

protéines étudiées, ou encore à la localisation particulière d'un des partenaires (protéines membranaires). Plusieurs études pointent également la faible reproductibilité des résultats obtenus lors d'analyses indépendantes [9]. Des évolutions méthodologiques ont toutefois permis de lever certaines limites, comme la méthode *yeast-3-hybrid* qui détermine les interactions entre 3 protéines [15], ou la méthode MYTH (*membrane yeast two-hybrid*) qui utilise la complémentarité de l'ubiquitine pour étudier l'interaction entre deux protéines membranaires [16]. Pour une vision plus exhaustive des méthodes d'identification des interactions protéine-protéine chez la levure, le lecteur pourra se référer à la revue de Anna Brückner *et al.* [17].

Exploration des réseaux d'IPP par marquage de proximité : une nouvelle vision

Comme nous l'avons vu, la plupart des méthodes développées pour étudier les IPP sont limitées à l'identification d'interactions fortes, essentiellement permanentes et à un instant donné et, parfois, dans un contexte cellulaire non adapté. Elles sont également peu ou pas appropriées pour l'analyse de protéines membranaires. Deux techniques récentes d'analyse *in vivo* des IPP permettent de lever ces limitations : les techniques de marquage de proximité BioID et APEX. Le marquage de proximité repose sur la fusion d'une protéine d'intérêt à une enzyme, la biotine ligase BirA pour le BioID, et l'ascorbate peroxydase pour l'APEX. Lorsqu'elles sont actives, ces enzymes génèrent un produit réactif qui diffuse autour de la protéine d'intérêt à laquelle elles sont liées et des protéines environnantes. Il induit ainsi un marquage de proximité covalent qui permet de les purifier et de les identifier (*Figure 1*) (pour revue, voir [18, 19]).

Le BioID : *proximity-dependent biotinylation identification*

Développée en 2012, le BioID utilise la capacité naturelle de l'enzyme BirA à biotinyler les protéines [20]. Cette enzyme bactérienne, isolée d'*Escherichia coli*, est un co-facteur de l'acétyl-CoA carboxylase. Elle a pour fonction de biotinyler une de ses sous-unités et de réguler l'opéron biotine. Dans l'approche BioID, et en présence d'ATP et de biotine, BirA va générer l'espèce réactive biotinoyl-5'-AMP (biotin-AMP), la retenir dans son site actif, et faciliter son transfert sur un résidu lysine d'une protéine cible. Afin de permettre un marquage plus large des protéines à proximité, un variant de BirA (BirA*, portant la mutation p.R118G) est utilisé. BirA* a une affinité plus faible pour la biotin-AMP que BirA, ce qui permet la libération du site actif et la biotinylation des protéines environnantes dans un rayon de 10 nm [21]. Ce marquage est en général effectué sur une durée de 24 heures, permettant de retranscrire la dynamique des interactions protéiques, notamment les interactions transitoires, dans des conditions physiologiques, et avec une bonne fiabilité (*Figure 2*). Un des autres avantages du BioID est de pouvoir utiliser des conditions stringentes de lyse et de lavage lors de la purification par affinité, permettant ainsi de solubiliser les protéines membranaires, de les identifier, d'augmenter la pureté des échantillons et limiter le taux de faux positifs, et de mettre en évidence les IPP faibles et transitoires, ce qui est habituellement

impossible avec les techniques classiques (*Tableau II*). Cette approche a ainsi permis de caractériser à large échelle l'interactome de la voie de signalisation Hippo, qui oscille rapidement d'un état inactif à actif en réponse aux stimulus de l'environnement cellulaire [22], ou de cartographier le réseau d'interactions de plus de 58 protéines localisées à l'interface des centrosomes et des cils dans les cellules humaines [23]. En cancérologie, et plus particulièrement dans le cas des carcinomes pulmonaires épidermoïdes, le BioID a, pour la première fois, permis de révéler l'implication d'EP300 (*E1A-binding protein p300*), une histone acétyl-transférase, comme interacteur spécifique du facteur de transcription SOX2 (*SRY[sex-determining region Y]-box 2*) et son rôle clef dans la différenciation et la croissance tumorale [24] (*Tableau I*). En 2015, le BioID a aussi permis, en utilisant des xénotreffes de cellules humaines, d'identifier de nouveaux interacteurs de c-Myc, un proto-oncogène découvert il y a presque 40 ans et dont la compréhension reste toujours incomplète [25,26]. Dans le domaine des maladies infectieuses, le BioID a été utilisé avec succès dans l'étude de la transmission à l'homme du parasite *Plasmodium berghei* au travers de l'identification de MTRAP (*merozoite-specific thrombospondin-related anonymous protein*), une protéine libérée par le parasite lors du processus d'invasion et qui interagit avec l'aldolase de l'hôte [27]. Enfin, le BioID a été transposé avec succès en biologie végétale, notamment par l'étude du facteur de transcription OsFD2 (impliqué dans le développement des feuilles) dans les protoplastes de riz [28]. Il fait ainsi désormais partie des outils d'étude des interactions protéine-protéine pour les botanistes [29, 30]. Bien que cette approche présente de nets avantages par rapport aux approches classiques, on peut néanmoins noter qu'elle est associée à quelques inconvénients. Ainsi, elle nécessite la présence et l'accès de lysines à la surface des protéines d'intérêt pour en permettre la biotinylation par BirA*. Par ailleurs, BirA* est une protéine de taille relativement importante par rapport aux étiquettes plus classiques comme l'hémagglutinine (HA) ou FLAG-TAG (32 kDa *versus* 1 kDa). Cette contrainte peut altérer la structure de la protéine cible et/ou en modifier le comportement ou l'activité. Les biotinylations des lysines sur la protéine cible peuvent également altérer son comportement vis-à-vis de ses interacteurs (*Tableau II*). Précisons que le temps nécessaire à la biotinylation des protéines est relativement long (environ 24 heures), ce qui n'est pas adapté à l'identification d'interactions protéiques à cinétique rapide. Ainsi, des biotine ligases de tailles plus réduites et à activités enzymatiques plus élevées continuent

d'être recherchées ou développées afin d'améliorer la caractérisation des réseaux d'interactions protéiques. Grâce à un temps de marquage réduit (environ 10 min), le TurboID présente ainsi un avantage significatif comparé au BioID pour donner une résolution précise des interactomes [31].

Un écueil généralement attribué aux techniques de marquages de proximité est le risque d'identifier des protéines proches de la protéine d'intérêt, mais qui sont en fait en dehors de son réseau d'interaction. Les approches combinées de BioID et de purification d'affinité permettent alors de remédier à cet écueil, identifiant, en une seule expérience, les interactions directes et proximales de la protéine d'intérêt [32].

Au final, le BioID offre une nouvelle approche pour l'analyse des réseaux d'interactions et permet de mettre en évidence des interactions de proximité décrivant l'environnement local dans lequel ces interactions se réalisent.

Le split BioID

Une variante conditionnelle du BioID a été proposée très récemment [33]. Dans cette approche, deux domaines fonctionnels de BirA* sont fusionnés à deux interacteurs d'intérêt. Lorsque ces deux protéines se rencontrent, les deux domaines de BirA* interagissent également, rendant l'enzyme fonctionnelle. Ce n'est donc que lorsque le complexe protéique est formé que la biotine-AMP sera générée et pourra biotinyler les interacteurs du complexe étudié (Figure 1) [33]. Cette approche permet donc de réduire significativement le spectre des IPP pour ne s'intéresser qu'aux interacteurs spécifiques du complexe protéique étudié [33, 34].

Le marquage par l'ascorbate peroxydase (APEX)

La méthode APEX, développée en 2013, repose sur le même principe que le BioID [35]. Elle utilise une enzyme différente, l'ascorbate peroxydase monomérique, pour biotinyler les protéines présentes à proximité d'une protéine d'intérêt (Figure 1). En présence de peroxyde d'hydrogène, cette enzyme oxyde le biotine-phénol en biotine-phénoxy, un radical à demi-vie courte (moins de 2,5 ms) qui va se lier de façon covalente avec les acides aminés riches en électrons, tels que les tyrosines, les tryptophanes, les histidines et les cystéines, et ceci dans un rayon d'environ 20 nm autour de la protéine cible. La principale différence avec le BioID réside dans la durée d'incubation nécessaire pour biotinyler les protéines, beaucoup plus courte avec le peroxyde d'hydrogène (entre une minute à quelques heures) du fait de la toxicité du composé sur les cellules. Comme pour BirA, un variant de l'APEX (APEX2, p.A134P) a été développé pour augmenter l'efficacité catalytique de l'enzyme et permettre des études sur des niveaux d'expression plus faibles de la protéine d'intérêt [36]. Si l'APEX propose une description rétrospective des interactions protéiques un peu moins large que ne le fait le BioID, cette technique est néanmoins particulièrement adaptée à l'identification spécifique des interactions protéiques transitoires dans une fenêtre de temps courte (Figure 2 et Tableau II). C'est le cas, par exemple, des réseaux d'interactions de protéines de signalisation cellulaire dont l'activation est très rapide. L'approche APEX a été utilisée dans quelques applications cliniques,

dont une étude sur les granules de stress, des agrégats de ribonucléoprotéines impliquées notamment dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer [37], ou une étude sur le protéome des gouttelettes lipidiques retrouvées dans des maladies du métabolisme comme le diabète [38]. Dans les deux cas, des réseaux protéiques denses jusqu'alors inconnus ont pu être mis en évidence, ouvrant de nouvelles voies dans la compréhension de ces maladies et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'APEX, comme le BioID, sont des techniques transposables chez des organismes multicellulaires comme la souris et la drosophile, ce qui marque un pas de plus dans la caractérisation des interactions protéiques dans un contexte *in vivo* pertinent [25, 39]. Au-delà de l'étude des réseaux d'interactions, l'approche APEX permet également de réaliser des cartographies protéiques d'organelles ou de compartiments subcellulaires, comme la matrice mitochondriale ou l'espace inter-membranaire mitochondrial (Tableau I) [35, 40]. Mais comme le BioID, l'APEX présente un certain nombre d'inconvénients. Elle nécessite notamment, comme pour BirA, une accessibilité des acides aminés pour un marquage efficace des complexes protéiques. L'exposition au peroxyde d'hydrogène peut également modifier la physiologie de la cellule en activant des voies de signalisation en réponse au stress oxydatif, ou la dynamique des organelles, ou les interactions protéiques dans leur ensemble (Tableau II).

Après leur isolement, l'identification des interacteurs pourra être réalisée par spectrométrie de masse. Si cette méthode fournit une vision plus exhaustive que les techniques plus traditionnelles comme le *western blot*, elle induit, en elle-même, plus de complexité dans les analyses. Plusieurs méthodes d'analyses statistiques des données recueillies sont en effet proposées ; elles impactent directement le nombre d'interacteurs qui seront identifiés [41, 42]. Il est donc finalement nécessaire de s'interroger sur la méthode de sélection des interacteurs, selon la question biologique que l'on se pose.

Les méthodes *in situ* de validation des interactions protéiques

Lorsqu'une interaction protéique est révélée, elle nécessite généralement d'être confirmée par une technique différente. Des méthodes à plus faible débit ont donc été développées, comme le PLA (*proximity ligation assay*) et les techniques de transfert d'énergie de résonance, comme le FRET (*Förster resonance energy transfer*) ou le BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*). Ces approches permettent d'évaluer

l'interaction entre deux candidats par l'émission d'un signal lumineux lorsque l'interaction protéine-protéine est effective (Figure 1).

Le PLA (proximity ligation assay)

Le PLA, parfois appelé *in situ* PLA (isPLA), est une méthode de détection des interactions entre deux protéines par fluorescence [43]. Les deux protéines cibles sont détectées par des anticorps spécifiques, qui seront révélés par des anticorps secondaires (des anticorps anti-anticorps) conjugués à des oligonucléotides. Si les deux protéines sont dans un environnement proche (moins de 40 nm), les oligonucléotides respectifs pourront s'hybrider et former un brin d'ADN circulaire qui, après ligation, sera amplifié par PCR (*polymerase chain reaction*) en cercle roulant, générant un ADN simple brin composé de copies répétées. La présence de nucléotides préalablement marqués par des fluorophores permettra la détection de l'ADN amplifié par microscopie de fluorescence (Figure 1) [44]. Cette technique est adaptée à la détection de tous types d'interactions protéiques impliquant notamment des protéines membranaires, nucléaires ou cytosoliques [45, 46]. Elle peut être adaptée à différents types d'échantillons, qu'il s'agisse de cellules fixées ou de coupes de tissus fixés ou congelés (Tableau II). Cette approche a ainsi permis de quantifier l'interaction entre l'EGFR, le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*), et la protéine adaptatrice GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), et d'utiliser cette mesure comme marqueur prédictif de la survie globale de patients présentant un adénocarcinome pulmonaire et traités par les inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR de première génération, indépendamment du statut mutationnel du gène *EGFR* [47].

Les techniques de transfert d'énergie de résonance

Comme le PLA, la technique FRET permet de détecter *in vivo* les interactions directes entre deux protéines par émission de fluorescence. Cette approche nécessite cependant une ingénierie moléculaire afin de faire exprimer par les cellules étudiées, les protéines d'intérêts fusionnées à un fluorophore donneur (pour l'une) et un fluorophore accepteur (pour l'autre). Lorsque les deux protéines fusionnées, qui sont exprimées dans les cellules, ont interagi, le fluorophore donneur est alors excité par un stimulus lumineux ; il transfère son énergie par résonance au fluorophore accepteur, lequel émet à son tour un signal fluorescent à une longueur d'onde spécifique [48] (Figure 1). L'avantage de cette technique est de permettre une analyse dynamique des interactions *in vivo* sur des cellules en culture. La spécificité du transfert d'énergie entre donneur et accepteur réduit également significativement le taux de faux positifs (Figure 2). Néanmoins, une des limitations de cette approche est qu'elle n'est pas applicable à des échantillons cliniques que l'on ne peut transfecter afin d'exprimer les protéines fusionnées, comme des coupes de tissus (Tableau II).

Le BRET exploite le même principe de transfert d'énergie de résonance que le FRET à la différence qu'il ne nécessite pas de source extérieure de lumière [49]. Le signal lumineux d'excitation est, dans ce cas, produit par une enzyme, la luciférase par exemple, qui émet de la lumière lorsqu'elle est en contact avec son substrat. Ceci permet un transfert d'énergie dans un rayon réduit d'environ 10 nm. Le BRET remédie à

certaines écueils du FRET, comme l'auto-fluorescence, la perte de fluorescence par photoblanchiment (*photobleaching*) et la diffusion dynamique de la lumière (*light scattering*) [50].

Conclusion

Malgré des contraintes techniques évidentes, les purifications d'affinité ont longtemps constitué les approches de référence pour la caractérisation des réseaux d'interactions protéiques. Les outils d'étude des IPP continuent d'évoluer et, aujourd'hui, nous disposons d'approches permettant des analyses fines de ces réseaux. Le développement récent des marquages de proximité offre désormais la possibilité de concevoir de façon radicalement nouvelle les réseaux d'interactions, avec une cartographie dynamique de plus en plus précise, et ce, dans des domaines qui ont été jusqu'à maintenant seulement explorés de façon séquentielle. Ce nouveau regard porté sur les interactions protéine-protéine permet d'envisager un large champ d'applications, allant de l'identification de cibles thérapeutiques ou de biomarqueurs, jusqu'à l'exploration fonctionnelle de mécanismes biologiques. ♦

SUMMARY

New approaches for protein-protein interaction study

The proteome is a dynamic system in which protein-protein interactions play a crucial role to model together the cellular phenotype. However, given the inherent limitation of the available technologies to depict the dynamic nature of these interactions, identify protein-protein interaction has for a long time represented an important challenge in proteomic. The recent development of BioID and APEX, two proximity-dependent labeling technologies, opens today new perspectives and yet start changing our vision of protein-protein interaction, and more globally our vision of the proteome. In this review, we describe the recent and conventional tools available to study protein-protein interactions, compare the advantages and limitations of these techniques, and discuss the recent progress brought by the proximity-dependent labelling to complete our vision of the proteome, and thus better understand cellular mechanisms. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Urh M, Simpson D, Zhao K. Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol* 2009 ; 463 : 417-38.

RÉFÉRENCES

2. Have S ten, Boulon S, Ahmad Y, Lamond AI. Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics – the user's guide. *Proteomics* 2011 ; 11 : 1153-59.
3. Hein MY, Hubner NC, Poser I, et al. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell* 2015 ; 163 : 712-23.
4. Ewing RM, Chu P, Elisma F, et al. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 2007 ; 3 : 89.
5. Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* 2017 ; 545 : 505-9.
6. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, et al. The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome. *Cell* 2015 ; 162 : 425-40.
7. Gerace E, Moazed D. Affinity purification of protein complexes using TAP tags. *Methods Enzymol* 2015 ; 559 : 37-52.
8. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989 ; 340 : 245-46.
9. Hamdi A, Colas P. Yeast two-hybrid methods and their applications in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2012 ; 33 : 109-18.
10. Uetz P, Giot L, Cagney G, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2000 ; 403 : 623-27.
11. Ito T, Chiba T, Ozawa R, et al. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 4569-74.
12. Tourette C, Li B, Bell R, et al. A large scale Huntingtin protein interaction network implicates Rho GTPase signaling pathways in Huntington disease. *J Biol Chem* 2014 ; 289 : 6709-26.
13. Shahheydari H, Frost S, Smith BJ, et al. Identification of PLP2 and RAB5C as novel TPD52 binding partners through yeast two-hybrid screening. *Mol Biol Rep* 2014 ; 41 : 4565-72.
14. Huang H, Jedynak BM, Bader JS. Where have all the interactions gone? Estimating the coverage of two-hybrid protein interaction maps. *PLoS Comput Biol* 2007 ; 3 : e214.
15. Zhang J, Lauter S. A Yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal Biochem* 1996 ; 242 : 68-72.
16. Johansson N, Varshavsky A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 10340-44.
17. Brückner A, Polge C, Lentze N, et al. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* 2009 ; 10 : 2763-88.
18. Gingras A-C, Abe KT, Raught B. Getting to know the neighborhood: using proximity-dependent biotinylation to characterize protein complexes and map organelles. *Curr Opin Chem Biol* 2018 ; 48 : 44-54.
19. Kim DI, Roux KJ. Filling the void: proximity-based labeling of proteins in living cells. *Trends Cell Biol* 2016 ; 26 : 804-17.
20. Roux KJ, Kim DI, Raida M, et al. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 2012 ; 196 : 801-10.
21. Kim DI, Kc B, Zhu W, et al. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : E2453-61.
22. Couzens AL, Knight JDR, Kean MJ, et al. Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal* 2013 ; 6 : rs15.
23. Gupta GD, Coyaud E, Gonçalves J, et al. A Dynamic protein interaction landscape of the human centrosome-cilium interface. *Cell* 2015 ; 163 : 1484-99.
24. Kim BR, Coyaud E, Laurent EMN, et al. Identification of the SOX2 interactome by BioID reveals EP300 as a mediator of SOX2-dependent squamous differentiation and lung squamous cell carcinoma growth. *Mol Cell Proteomics* 2017 ; 16 : 1864-88.
25. Dingar D, Kalkat M, Chan PK, et al. BioID identifies novel c-MYC interacting partners in cultured cells and xenograft tumors. *J Proteomics* 2015 ; 118 : 95-111.
26. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 2008 ; 8 : 976-90.
27. Kehrer J, Frischknecht F, Mair GR. Proteomic analysis of the *Plasmodium berghei* gametocyte egressome and vesicular bioID of osmiophilic body proteins identifies merozoite TRAP-like protein (MTRAP) as an essential factor for parasite transmission. *Mol Cell Proteomics MCP* 2016 ; 15 : 2852-62.
28. Lin X, Zhou Z, Luo W, et al. Screening of proximal and interacting proteins in rice protoplasts by proximity-dependent biotinylation. *Front Plant Sci* 2017 ; 8 : 749.
29. Lampugnani ER, Wink RH, Persson S, et al. The toolbox to study protein-protein interactions in plants. *Crit Rev Plant Sci* 2018 ; 1-27.
30. Khan M, Youn JY, Gingras AC, et al. In planta proximity dependent biotin identification (BioID). *Sci Rep* 2018 ; 8 : 9212.
31. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol* 2018 ; 36 : 880-7.
32. Liu X, Salokas K, Tamene F, et al. An AP-MS- and BioID-compatible MAC-tag enables comprehensive mapping of protein interactions and subcellular localizations. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 1188.
33. Schopp IM, Amaya Ramirez CC, Debeljak J, et al. Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 15690.
34. De Munter S, Görnemann J, Derau R, et al. Split-BioID: a proximity biotinylation assay for dimerization-dependent protein interactions. *FEBS Lett* 2017 ; 591 : 415-24.
35. Rhee H-W, Zou P, Udeshi ND, et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* 2013 ; 339 : 1328-31.
36. Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, et al. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods* 2015 ; 12 : 51-4.
37. Markmiller S, Soltanieh S, Server KL, et al. Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules. *Cell* 2018 ; 172 : 590-04.e13.
38. Bersuker K, Peterson CWH, To M, et al. A Proximity labeling strategy provides insights into the composition and dynamics of lipid droplet proteomes. *Dev Cell* 2018 ; 44 : 97-112.e7.
39. Chen CL, Hu Y, Udeshi ND, et al. Proteomic mapping in live *Drosophila* tissues using an engineered ascorbate peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : 12093-98.
40. Hung V, Zou P, Rhee H-W, et al. Proteomic mapping of the human mitochondrial intermembrane space in live cells via ratiometric APEX tagging. *Mol Cell* 2014 ; 55 : 332-41.
41. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 2016 ; 11 : 2301-19.
42. Choi H, Larsen B, Lin ZY, et al. SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods* 2011 ; 8 : 70-3.
43. Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 2006 ; 3 : 995-1000.
44. Söderberg O, Leuchowius K-J, Gullberg M, et al. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods San Diego Calif* 2008 ; 45 : 227-32.
45. Bobrich MA, Schwabe SA, Brobeil A, et al. PTP1B5: a new interaction partner of the insulin receptor and PKA in adipose tissue. *J Obes* 2013 ; 2013 : 476240.
46. Poulard C, Treilleux I, Lavergne E, et al. Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *EMBO Mol Med* 2012 ; 4 : 1200-13.
47. Smith MA, Hall R, Fisher K, et al. Annotation of human cancers with EGFR signaling-associated protein complexes using proximity ligation assays. *Sci Signal* 2015 ; 8 : ra4.
48. Sekar RB, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol* 2003 ; 160 : 629-33.
49. Xu Y, Piston DW, Johnson CH. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 151-6.
50. Couturier C, Deprez B. Setting up a bioluminescence resonance energy transfer high throughput screening assay to search for protein/protein interaction inhibitors in mammalian cells. *Front Endocrinol* 2012 ; 3 : 100.
51. Malovannaya A, Lanz RB, Jung SY, et al. Analysis of the human endogenous coregulator complexome. *Cell* 2011 ; 145 : 787-99.
52. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 2005 ; 437 : 1173-8.
53. Stelzl U, Worm U, Lalowski M, et al. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 2005 ; 122 : 957-68.
54. Vinayagam A, Stelzl U, Foulle R, et al. A directed protein interaction network for investigating intracellular signal transduction. *Sci Signal* 2011 ; 4 : rs8.
55. Wang J, Huo K, Ma L, et al. Toward an understanding of the protein interaction network of the human liver. *Mol Syst Biol* 2011 ; 7 : 536.
56. Rolland T, Ta an M, Charleatoux B, et al. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell* 2014 ; 159 : 1212-26.
57. Lambert JP, Tucholska M, Go C, et al. Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes. *J Proteomics* 2015 ; 118 : 81-94.
58. Mackmull MT, Klaus B, Heinze I, et al. Landscape of nuclear transport receptor cargo specificity. *Mol Syst Biol* 2017 ; 13 : 962.
59. Youn JY, Dunham WH, Hong SJ, et al. High-density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies. *Mol Cell* 2018 ; 69 : 517-32.e11.
60. Jing J, He L, Sun A, et al. Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx. *Nat Cell Biol* 2015 ; 17 : 1339-47.
61. Mick DU, Rodrigues RB, Leib RD, et al. Proteomics of primary cilia by proximity labeling. *Dev Cell* 2015 ; 35 : 497-512.

TIRÉS À PART
J. Solassol