

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont au cœur de nombreux processus physiologiques et représentent des cibles majeures en pharmacologie. L'émergence des senseurs basés sur le transfert d'énergie par bioluminescence (BRET) a permis d'analyser en temps réel les mécanismes d'activation et de signalisation de ces récepteurs dans des cellules vivantes. Initialement développés pour étudier la dissociation des protéines G hétérotrimériques, ces outils ont évolué vers des systèmes sophistiqués capables de détecter le couplage des RCPG, le recrutement de partenaires intracellulaires et la signalisation compartimentée. Ce chapitre propose une synthèse des principales approches développées au cours des deux dernières décennies, incluant les senseurs classiques de dissociation, les mini-protéines G, les capteurs ONE-GO, les stratégies de recrutement membranaire, les senseurs *bystander* et les plateformes intégrées telles que l'EMTA. Les apports conceptuels et les limites de ces approches sont également discutés.

Mots-clés

RCPG, BRET, NanoBRET, protéines G, mini-G, β -arrestine, signalisation compartimentée, biais de signalisation, EMTA

I – INTRODUCTION

Les RCPG constituent une famille essentielle de récepteurs membranaires capables de détecter une grande variété de signaux extracellulaires. Leur activation entraîne un couplage à différentes protéines G ainsi que le recrutement de β -arrestines, conduisant à des réponses cellulaires complexes et finement régulées¹.

Pendant longtemps, l'étude de ces mécanismes s'est appuyée sur des approches indirectes, limitées dans leur capacité à capturer la dynamique et la localisation subcellulaire des événements de signalisation. L'introduction du BRET a marqué une avancée majeure en permettant de suivre en temps réel des interactions protéiques dans des cellules vivantes².

Les développements récents dans ce domaine ont transformé ces techniques en plateformes capables de caractériser la signalisation des RCPG dans toute sa complexité, intégrant la dimension temporelle, spatiale et fonctionnelle.

II - SENSEURS CLASSIQUES : DISSOCIATION DES PROTEINES G

Les premières applications du BRET à l'étude des RCPG ont reposé sur la détection de la dissociation des protéines G hétérotrimériques. Dans ces systèmes, les sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ sont fusionnées à des partenaires BRET. À l'état basal, leur proximité génère un signal élevé. L'activation du récepteur induit une diminution de ce signal, reflétant une réorganisation du complexe³ (**Figure 1**).

¹ Lohse MJ et al., Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2024, 64: 387–415

² Demby A et al., Frontiers in Physiology, 2024

³ Bünemann et al., Nature Methods. 2003; 1(2):105–110.

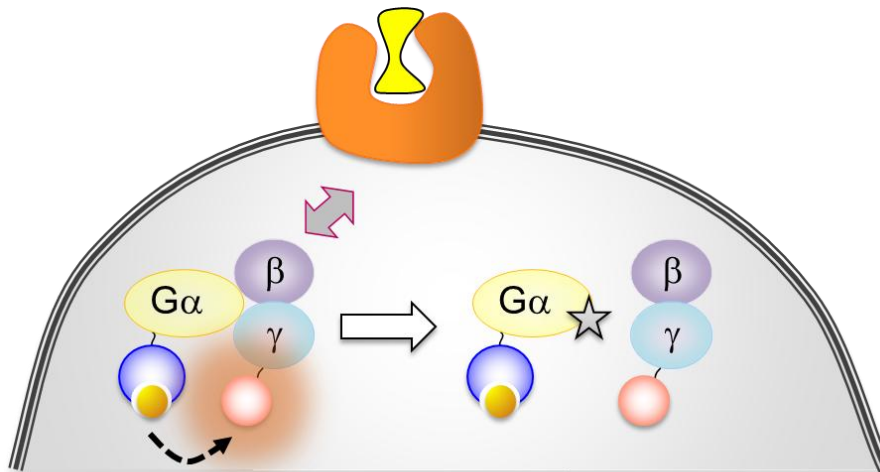


Figure 1. Principe des senseurs BRET de dissociation des protéines G. À l'état inactif, les sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ sont associées, produisant un signal BRET élevé (Luciférase sur $G\alpha$ et Venus sur $G\beta\gamma$). L'activation du RCPG induit un changement de conformation et/ou une dissociation partielle, diminuant le signal BRET et correspondant à l'état actif de la protéine G (étoile sur $G\alpha$).

Les senseurs BRET basés sur la dissociation des protéines G représentent l'une des approches les plus anciennes pour étudier la signalisation des RCPG en cellules vivantes. Leur principal avantage réside dans leur capacité à suivre en temps réel la dynamique d'activation des protéines G en mesurant la réorganisation du complexe hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$ après stimulation du récepteur.

Ces approches sont conceptuellement simples et ont permis d'établir des bases importantes sur la cinétique et la spécificité du couplage des RCPG. Cependant, elles présentent plusieurs limites. La fusion de marqueurs aux sous-unités peut perturber leur assemblage et leur fonctionnement, et la surexpression des protéines G peut introduire des biais expérimentaux. De plus, le signal mesuré reflète un changement de proximité entre sous-unités, dont l'interprétation reste discutée, la dissociation complète de $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ n'étant pas systématique mais pouvant correspondre à des réarrangements conformationnels.

III - SENSEURS ONE-GO

Après les premières approches basées sur la dissociation ou le réarrangement des sous-unités des protéines G, de nouvelles stratégies ont été développées afin de simplifier les systèmes expérimentaux et d'améliorer la robustesse des mesures. Parmi celles-ci, les senseurs de type ONE-GO (One-component G protein sensors) constituent une évolution⁴.

Contrairement aux systèmes BRET classiques nécessitant l'expression de plusieurs partenaires distincts, les senseurs ONE-GO reposent sur des constructions génétiques dans lesquelles les différentes composantes protéiques du test sont codées au sein d'un seul plasmide. Cette organisation permet une expression contrôlée des différentes protéines et garantit des niveaux relatifs plus homogènes, les composants du senseur étant co-exprimés dans une même cellule, ce qui améliore le rapport signal/bruit de l'essai.

Le principe de ces senseurs repose sur la détection du recrutement d'effecteurs spécifiques des protéines G activées. Dans ces systèmes, la sous-unité $G\alpha$ est fusionnée à une protéine fluorescente (Venus), tandis que des effecteurs (peptides liant la protéine $G\alpha$ -GTP) en aval des protéines G sont fusionnés à une luciférase (Rluc), ancré à la membrane plasmique pour positionner le détecteur à proximité des protéines G activées par les RCPG. Ces effecteurs sont des domaines protéiques capables de reconnaître spécifiquement la forme active liée au GTP de certaines sous-unités $G\alpha$, sans nécessairement activer une réponse cellulaire complète. Par exemple, des fragments de p63-RhoGEF sont utilisés pour détecter $G\alpha_q/11$, tandis que des domaines de Rap1GAP permettent de détecter $G\alpha_i/o$ ⁵.

⁴ Janicot R et al., *Cell* 2024

⁵ p63-RhoGEF : facteur d'échange activé par $G\alpha_q$ qui active les petites GTPases Rho et contrôle la dynamique du cytosquelette. Rap1GAP : protéine GAP qui inactive la GTPase Rap1 en accélérant l'hydrolyse du GTP, régulant notamment l'adhésion et la signalisation cellulaire.

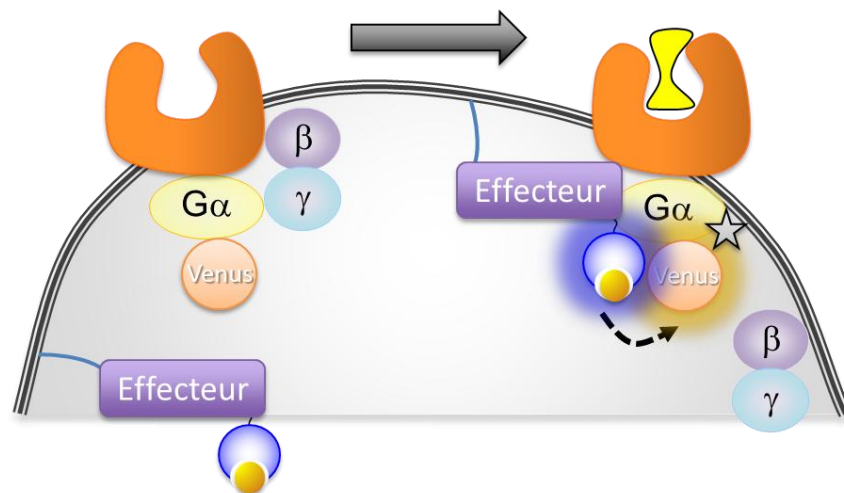


Figure 3. Principe des biosenseurs ONE-GO pour la détection de l'activation des protéines G.

Les senseurs ONE-GO reposent sur l'expression coordonnée, à partir d'un même vecteur, d'une sous-unité $G\alpha$ fusionnée à une protéine fluorescente et d'un module détecteur constitué d'un effecteur spécifique des protéines G fusionné à une luciférase (Rluc ou NanoLuc) et ancré la membrane plasmique. À l'état inactif, $G\alpha$ liée au GDP n'interagit pas avec l'effecteur, ce qui se traduit par un faible signal BRET. Lors de l'activation d'un RCPG par un agoniste, la sous-unité $G\alpha$ échange son GDP contre du GTP et adopte une conformation active capable de recruter l'effecteur. Ce rapprochement entre la protéine fluorescente et la luciférase entraîne une augmentation du signal BRET, proportionnelle à l'activation de la protéine G. Les effecteurs utilisés confèrent une spécificité de détection des différentes familles de protéines G (s, i1/2/3, oA/oB, z, q, 11, 12, 13).

Les senseurs ONE-GO mesurent une interaction fonctionnelle entre $G\alpha$ activée et ses effecteurs. Leur organisation en système unique et leur lecture directe en font des outils particulièrement robustes et adaptés aux modèles cellulaires complexes (neurones...). Ces approches, bien que robustes et informatives, restent limitées à la détection d'interactions ou d'événements moléculaires spécifiques et ne permettent pas d'appréhender pleinement la dimension spatiale de la signalisation des RCPG. Le développement des approches de type *bystander* BRET a permis de dépasser cette limite en intégrant la localisation subcellulaire comme paramètre clé.

IV - SENSEURS BYSTANDER ET SIGNALISATION COMPARTIMENTEE

Les approches de type *bystander* aussi appelées ebBRET⁶ constituent une évolution majeure des senseurs BRET appliqués à l'étude de la signalisation des RCPG. Contrairement aux systèmes classiques, qui reposent sur la détection d'interactions directes ou de dissociation entre deux partenaires protéiques, les senseurs *bystander* exploitent la capacité du BRET à rapporter des changements de proximité spatiale, indépendamment d'une interaction directe. Cette stratégie permet ainsi de suivre des **phénomènes de relocalisation subcellulaire en temps réel dans des cellules vivantes**.

Le principe repose sur l'utilisation d'une sonde dite ebBRET, généralement constituée d'un fluorophore ancré de manière constitutive à un compartiment cellulaire donné, tel que la membrane plasmique, les endosomes ou l'appareil de Golgi. Cet ancrage est assuré par des séquences de ciblage spécifiques, comme le motif CAAX pour la membrane plasmique ou des protéines marqueurs telles que Rab5 pour les endosomes. En parallèle, une protéine mobile d'intérêt, par exemple une β -arrestine, une mini-protéine G ou un effecteur de protéine G, est fusionnée à une luciférase et diffuse librement dans le cytosol à l'état basal.

Lors de l'activation d'un RCPG, cette protéine mobile peut être recrutée vers un compartiment spécifique. En conséquence, ce changement de localisation induit le rapprochement de la luciférase et du fluorophore ancré dans un compartiment membranaire, entraînant une augmentation du signal BRET. Le signal mesuré reflète ainsi la colocalisation dynamique des deux partenaires, plutôt qu'une interaction directe. Cette propriété constitue à la fois la force et la spécificité des approches ebBRET.

⁶ L'ebBRET (enhanced bystander BRET) correspond à une version optimisée du BRET de proximité permettant de détecter la relocalisation subcellulaire des protéines sans interaction directe : bystander = mesure d'une proximité spatiale sans interaction directe ; enhanced = version optimisée avec meilleur couple donneur/accepteur (ex : RlucII / rGFP), meilleur rapport signal/bruit.

Ces senseurs permettent une lecture spatio-temporelle de la signalisation. Ils ont notamment permis de démontrer que les RCPG peuvent continuer à signaler après leur internalisation, en particulier depuis les endosomes, remettant en question le modèle classique d'une signalisation limitée à la membrane plasmique. De plus, ces approches sont particulièrement modulaires : en changeant la séquence d'ancrage de la sonde ebBRET, il est possible de cibler différents compartiments cellulaires et d'explorer la signalisation dans divers contextes subcellulaires.

IV-1. SENSEURS DE RECRUTEMENT MEMBRANAIRE (CAAX)

Les senseurs de type CAAX reposent sur une stratégie dans laquelle un des partenaires du transfert d'énergie est ancré de manière constitutive à la membrane plasmique, indépendamment de l'état d'activation du récepteur⁷. Cet ancrage est assuré par un motif CAAX (Cys–Aliphatic AA–Aliphatic AA⁸–X), situé en C-terminal, qui subit une modification post-traductionnelle de type prénylation (farnésylation ou géranylgéranoylation). Cette modification permet l'insertion stable de la protéine dans la face interne de la membrane plasmique.

Dans ces systèmes, la sonde ancrée à la membrane est généralement fusionnée à un fluorophore (accepteur BRET type rGFP⁹), tandis que la protéine d'intérêt, souvent une protéine G, β -arrestine, une mini-protéine G ou un effecteur de protéine G, est fusionnée à une luciférase (donneur BRET) et diffuse dans le cytosol à l'état basal. En absence de stimulation, les deux partenaires sont spatialement séparés, ce qui génère un signal BRET faible (**Figure 4**).

Lors de l'activation d'un RCPG, les protéines partenaires cytosoliques sont recrutées à la membrane plasmique via leur interaction avec le récepteur. Par exemple, les β -arrestines sont recrutées au récepteur phosphorylé, tandis que certains effecteurs de protéines G peuvent être transloqués à la membrane en réponse à l'activation de $G\alpha$.

⁷ Namkung et al., Nature Com. 2016, 7: 12178

⁸ Acides aminés aliphatiques : Alanine (Ala), Valine (Val), Leucine (Leu), Isoleucine (Ile)

⁹ L'utilisation de Renilla GFP comme accepteur dans les systèmes BRET récents permet un meilleur couplage spectral avec NanoLuc, conduisant à une augmentation du rendement du transfert d'énergie et à une amélioration du rapport signal/bruit par rapport à la Venus.

Ce recrutement rapproche la luciférase du fluorophore ancré via le motif CAAX, entraînant une augmentation du signal BRET.

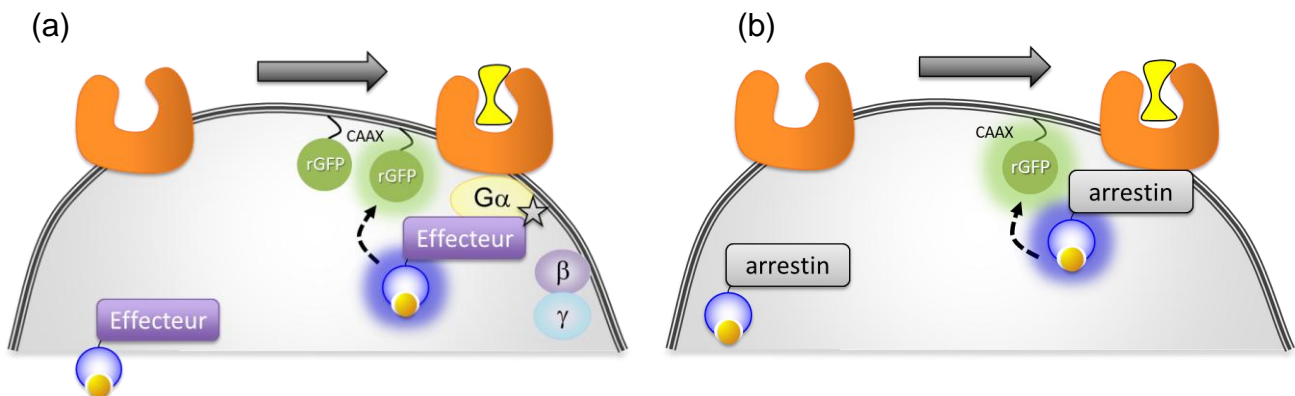


Figure 4. Principe des senseurs BRET de recrutement membranaire basés sur un motif CAAX.

Une sonde fluorescente (accepteur BRET généralement rGFP) est ancrée de manière constitutive à la membrane plasmique grâce à un motif CAAX, qui permet sa prénylation et son insertion dans la face interne de la membrane. La protéine d'intérêt effecteur de la sous-unité $G\alpha$ (a) ou la β -arrestine (b), fusionnée à une luciférase (donneur BRET), est localisée dans le cytosol à l'état basal, ce qui génère un signal BRET faible. Lors de l'activation d'un RCPG, les β -arrestines et effecteurs des protéines G, sont recrutés à la membrane plasmique. Ce rapprochement entre la luciférase et le fluorophore ancré entraîne une augmentation du signal BRET. Le signal mesuré reflète ainsi la relocalisation de la protéine vers la membrane.

L'intérêt principal de cette approche réside dans sa simplicité et sa polyvalence. Elle ne nécessite pas de modifier le récepteur lui-même et permet de suivre différents types d'événements (recrutement de β -arrestine, activation de protéines G via effecteurs, interactions transitoires) avec une configuration expérimentale relativement simple. De plus, elle permet une lecture en temps réel de la cinétique de recrutement.

Cependant, cette stratégie présente certaines limites. Le signal BRET reflète une proximité avec la membrane plasmique plutôt qu'une interaction directe entre partenaires, ce qui peut compliquer l'interprétation.

IV-2. SENSEURS DE COUPLAGE DIRECT : MINI-PROTEINES G

Le développement des mini-protéines G, souvent utilisées en combinaison avec des approches de type CAAX, permet de mesurer directement l'état actif des RCPG¹⁰. En effet, ces protéines tronquées¹¹ se lient sélectivement aux récepteurs activés, permettant une lecture directe du couplage¹².

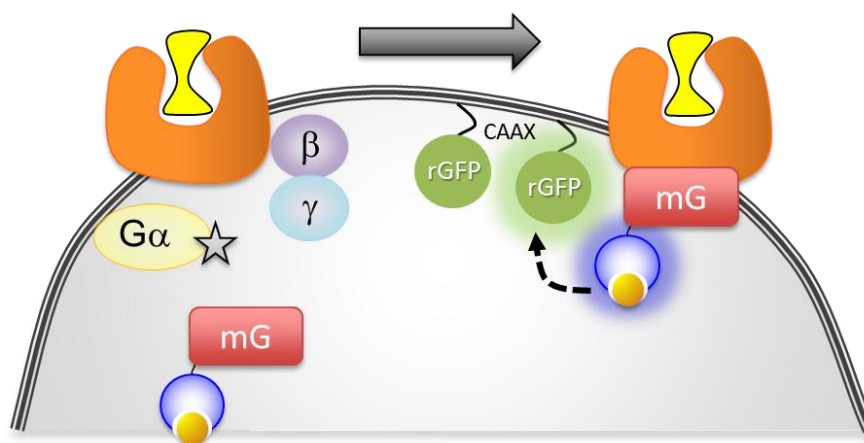


Figure 5. Principe des senseurs mini-G. Les mini-protéines G se lient aux RCPG activés, permettant une détection directe du couplage via une augmentation du signal BRET.

Les mini-protéines G présentent plusieurs atouts qui expliquent leur utilisation dans l'étude des RCPG. En se liant spécifiquement aux récepteurs activés, elles permettent une lecture directe du couplage RCPG–protéine G avec une excellente sensibilité et une bonne spécificité de sous-type (Gs, Gi/o, Gq/11). Leur nature soluble et leur forte affinité pour les récepteurs actifs facilitent leur utilisation dans des approches dynamiques en cellules vivantes.

Toutefois, ces avantages s'accompagnent de limitations importantes. Les mini-protéines G sont des versions tronquées et modifiées de G α , incapables de reproduire le cycle GDP/GTP et de former un complexe avec G $\beta\gamma$, ce qui les rend non fonctionnelles sur le plan de la signalisation en aval. Enfin, leur utilisation fournit

¹⁰ Nehmé R. et al., PNAS, 2017, 114(20): E3822–E3831

¹¹ Versions tronquées et stabilisées des sous-unités G α , dépourvues du domaine hélicoïdal et du cycle GDP/GTP fonctionnel, incapables d'interagir avec G $\beta\gamma$ ou de signaler en aval, mais conservant leur capacité à se lier spécifiquement aux RCPG activés comme biosenseurs.

¹² Wan et al., JBC, 2018, 293(19): 7466–7473

essentiellement une information sur l'état actif du récepteur, sans rendre compte de la complexité des interactions multiprotéiques ni de la signalisation physiologique complète.

IV-3. SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DES RCPG : UN CHANGEMENT DE PARADIGME

La signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) a longtemps été décrite comme un processus se déroulant exclusivement à la membrane plasmique. Dans ce modèle classique, l'activation du récepteur par un ligand entraîne le recrutement et l'activation des protéines G, suivis de l'engagement des β -arrestines qui assurent la désensibilisation du récepteur et son internalisation, conduisant à l'arrêt du signal. Cette vision linéaire a profondément structuré notre compréhension de la pharmacologie des RCPG pendant plusieurs décennies.

Cependant, le développement de biosenseurs optiques en cellules vivantes, et en particulier des approches de type ebBRET, a profondément remis en question ce modèle. En permettant de suivre en temps réel la localisation subcellulaire des récepteurs et de leurs partenaires, ces outils ont révélé que la signalisation des RCPG est en réalité hautement dynamique et compartimentée, impliquant non seulement la membrane plasmique mais également des compartiments intracellulaires tels que les endosomes.

Comme décrit précédemment, les approches ebBRET permettent de suivre la relocalisation subcellulaire des protéines en mesurant des changements de proximité spatiale. Typiquement, un accepteur tel que la rGFP est ancré à la membrane plasmique via un motif CAAX ou Lyn, ou ciblé vers les endosomes précoces grâce à des domaines de type FYVE ou Rab5 (**Figure 6**).

Nom de l'ancre / marqueur	Origine	Localisation ciblée	Principe de ciblage
CAAX	Motif C-terminal de protéines (ex : Ras)	Membrane plasmique	Prénylation (ancrage lipidique)
Lyn (motif N-ter)	Tyrosine kinase Lyn	Membrane plasmique	Myristoylation + palmitoylation
KRas / HRas tail	Protéines Ras	Membrane plasmique	Prénylation + interactions lipidiques
FYVE (endofin)	Domaine FYVE d'endofin	Endosomes précoces	Liaison spécifique au PI3P(phosphatidylinositol-3-phosphate)
Rab5	Petite GTPase Rab5	Endosomes précoces	Association aux membranes endosomales (forme GTP)
Rab7	Petite GTPase Rab7	Endosomes tardifs / lysosomes	Régulation du trafic endosomal tardif
Rab11	Petite GTPase Rab11	Endosomes de recyclage	Régulation du trafic de recyclage endosomal
Golgi (GalT, Giantin)	Protéines du Golgi	Appareil de Golgi	Séquences de ciblage Golgi

Figure 6. Ancres et marqueurs utilisés dans les approches ebBRET pour le ciblage subcellulaire.

Ce tableau présente les principales stratégies d'ancrage utilisées pour cibler des sondes fluorescentes vers différents compartiments cellulaires dans les approches *bystander* BRET. Les ancres membranaires reposent sur des motifs lipidiques courts, tels que CAAX ou le peptide N-terminal de Lyn, permettant un ciblage efficace de la membrane plasmique. Les compartiments intracellulaires sont ciblés à l'aide de domaines ou de protéines spécifiques, tels que le domaine FYVE d'endofin pour les endosomes précoces (via la reconnaissance du PI3P), ou les petites GTPases Rab (Rab5, Rab7, Rab11) qui assurent la spécificité des différents compartiments endosomaux. Des séquences de ciblage dérivées de protéines du Golgi, telles que GalT ou Giantin, permettent également l'adressage à l'appareil de Golgi. L'ensemble de ces stratégies permet d'explorer la compartimentation spatio-temporelle de la signalisation des RCPG en cellules vivantes.

L'utilisation de ces approches a conduit à un changement majeur de paradigme dans la compréhension de la signalisation des RCPG. Alors que le modèle classique postulait que l'internalisation des récepteurs marquait la fin de la signalisation, plusieurs études ont démontré que certains récepteurs continuent de signaler après leur endocytose. En particulier, il a été montré que des récepteurs tels que le récepteur V2 de la vasopressine peuvent former des complexes stables associant le récepteur, une protéine G et une β -arrestine, appelés « mégaplex », permettant le maintien de

l'activation des protéines G même après internalisation dans les endosomes¹³. Ces observations remettent en cause l'idée que les β -arrestines agissent uniquement comme des terminateurs du signal, et suggèrent au contraire qu'elles peuvent stabiliser certaines conformations du récepteur compatibles avec une signalisation prolongée (**Figure 7**).

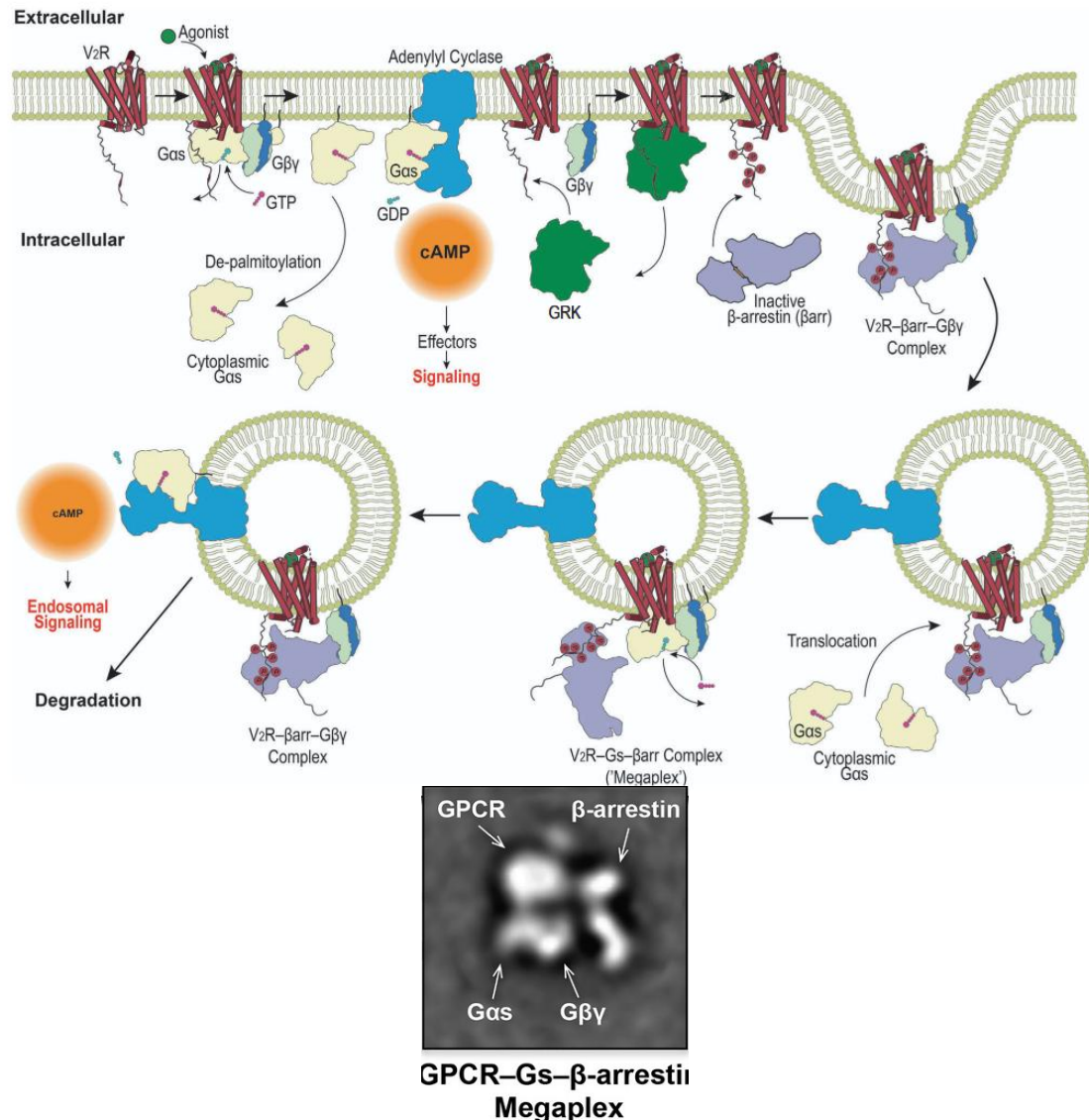
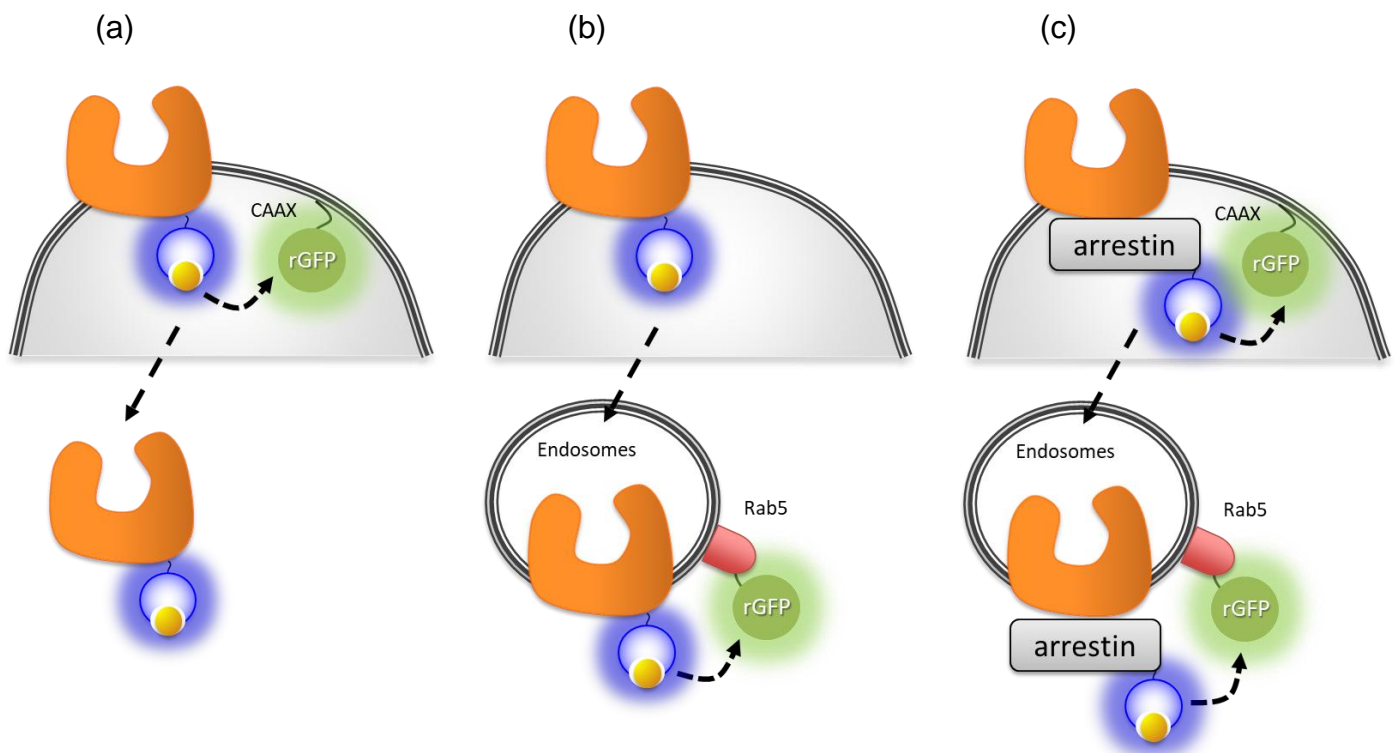


Figure 7. Formation de mégacomplexes RCPG-protéine G- β -arrestine et signalisation prolongée depuis les endosomes. Après activation par un agoniste, le récepteur couplé aux protéines G (RCPG) active la protéine Gs à la membrane plasmique, conduisant à la production d'AMPc via l'adénylate cyclase. Le récepteur recrute ensuite la β -arrestine, qui favorise son internalisation vers les endosomes. Contrairement au modèle classique de désensibilisation, le récepteur internalisé reste associé à la fois

¹³ Thomsen et al., 2016, Vol. 166, Issue 4, 907-919

à la protéine G et à la β -arrestine, formant un complexe stable appelé « mégaplex ». Ce complexe permet le maintien de l'activation de Gs et de la production d'AMPc au niveau endosomal. L'image en microscopie électronique (encart) illustre l'organisation du complexe RCPG–Gs– β -arrestine. Adapté de *Thomsen et al., 2016*.

Ces observations ont également mis en évidence l'importance de l'organisation subcellulaire du signal. Les approches ebBRET ont permis de distinguer des phases de signalisation à la membrane plasmique et dans les endosomes, mettant en évidence une organisation spatio-temporelle complexe du signal pour les récepteurs Angiotensin-1, Vasopressine 2 et Ocytocine (**Figure 8**). Cette compartimentation peut influencer la nature et l'intensité de la réponse cellulaire, contribuant notamment au phénomène de signalisation biaisée¹⁴. Ainsi, la réponse d'un récepteur ne dépend pas uniquement du ligand ou de la conformation du récepteur, mais également du compartiment cellulaire dans lequel le signal est généré.



¹⁴ Toth AD et al., *Science Signaling*, 2024, Vol.17, Issue 842

NB. La dynamique conformationnelle des récepteurs, selon les compartiments cellulaires, joue probablement un rôle déterminant dans la signalisation, notamment via l'influence des lipides membranaires et endosomaux sur leur conformation.

Figure 8. Apport des ebBRET dans la dynamique spatio-temporelle des RCPG. (a–c) Schémas illustrant trois configurations de senseurs BRET permettant de suivre le trafic des RCPG et de la β -arrestine. (a) Pour quantifier la présence du récepteur à la membrane plasmique, la rGFP est ancrée à la membrane via l'ajout en N-terminal du motif d'acylation de la kinase Lyn (MGCIKSKGKDS) ou un motif CAAX. (b,c) Pour analyser le ciblage du récepteur (b) ou de la β -arrestine (c) vers les endosomes précoces, le domaine FYVE d'endofin (Q739–K806) ou la petite GTPase Rab5, permettant l'ancrage du senseur dans les endosomes, est fusionné en C-terminal de la rGFP. Les constructions rGFP ciblées vers la membrane plasmique ou les endosomes constituent l'accepteur BRET pour des RCPG ou des β -arrestines fusionnés à la luciférase RlucII.

Par ailleurs, l'utilisation combinée du ebBRET avec d'autres outils, tels que les mini-protéines G, a permis de démontrer que des protéines G peuvent rester actives dans les endosomes et contribuer à une signalisation prolongée¹⁵. Dans certains cas, cette signalisation est dépendante de la β -arrestine, tandis que dans d'autres, elle peut s'en affranchir, soulignant la diversité des mécanismes impliqués¹⁶. Des études ont également mis en évidence la possibilité de re-recrutement de protéines G au niveau des endosomes, contribuant à la formation de complexes actifs capables de maintenir la signalisation¹⁷.

Dans l'ensemble, les approches ebBRET ont profondément transformé notre compréhension de la signalisation des RCPG en révélant qu'elle ne se limite pas à la membrane plasmique, mais s'étend à des compartiments intracellulaires où elle peut être modulée de manière spécifique. Ces outils permettent une analyse dynamique et localisée de la signalisation en cellules vivantes et ont contribué à l'émergence d'un nouveau paradigme dans lequel la localisation subcellulaire des récepteurs constitue un déterminant majeur de la réponse cellulaire¹⁸.

¹⁵ Daly et al., bioRxiv 2023

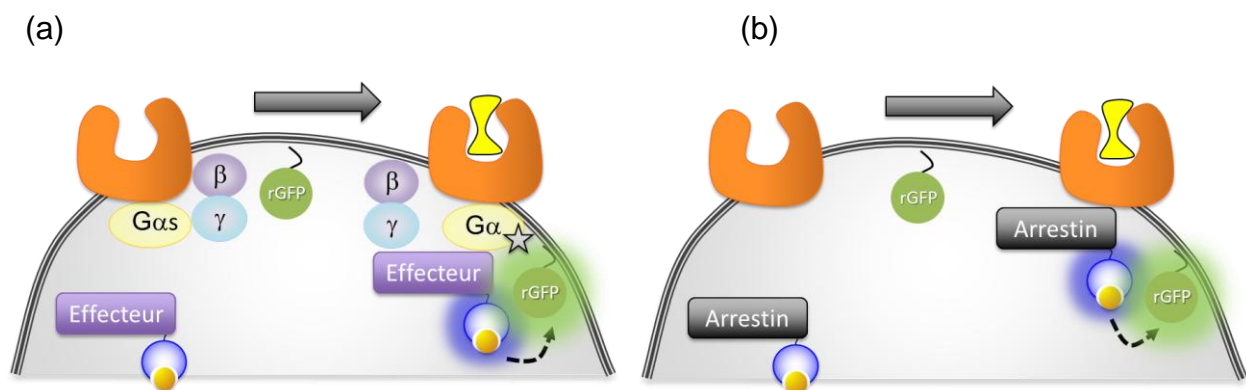
¹⁶ Blythe EE et al., Nature Chemical Biology, 2023

¹⁷ Sokrat B et al., Communication Biology 2024, 7:826

¹⁸ Bock et al., Nature Chem Biol, 2025, 21(8): 1148–1159

IV-4. LES APPROCHES DE TYPE GEMTA

Les approches de type GEMTA (G protein Effector Membrane Translocation Assay) peuvent être considérées comme une extension des stratégies *bystander* BRET appliquées à l'étude de l'activation des protéines G. Elles représentent une évolution des biosenseurs BRET appliqués à l'étude de la signalisation des RCPG, en combinant les principes du ebBRET vu précédemment et la translocation d'effecteurs de protéines G. Développées notamment par Avet et al.¹⁹, ces approches reposent sur la détection de l'activation des protéines G endogènes via le recrutement d'effecteurs spécifiques vers la membrane plasmique. Dans ce système, des domaines effecteurs reconnaissant sélectivement les formes actives de G α (GTP-bound) sont fusionnés à une luciférase et localisés dans le cytosol, tandis qu'un accepteur fluorescent est ancré à la membrane, généralement via un motif CAAX. L'activation d'un RCPG entraîne la translocation de l'effecteur vers la membrane, induisant une augmentation du signal BRET. Cette stratégie permet de mesurer l'activation des protéines G endogènes dans un contexte proche de la physiologie, sans nécessiter leur modification génétique (**Figure 9**).



¹⁹ Avet et al., eLife, 2022, 11: e74101

(c)

Effecteurs utilisés dans le GEMTA

Famille $G\alpha$	Effecteur	Origine	Spécificité / Fonction
$Gq/11$	p63-RhoGEF (domaine RGS)	p63-RhoGEF	<ul style="list-style-type: none"> • Lie $G\alpha_q/11$-GTP • Échangeur de nucléotides • Spécifique de $Gq/11$
Gi/o	Rap1GAP (fragment)	Rap1GAP	<ul style="list-style-type: none"> • Lie $G\alpha_i/o$-GTP • Protéine GAP • Spécifique de $Gq/11$
$G_{12/13}$	PDZ-RhoGEF (domaine RGS) (ou LARG)	PDZ-RhoGEF (ou LARG)	<ul style="list-style-type: none"> • Lie $G\alpha_{12/13}$-GTP • Échangeur de nucléotides • Spécifique de $G_{12/13}$
G_s	G_{α_s}-RlucII	Sous-unité G_{α_s}	<ul style="list-style-type: none"> • Suit G_{α_s}-GTP • Suivi d'internalisation • Pas d'effecteur cytosolique direct

Figure 9. Plateforme EMTA/ebBRET pour le suivi de l'activation des protéines G et du recrutement de la β -arrestine. (a) Schéma du test GEMTA (G protein Effector Membrane Translocation Assay) permettant de mesurer l'activation des protéines $G\alpha$. Suite à l'activation du récepteur, des effecteurs fusionnés à la luciférase RlucII (Effector-RlucII) sont recrutés et se transloquent vers les sous-unités $G\alpha$ actives de chaque famille de protéines G, entraînant une augmentation du signal ebBRET. (b) Principe du test EMTA pour le suivi du recrutement de la β -arrestine à la membrane plasmique. L'activation du récepteur induit la translocation des β -arrestines fusionnées à RlucII (β -arrestin-RlucII) vers la membrane plasmique, augmentant le signal ebBRET avec la rGFP ancrée via un motif CAAX. (c) Effecteurs utilisés dans le test GEMTA.

Ces approches présentent également une bonne spécificité de voie de signalisation grâce au choix d'effecteurs adaptés aux différentes familles de protéines G ($Gq/11$, Gi/o , etc.), et permettent un profilage global du couplage des récepteurs. En ce sens, elles constituent un outil particulièrement puissant pour étudier la pharmacologie des RCPG, notamment le biais de signalisation. Toutefois, comme les autres approches *bystander*, le signal mesuré repose sur une relocalisation vers la membrane plasmique et ne reflète pas nécessairement des interactions directes ni la complexité des événements intracellulaires.

Les GEMTA s'inscrivent dans la continuité des développements récents visant à affiner l'étude de la signalisation des RCPG en cellules vivantes, en apportant une lecture fonctionnelle robuste et physiologiquement pertinente de l'activation des protéines G. Elles complètent les approches basées sur la dissociation des protéines

G, les mini-protéines G et les systèmes intégrés de type ONE-GO, contribuant à une vision désormais intégrée et multidimensionnelle de la signalisation des RCPG.

V – CONCLUSION

Au cours des dernières décennies, la compréhension de la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) a profondément évolué, passant d'un modèle simple et linéaire à une vision intégrée, dynamique et compartimentée. Initialement limitée à la membrane plasmique, la signalisation des RCPG est désormais reconnue comme un processus impliquant plusieurs compartiments intracellulaires, notamment les endosomes.

L'émergence des biosenseurs BRET, et en particulier des approches *bystander* et ebBRET, a joué un rôle déterminant dans cette évolution en permettant de suivre en temps réel la localisation et la dynamique des complexes de signalisation en cellules vivantes. Ces outils ont notamment révélé l'existence de complexes multiprotéiques tels que les « mégaplex », capables de soutenir une signalisation prolongée après internalisation, ainsi que l'implication active des β -arrestines dans la signalisation.

Ces avancées ont conduit à l'émergence du concept de biais spatio-temporel, selon lequel la réponse cellulaire dépend non seulement du ligand et de la conformation du récepteur, mais également du compartiment subcellulaire dans lequel le signal est généré.

Ainsi, la signalisation des RCPG peut aujourd'hui être envisagée comme un réseau dynamique et spatialement organisé, dans lequel le ebBRET constitue un outil clé ayant permis de passer d'une vision statique à une compréhension intégrée et multidimensionnelle des mécanismes de signalisation.