

*ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Techniques*  
**UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux**  
**Physiologie de la Reproduction et des Comportements**  
**Equipe : Neurobiologie Intégrative de la Reproduction**

## **THÈSE** présentée par : **Séverine DEVAVRY**

soutenue le : 19 décembre 2011

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

### **Récepteurs de la mélatonine : pharmacologie du récepteur ovin MT<sub>2</sub>, identification de leur activité constitutive et développement d'une approche par ARN interférent**

**THÈSE dirigée par :**  
**M. MALPAUX Benoît**

Directeur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly

**RAPPORTEURS :**  
**Mme SIMONNEAUX Valérie**  
**Mr JOCKERS Ralph**

Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg  
Directeur de Recherche, INSERM, Paris

**JURY :**  
**Mme DUITTOZ Anne**  
**M. JOCKERS Ralph**  
**Mme LLORENS-CORTES Catherine**  
**M. MALPAUX Benoît**  
**M. NOSJEAN Olivier**  
**Mme SIMONNEAUX Valérie**

Professeur, Université François Rabelais, Tours  
Directeur de Recherche, INSERM, Paris  
Directeur de Recherche, CDF, Paris  
Directeur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly  
Directeur de Projet, IdRS, Croissy-sur-Seine  
Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg



## Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas pu être possible sans toutes les personnes qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à sa réalisation.

Je tiens à remercier **l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT)** qui a permis la mise en place du partenariat entre l'équipe de Neurobiologie Intégrative de la Reproduction, de l'unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (INRA, Nouzilly), et l'équipe HTS (High Throughput Screening), de la division de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire (IdRS, Croissy-sur-Seine) et moi-même.

Je remercie vivement **Mme SIMONNEAUX Valérie** et **Mr JOCKERS Ralph** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que **Mme DUITTOZ Anne**, **Mme LLORENS-CORTES Catherine**, **Mr NOSJEAN Olivier** et **Mr MALPAUX Benoît** pour avoir accepté d'être membre du jury et de m'avoir accordé du temps pour juger mon travail.

Je remercie très sincèrement **Mme MIGAUD Martine**, **Mr REITER Eric**, **Mr JOCKERS Ralph**, **Mr DELAGRANGE Philippe** et **Mr NOSJEAN Olivier** pour avoir accepté d'être membres de mon comité de thèse et pour m'avoir accompagné pendant ces trois ans de thèse.

Merci évidemment à **Mr MALPAUX Benoît** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour m'avoir fait confiance dans la gestion de ce projet de thèse, pour m'avoir encadré et pour s'être rendu le plus disponible possible malgré ses nombreuses responsabilités. Merci pour m'avoir donné envie de porter à bien ces travaux qui nous tiennent à cœur.

Je remercie chaleureusement **Mr NOSJEAN Olivier** pour son accueil et son encadrement au sein de son équipe HTS, de l'Institut de Recherche Servier. Merci de m'avoir inculqué les valeurs de la recherche telles que la rigueur, la persévérance et la perpétuelle remise en question.

Je tiens sincèrement à remercier **Mr DELAGRANGE Philippe** et **Mr BOUTIN Jean** pour m'avoir permis de travailler dans des conditions idéales. Merci pour votre encadrement, votre dynamisme et votre soutien.



Un grand merci à l'ensemble de l'équipe Neurobiologie Intégrative de la Reproduction. Merci à **Mme TARAGNAT Catherine** pour m'avoir épaulé et encadré dans la dernière partie de ma thèse. Je remercie **Mme DUFOURNY Laurence** et **Mr BELTRAMO Massimo** d'avoir accepté de corriger l'introduction de cette thèse et d'avoir porté un intérêt certain à la pharmacologie des récepteurs à la mélatonine. Je remercie tout particulièrement à **Didier** (l'expert des mots fléchés) et à **Armelle**, pour leur franc-parler et leur bonne humeur sans faille.

Je remercie l'ensemble des membres de la division PMC pour leur accueil pendant mes escapades parisiennes. Merci à **Adeline, William** pour avoir partagé leur bureau et pour nos nombreux moments de rire. Merci aussi à **Elodie, Chantal, Anne, Marion, Nelly, Sophie** (les deux !), **Christelle, Véronique, Estelle, Aude, Catherine, Matthias, Olivier** et **Benjamin** pour avoir rendu la vie au laboratoire très agréable.

Merci évidemment à tous les membres du bureau des thésards et post-doctorants. Un énorme merci à **Jean-Baptiste** pour m'avoir permis de réaliser cette thèse sérieusement mais sans se prendre au sérieux. Merci à **Stéphanie** et à **Marie-Emilie** pour leurs encouragements et en souvenir de nos nombreux fous rires. Merci à **Caroline** et à **Sophie** d'avoir partagé au cours de cette dernière année les hauts et les bas du quotidien au laboratoire. Merci aussi à **Samia** pour sa zénitude et sa bienveillance. Je remercie aussi les autres thésards de l'unité PRC : **Guillaume** (pour tes histoires « drôles » et tes jeux de mots qui me feront toujours rire), **Thibaud** (pour nos discussions dans le couloir et pour tous les anticorps et autres produits que je t'ai « emprunté »), **Vincent** et **Jérémy**.

Merci à l'ensemble du personnel de l'abattoir-hôpital de l'INRA pour leur aide précieuse et leur disponibilité toute au long de ce travail de thèse et tout particulièrement à **Jean-Philippe** et à **Albert** pour nos virées à l'abattoir du Vigeant.

Une pensée à toutes les personnes qui ont fait mon quotidien pendant ces trois années, **Sophie, Barbara, Gaël, Patrick, Bernadette** (l'autre expert des mots fléchés !).



Merci à mes parents, **Micheline et Hervé**, et à ma sœur, **Magalie** de s'être toujours inquiété de l'avancée de mon travail et d'avoir trouvé les mots pour m'encourager et me soutenir quand il le fallait.

Merci à mes amis (**Mathilde, Gibbon, Martin, Hélène, François, Paul, Amélie** et **Mathieu**) de s'être inquiété du bon état de mes « petites cellules ». Merci à **Anthony** de m'avoir permis de garder les pieds sur terre et de m'avoir appris à relativiser.





## Résumé

La mélatonine est une hormone synthétisée et sécrétée uniquement la nuit par la glande pinéale. Son rôle principal est son implication dans la synchronisation de la saison de reproduction. La mélatonine se lie aux récepteurs, MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>, membres de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG).

Le clonage récent du récepteur ovin MT<sub>2</sub> a remis en cause toutes les données connues. La pharmacologie et les voies de signalisation du récepteur oMT<sub>2</sub> ont été étudiées et sont communes à celles des récepteurs des autres espèces. En revanche, oMT<sub>2</sub> possède une originalité de séquence avec la présence du motif DRY, fortement impliqué dans l'établissement de l'activité constitutive des RCPG. D'une part, nous avons montré que l'ensemble des récepteurs MT possède une activité constitutive. D'autre part, nous avons identifié deux agonistes inverses pour les récepteurs hMT<sub>2</sub>, initialement décrits comme antagonistes. Dans l'optique de discriminer les rôles respectifs des récepteurs MT *in vivo*, le développement d'une approche par ARN interférents a été validée dans un modèle cellulaire, la lignée CHO-K1 exprimant les récepteurs ovins et de rat.

**Mots-clés : Mélatonine, RCPG, ovin, activité constitutive, agonistes inverses, ARN interférents**



## Résumé en anglais

Melatonin is a hormone synthesized and secreted only during night by pineal gland. A main role of melatonin concerns its implication in the synchronisation of reproductive seasonality. Binding sites of melatonin are MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors which belong to the superfamily of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors (GPCRs).

Recent cloning of ovine MT<sub>2</sub> receptor has challenged the knowledge about melatonin receptors. We demonstrated that its pharmacology and signalling pathways were similar to subtype 2 receptor of others species (human and rat). Nevertheless, oMT<sub>2</sub> receptor possesses a particularity of sequence, with the presence of DRY motif which is known to be involved in the establishment of constitutive activity of GPCRs. In our study, we demonstrated the existence of constitutive activity for all the melatonin receptors. In addition, we identified two inverse agonists for human MT<sub>2</sub> receptors, previously described as antagonists. To describe the respective roles of each subtype of melatonin receptors *in vivo*, siRNA approach was developed in cell line, CHO-K1 expressing ovine and rat melatonin receptors.

**Key words: Melatonin, GPCR, ovine, constitutive activity, inverse agonists, siRNA**



## Avant-Propos

### Publications scientifiques

F. Cogé, S.P. Guenin, I. Fery, M. Migaud, **S. Devavry**, C. Slugocki, C. Legros, C. Ouvry, W. Cohen, N. Renault, O. Nosjean, B. Malpaux, P. Delagrange and J.A. Boutin, **The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT2 receptor**. *British Journal of Pharmacology* (2009), 158, 1248–1262.

**S. Devavry**, C. Legros, C. Brasseur, P. Delagrange, G. Spadoni, W. Cohen, B. Malpaux, J.A. Boutin, O. Nosjean, **Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> and discovery of inverse agonists**. *Journal of Pineal Research*, (Accepté).

**S. Devavry**, C. Legros, W. Cohen, C. Brasseur, P. Delagrange, B. Malpaux, C. Ouvry, F. Cogé, O. Nosjean, J.A. Boutin, **Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors mMT1 and mMT2**. *European Journal of Pharmacology*, (Accepté après corrections).

### Participation à des congrès Nationaux et Internationaux

#### Communications affichées

**S. Devavry**, C. Legros, C. Brasseur, P. Delagrange, G. Spadoni, W. Cohen, B. Malpaux, J.A. Boutin, O. Nosjean, **Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> and discovery of inverse agonists**. 36<sup>th</sup> *European Symposium on Hormones and Cell Regulation (Mont-Sainte-Odile, France), October 13-16 2011, Abstract p: 19.*

**S. Devavry**, A. Bonnaud, W. Cohen, M. Migaud, P. Delagrange, O. Nosjean, B. Malpaux, J.A. Boutin, **Pharmacological characterization of the MT<sub>2</sub> melatonin receptor**. 11<sup>th</sup> *Congress of the European Biological Rhythms Society (Strasbourg, France), August 22-28 2009, Abstract No P8-2.*

#### Comminucations orales

**S. Devavry**, M. Migaud, P. Delagrange, O. Nosjean, J.A. Boutin, B. Malpaux, **Développement d'une approche siRNA pour étudier le rôle des récepteurs mélatoninergiques MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>**. *Forum de l'école doctorale (Tours, France), 17 juin 2009.*



## Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	6
Résumé en anglais .....	7
Avant-Propos .....	8
Introduction .....	12
1. Physiologie de la mélatonine.....	13
1.1. L'hormone.....	13
1.1.1. Transmission de l'information lumineuse en rythme de sécrétion de mélatonine chez les mammifères .....	13
1.1.1.1. Le tractus rétino-hypothalamique.....	14
1.1.1.2. Les noyaux suprachiasmatiques et les gènes de l'horloge .....	14
1.1.1.3. Le relais hypothalamo-pinéalien .....	16
1.1.1.4. La glande pinéale .....	17
1.1.2. Synthèse de la mélatonine par la glande pinéale.....	17
1.1.2.1. La TPH .....	17
1.1.2.2. L'AANAT et la HIOMT .....	18
1.1.3. Synthèses locales de la mélatonine .....	19
1.1.4. Sécrétion de la mélatonine .....	19
1.1.5. Dégradation de la mélatonine.....	20
1.1.5.1. Dégradation hépatique.....	20
1.1.5.2. Dégradation cérébrale .....	20
1.2. Effets de la mélatonine .....	21
1.2.1. Effets physiologiques de la mélatonine sur les rythmes biologiques.....	21
1.2.1.1. Effet de la mélatonine sur la saisonnalité.....	21
1.2.1.2. Effet de la mélatonine sur les rythmes circadiens .....	24
1.2.2. Effets physiologiques de la mélatonine sur d'autres fonctions biologiques	25
1.2.2.1. Effets activateurs sur le système immunitaire.....	25
1.2.2.2. Effets sur le système cardio-vasculaire et sur la température corporelle .	26
1.2.2.3. Effets anti-oxydants et anti-mitotiques .....	26
1.2.2.4. Effets sur la dépression .....	27
2. Pharmacologie des récepteurs mélatoninergiques.....	29
2.1. Ligands : Généralités.....	29





2.1.1.	Paramètres qualitatifs .....	29
2.1.2.	Paramètres quantitatifs .....	30
2.2.	Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques : Généralités.....	30
2.2.1.	Structure des RCPG .....	31
2.2.2.	Activation des RCPG .....	32
2.2.3.	Couplage aux protéines G .....	33
2.2.4.	Activité constitutive des récepteurs couplés aux protéines G .....	34
2.3.	Les récepteurs mélatoninergiques .....	35
2.3.1.	Classification des récepteurs mélatoninergiques.....	35
2.3.2.	Structure protéique des récepteurs à la mélatonine .....	36
2.3.3.	Voies de signalisation.....	37
2.3.3.1.	Voies de signalisation des récepteurs MT <sub>1</sub> .....	38
2.3.3.2.	Voies de signalisation des récepteurs MT <sub>2</sub> .....	38
2.3.4.	Pharmacologie des récepteurs mélatoninergiques.....	39
2.3.5.	Distributions centrale et périphérique .....	40
2.3.6.	Implication physiologique des récepteurs à la mélatonine.....	41
2.3.7.	Dimérisation .....	42
2.3.8.	Régulation des récepteurs mélatoninergiques .....	43
2.3.8.1.	Facteurs de régulation de l'expression des récepteurs à la mélatonine ....	43
2.3.8.2.	Régulation de l'expression des récepteurs MT par la mélatonine .....	44
2.3.8.3.	Implication des protéines régulatrices de la signalisation par les protéines G	46
	Objectifs .....	47
	Première partie: Caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur oMT <sub>2</sub> .....	50
	Introduction .....	51
	Résultats .....	68
1.	Caractérisation pharmacologique du récepteur oMT <sub>2</sub> .....	68
2.	Nature de la protéine G impliquée dans le couplage.....	68
	Discussion .....	70
1.	Difficulté du clonage du récepteur oMT <sub>2</sub> .....	70
2.	Densité relative du récepteur oMT <sub>2</sub> .....	71
3.	Caractérisation pharmacologique du récepteur oMT <sub>2</sub> .....	72
4.	Activité constitutive du récepteur oMT <sub>2</sub> .....	73



Deuxième partie: Mise en évidence de l'activité constitutive des récepteurs MT <sub>1</sub> et MT <sub>2</sub> et identification d'agonistes inverses .....	76
Introduction .....	77
Conclusion.....	93
Troisième partie: Inhibition spécifique des récepteurs de la mélatonine par une approche d'ARN interférent .....	94
Introduction .....	95
Conclusion.....	121
Conclusion générale et perspectives .....	122
1) Pharmacologie du récepteur oMT <sub>2</sub> .....	124
2) Activité constitutive des récepteurs MT .....	125
2.1) Relation entre la structure des RCPG et l'existence de l'activité constitutive .....	125
2.2) Facteurs influençant l'activité constitutive .....	126
2.2.1) Participation de différents sous-types de protéines G :.....	126
2.2.2) Influence de l'environnement cellulaire sur l'activité constitutive : .....	127
2.3) Identification d'agonistes inverses :.....	128
2.4) Signification physiologique de l'activité constitutive :.....	129
3) Les questions importantes qui se posent ? .....	132
Résumé.....	154
Résumé en anglais.....	154



# Introduction



Les rythmes biologiques permettent aux organismes de s'adapter aux variations environnementales périodiques, mais également d'anticiper ces variations. De nombreuses fonctions biologiques suivent un rythme nycthéméral, qui s'exprime lors de l'alternance jour/nuit. Les cycles circadiens, rythmes dont la période (durée du cycle complet) est de  $24h \pm 4h$ , permettent l'adaptation d'un organisme vivant aux variations des facteurs environnementaux, en particulier la photopériode. De nombreuses fonctions physiologiques et variables biologiques connaissent des variations endogènes de leurs rythmes (température corporelle, cycle activité-repos, sécrétion du cortisol, etc.) (Perreau-Lenz et al., 2004). La synchronisation de la saisonnalité de la reproduction dépend de nombreux facteurs environnementaux, parmi lesquels la photopériode est la plus importante. La photopériode est traduite chimiquement au niveau du système nerveux central par la durée de sécrétion nocturne d'une hormone, la mélatonine. La sécrétion de la mélatonine est un de ces rythmes circadiens et le marqueur principal de l'horloge circadienne.

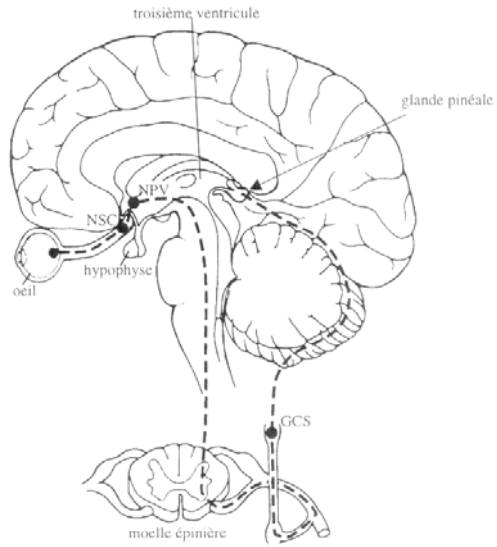
## 1. Physiologie de la mélatonine

En 1958, Lerner et ses collaborateurs ont montré que des extraits de glande pinéale bovine produisaient un éclaircissement de la peau chez les grenouilles et les lézards, suite à l'agrégation des granules de mélanine. La nouvelle hormone de ce fait fût appelée mélatonine. La mélatonine, ou N-acétyl-5-méthoxytryptamine, est synthétisée et sécrétée par la glande pinéale uniquement la nuit (Pour revue: Borjigin et al., 1999; Cardinali, 1981; Reiter, 1991). Depuis sa découverte, de nombreuses études ont permis d'identifier les cibles cérébrales ainsi que les effets physiologiques associés à la mélatonine. De nombreux rôles lui sont attribués, le principal étant son implication dans la synchronisation des rythmes circadiens et circannuels, en particulier pour traduire au niveau central la durée de la nuit.

### 1.1. L'hormone

#### 1.1.1. Transmission de l'information lumineuse en rythme de sécrétion de mélatonine chez les mammifères

La glande pinéale, ou épiphyse, est une structure cérébrale unique et médiane, innervée par de nombreuses fibres nerveuses. La principale, étant la voie nerveuse multi-synaptique reliant la rétine à la glande pinéale en passant notamment par les noyaux suprachiasmatiques (NSC),



**Figure 1 : Voies nerveuses par lesquelles l'information lumineuse perçue par la rétine parvient à la glande pinéale. NSC : noyaux suprachiasmatiques, NPV : noyau paraventriculaire, GCS : ganglion cervical supérieur. D'après Tamarkin *et al.*, *Science*, 1985, vol 227.**



sièges de l'horloge biologique interne (Tamarkin et al., 1985). Le parcours de l'information photique peut se diviser en plusieurs étapes. Dans un premier temps, le message nerveux est transmis de la rétine jusqu'aux NSC. Dans un second temps, l'information est véhiculée jusqu'à la glande pinéale via différents noyaux hypothalamiques et extra-hypothalamiques (Figure 1).

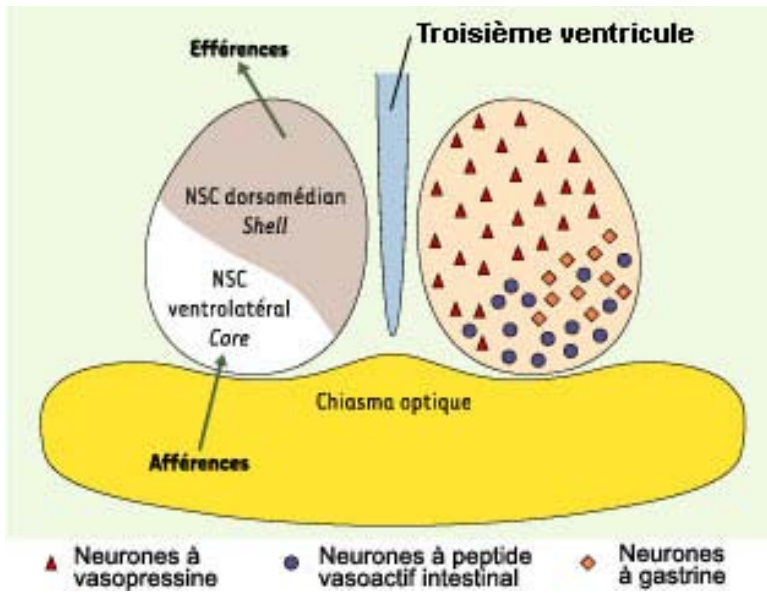
#### 1.1.1.1. Le tractus rétino-hypothalamique

Chez les mammifères, la rétine participe majoritairement à la perception de l'information lumineuse. Le signal perçu par la rétine est alors transmis directement aux NSC principalement via le tractus rétino-hypothalamique (Moore, 1995; Moore and Lenn, 1972). La population de cellules photosensibles qui captent les photons s'est élargie au-delà des cônes et des bâtonnets (Lucas et al., 1999), à une sous-population de cellules ganglionnaires rétinienne intrinsèquement photosensibles. Ces cellules ganglionnaires rétinienne expriment un photopigment, la mélanopsine, en réponse à une stimulation lumineuse (Hattar et al., 2002). Ces cellules ganglionnaires rétinienne intrinsèquement photosensibles participent à la détection de l'irradiance, correspondant à l'intensité de la lumière ambiante mais pas à la détection de l'image (Pour revue: Peirson et al., 2009; Thapan et al., 2001). Les cellules ganglionnaires rétinienne se projettent vers les noyaux suprachiasmatiques. Les principaux neurotransmetteurs de la voie rétino-hypothalamique sont le glutamate et le PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) (Pour revue: Hannibal, 2002).

Une autre voie nerveuse, permettant le cheminement de l'information photopériodique, relie la rétine aux noyaux suprachiasmatiques via le feuillet intergénéculé latéral du thalamus, appelé tractus géniculo-hypothalamique. Les neurotransmetteurs impliqués sont l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), le neuropeptide Y (NPY), l'enképhaline et la neurotensine (Card and Moore, 1982; Moore and Speh, 1993; Morin, 1992; Morin and Blanchard, 2001). Avant d'atteindre les NSC de l'hypothalamus, l'information photique peut également transiter via le noyau du raphé où la sérotonine est le neurotransmetteur principal (Pickard, 1982).

#### 1.1.1.2. Les noyaux suprachiasmatiques et les gènes de l'horloge

Les NSC sont une structure paire de l'hypothalamus antérieur située au dessus du chiasma optique et de part et d'autre du troisième ventricule au niveau du récessus pré-optique. Cette structure est considérée comme le générateur central des rythmes circadiens (Reppert et al., 1981). En effet, des lésions des NSC entraînent la disparition de quelques rythmes circadiens, tels que le rythme de sécrétion de la MLT (Tessonnaud et al., 1995) alors que la

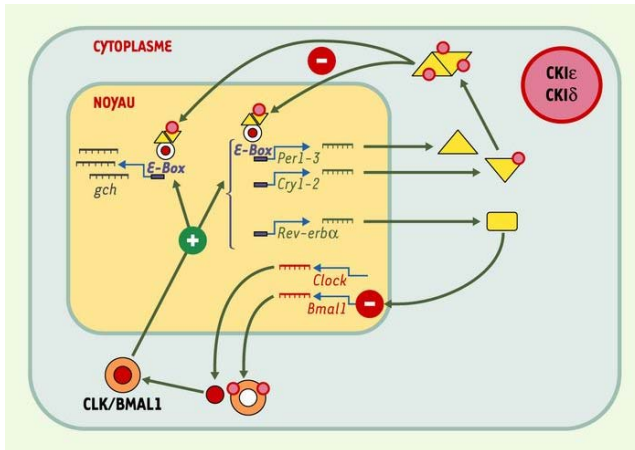


**Figure 2 : Schéma simplifié de l'organisation morphofonctionnelle et neurochimique des noyaux supra-chiasmatiques.** D'après Dardente et Cermakian, Médecines/Science, Volume 21, numéro 1 (Janvier 2005)

transplantation des NSC fœtaux restaure la rythmicité circadienne des animaux avec les caractéristiques du rythme du donneur (LeSauter and Silver, 1998; Turek et al., 1984).

Ces noyaux présentent une organisation caractéristique retrouvée chez tous les mammifères. Schématiquement, la partie dorso-médiane, appelée également coquille (ou shell), est à l'origine de la plupart des efférences des NSC et la partie ventro-latérale, appelée cœur (ou core), est impliquée dans l'intégration des signaux photiques et non-photiques puisqu'elle reçoit les afférences des NSC (Figure 2). Ces deux zones présentent un phénotype neuropeptidique spécifique. Au niveau de la coquille, sont présents des neurones à vasopressine, alors que des neurones à peptide vasoactif intestinal (VIP pour vasoactive intestinal peptide) et à peptide libérant la gastrine sont détectés dans le cœur (Dardente and Cermakian, 2005).

Chez les mammifères, il a été montré que les NSC possèdent un rythme endogène circadien (Pour revue: Ralph and Hurd, 1996; Turek, 1998). Le mécanisme générateur des rythmes circadiens est intrinsèque à chaque cellule des NSC. Il est admis que chaque neurone des NSC correspond à une unité rythmique avec son propre rythme d'oscillation synchronisé avec celui des neurones voisins (Reppert and Weaver, 2001; Welsh et al., 1995). Afin de suivre l'oscillation individuelle de ces cellules, les neurones des NSC ont été transfectés avec un gène rapporteur codant pour une protéine « horloge », PER2 fusionnée à la luciférase. Ainsi il est possible de suivre les oscillations circadiennes d'expression de gènes « horloge » mais aussi les oscillations circadiennes de décharges neuronales générées par les neurones des NSC en culture (Liu et al., 2007; Welsh et al., 2010). Des études mesurant l'expression des protéines « horloges » et l'activité électrique des NSC suggèrent, que contrairement au cœur, la coquille possède une rythmicité (Aton et al., 2006). Ces résultats donnent une idée de la complexité des mécanismes mis en jeu lors de la synchronisation des NSC et focalisent l'attention sur l'importance de l'organisation de ces noyaux. La nécessité d'une communication entre les parties ventrolatérale et dorsomédiane dans la synchronisation de l'horloge a été proposée (Yan and Silver, 2002). L'information lumineuse permet de synchroniser cette activité oscillatoire exactement sur 24h. Cette horloge biologique interne repose sur la régulation synchrone de gènes appelés « gènes horloges ». Des études récentes ont permis d'établir un modèle précisant la contribution de ces gènes dans l'horloge (Figure 3). Ce modèle se base sur des boucles de rétro-contrôle positives et négatives qui mènent à l'établissement d'un rythme des niveaux d'expression des ARNm et des protéines de

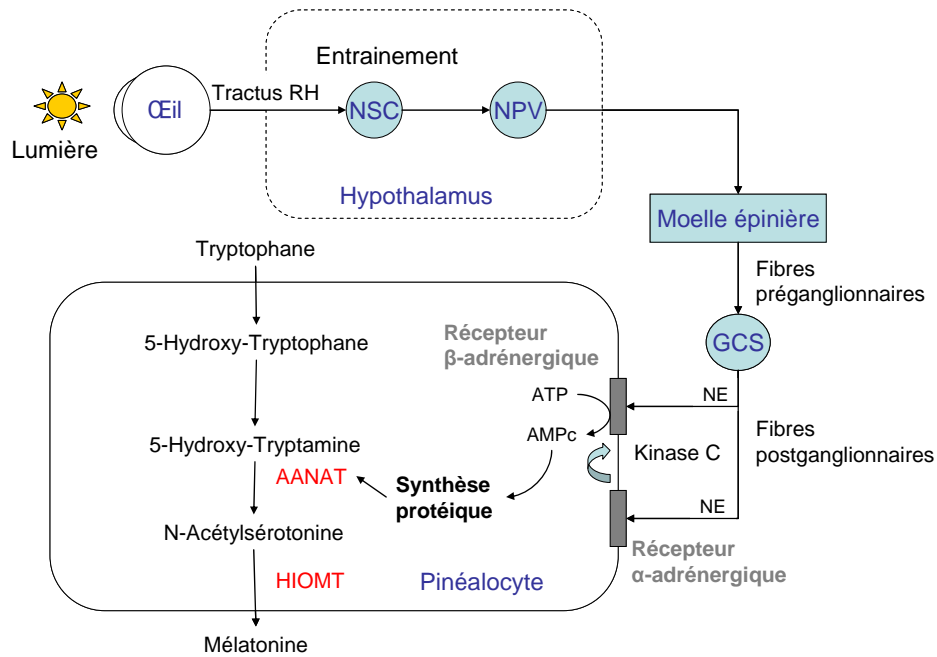


**Figure 3 : Schéma simplifié des mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne. Per1-3 : gènes Period, Cry1-2 : gènes Cryptochromes, Rev-erba : gène codant pour un membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, Clock : gène Clock, Bmal1 : gène codant pour brain and muscle ARNT-like protein 1, CLK/BMAL1 : hétérodimère de protéines Clock et Bmal1, gch : gènes codant pour l'horloge. D'après Dardente et Cermakian, Médecines/Science, Volume 21, numéro 1 (Janvier 2005)**

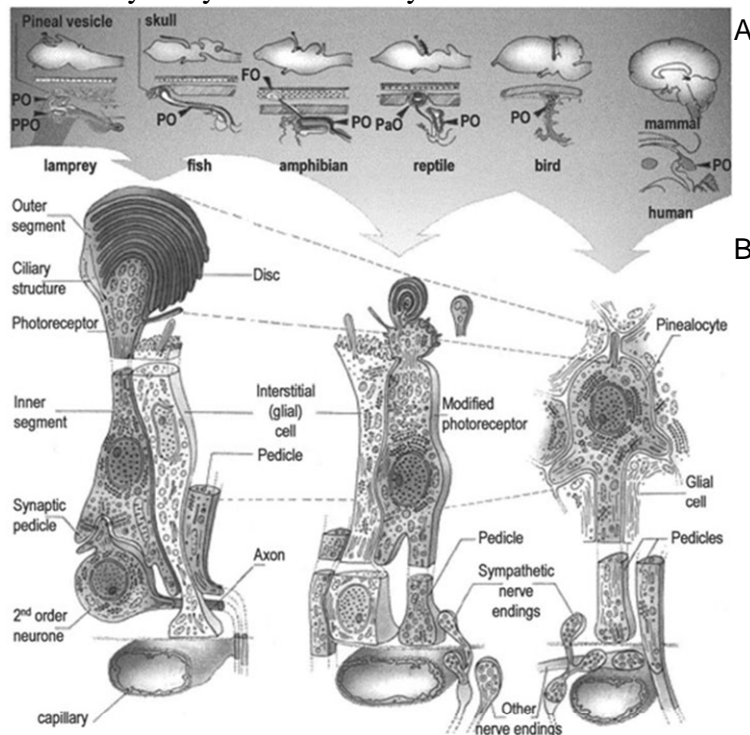
l'horloge. Les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 agissent comme des régulateurs positifs, alors que les protéines PERIOD (PER1, PER2 et PER3) et les protéines CRYPTOCHROME (CRY1 et CRY2) agissent comme des régulateurs négatifs. Un hétérodimère CLOCK/BMAL1 se forme et est transporté dans le noyau où il agit comme stimulateur de la transcription de gènes possédant des motifs  $\varepsilon$ -box dans leur promoteur. Les gènes Period (Per1-3), Cryptochromes (Cry1-2) et Rev-erba (codant pour un membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins) possèdent ces motifs particuliers dans leur promoteur. Les protéines PER et CRY s'hétérodimérisent et sont à leur tour transloquées dans le noyau afin de réprimer l'activité transcriptionnelle du complexe CLOCK/BMAL1. La protéine Rev-erba agit comme inhibiteur de la transcription du gène Bmal1, alors qu'un autre récepteur nucléaire ROR $\alpha$  l'inhibe. Les translocations nucléaires ainsi que la stabilité des dimères sont dépendantes des modifications post-traductionnelles, en particulier des phosphorylations par diverses kinases (comme les caséines K I $\delta$  et I $\epsilon$ ). Le dimère CLOCK/BMAL1 stimule également la transcription d'autres gènes possédant des motifs  $\varepsilon$ -box dans leur promoteur; l'expression de ces gènes est contrôlée par l'horloge ce qui assurent les sorties physiologiques de celle-ci. Les études sur cette boucle de régulation sont très récentes, et par conséquent, le rôle de certaines protéines reste encore à élucider (ROR $\alpha$ , DEC1-2, TIM, NPAS2 et BALM2).

#### 1.1.1.3. Le relais hypothalamo-pinéalien

Les neurones des NSC se projettent d'une part vers la glande pinéale, pour réguler la sécrétion de la mélatonine et d'autre part, vers l'axe hypophyso-surrénalien en vue de moduler la sécrétion de corticostérone. La projection hypothalamo-pinéalienne nous intéresse plus particulièrement puisqu'elle est impliquée dans la régulation de la sécrétion de la mélatonine. Les fibres issues des NSC se projettent donc vers la glande pinéale en passant par les noyaux paraventriculaires hypothalamiques. Ces noyaux paraventriculaires correspondent à un relais essentiel de l'information lumineuse, puisqu'une lésion de ceux-ci entraîne l'abolition, dans la glande pinéale, du rythme de synthèse de la mélatonine. Le GABA, et le VIP sont retrouvés à ce niveau comme neurotransmetteurs (Kalsbeek et al., 1995; Moore and Speh, 1993; van der Beek et al., 1994). Après avoir transité par les noyaux paraventriculaires, le message nerveux est conduit jusqu'aux noyaux intermedio-latéraux de la moelle épinière thoracique, pour revenir ensuite aux ganglions cervicaux supérieurs. Finalement, l'information est transmise via les neurones sympathiques postganglionnaires du nerf marginal, à la glande pinéale. La



**Figure 4: Représentation schématique de la transmission de l'information lumineuse en rythme de sécrétion de mélatonine chez les mammifères.** Tractus RH : Tractus rétinohypothamique, NSC : noyaux suprachiasmatiques, NPV : noyaux paraventriculaires, GCS : ganglions cervicaux supérieurs, NE : norépinéphrine, ATP : adénosine triphosphate, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, AANAT : arylalkylamine N-acétyltransférase, HIOMT : hydroxyindole-O-méthyltransférase.



**Figure 5: Evolution de la glande pinéale chez les vertébrés.** A) Localisation anatomique de la glande pinéale dans le cerveau des vertébrés (en noir). B) Types cellulaires de l'épithélium dans différents modèles allant du poisson aux mammifères. FO: organe frontal, PaO: organe pariétal, PO: organe pinéal, PPO: organe parapinéal. D'après Falcon et al., 2009

norépinéphrine relarguée par ces fibres ganglionnaires active les récepteurs  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  adrénergiques des pinéaloctes, induisant la production de seconds messagers comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) ainsi que l'activation de l'arylalkylamine N-acétyl-tranféroase (AANAT), enzyme limitante à la synthèse de la mélatonine (Figure 4).

#### 1.1.1.4. La glande pinéale

La glande pinéale est une évagination du toit du diencephale. Sa morphologie et sa position anatomique sont assez différentes d'une espèce à une autre mais l'origine embryonnaire est commune (Vollrath, 1979) (Figure 5). Chez les mammifères, elle est composée en majorité de cellules neuro-endocrines, les pinéaloctes, qui ne sont pas directement photosensibles mais qui possèdent de nombreux photorécepteurs, comme la rhodopsine-kinase (Zhao et al., 1999), l'opsine (Foster et al., 2003) et l'antigène-S (Mirshahi et al., 1984). La glande pinéale est composée également d'une faible proportion de cellules gliales, de neurones et de cellules phagocytaires. Chez les vertébrés inférieurs, la glande pinéale est photosensible.

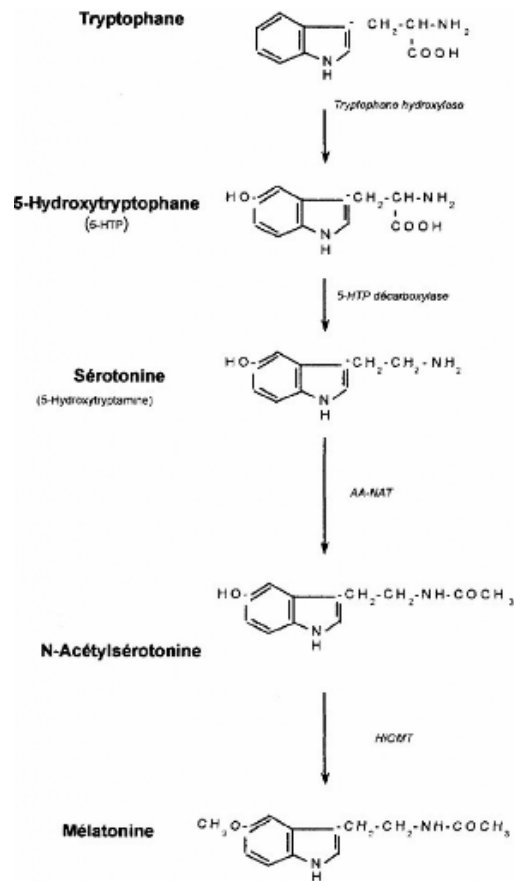
Ce tissu est hautement vascularisé (Duvernoy et al., 2000). La mélatonine est directement relarguée dans la circulation sanguine et dans le liquide cérébro-spinal.

#### 1.1.2. Synthèse de la mélatonine par la glande pinéale

La mélatonine est synthétisée à partir d'un acide aminé précurseur, le L-tryptophane. Ce précurseur est d'abord hydroxylé par une enzyme, la tryptophane hydroxylase (TPH) et ensuite décarboxylé pour donner la sérotonine (5HT, 5-hydroxytryptophane). La sérotonine est ensuite N-acétylée par l'arylalkylamine N-acétyl-tranféroase (AANAT, (Iuvone et al., 2005) et convertie en mélatonine par l'hydroxyindole-O-méthyltransféroase (HIOMT) (Bernard et al., 1995) (Figure 6). La synthèse de la mélatonine est limitée par l'activité de ces trois enzymes : la TPH, l'AANAT et l'HIOMT. La TPH contrôle la disponibilité de la sérotonine alors que l'AANAT et l'HIOMT régulent la synthèse de mélatonine à partir de sérotonine. Ces enzymes sont soumises à de nombreuses régulations (Pour revue: Simonneaux and Ribelayga, 2003).

##### 1.1.2.1. La TPH

La tryptophane hydroxylase, TPH, enzyme mitochondriale, transforme le L-tryptophane en 5-hydroxytryptophane. La localisation de cette enzyme est restreinte à des tissus capables de synthétiser la sérotonine, comme la glande pinéale et la rétine (Malek et al., 2005). Dans ces tissus, l'expression des ARNm de la TPH et l'activité de celle-ci suivent un rythme circadien,



**Figure 6 : Voie de synthèse de la mélatonine** (Thèse : Tritschler L, 2006). **AANAT** : arylalkylamine N-acétyl-tranférase, **HIOMT** : hydroxyindole-O-méthyltransférase.



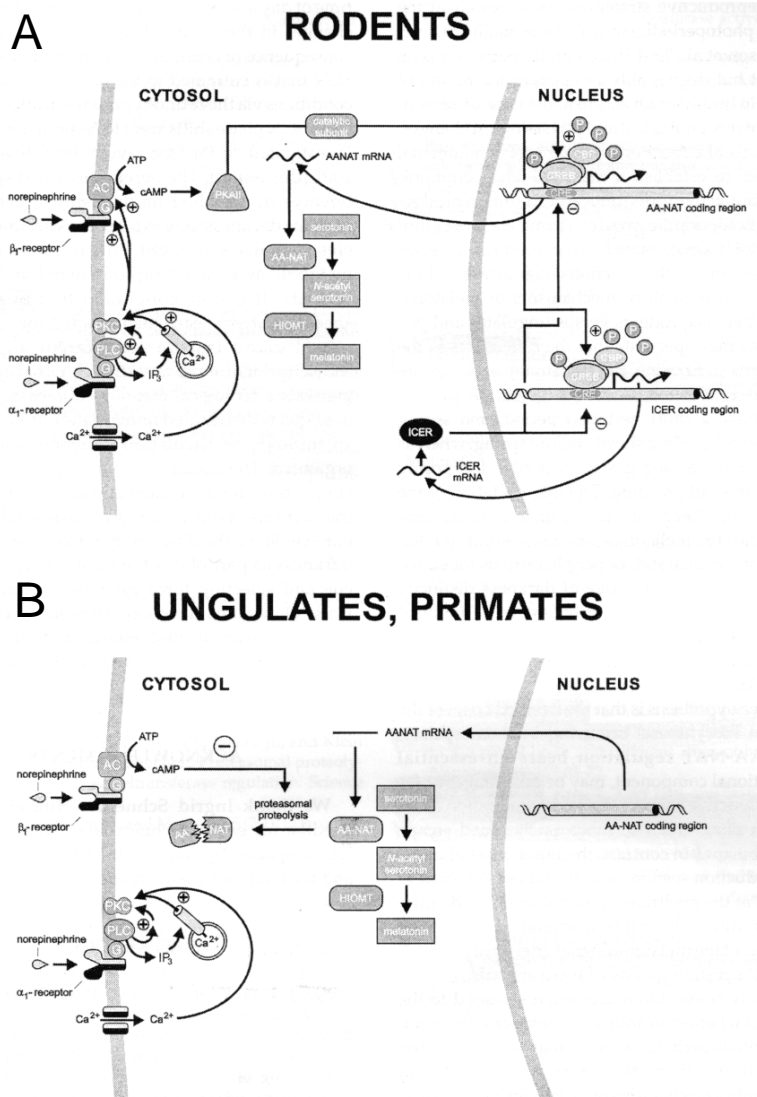
avec l'apparition d'un pic au cours de la nuit (Sugden, 2003) coïncidant avec le pic de la mélatonine.

#### 1.1.2.2. L'AANAT et la HIOMT

Plusieurs réactions enzymatiques sont nécessaires pour synthétiser la mélatonine à partir de la sérotonine. Premièrement, l'AANAT acétyle la sérotonine en N-acétyl-sérotonine. Son activité suit rigoureusement le rythme circadien, c'est pour cette raison que son activité est considérée comme limitante à la synthèse de la mélatonine (Pour revue: Klein, 2007). La seconde étape correspond au transfert d'un groupement méthyle sur le groupement 5-hydroxy de la N-acétyl-sérotonine via l'enzyme HIOMT (Figure 6). L'activité de celle-ci connaît une variation lumière/obscurité moins ample que l'activité de l'AANAT.

Ces deux enzymes sont communes à l'ensemble des mammifères. Cependant, leur mode de régulation montre des différences selon les espèces (Stehle et al., 2001). Des approches moléculaires récentes ont mis en évidence des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels régulant l'AANAT. Chez les rongeurs, la libération par le système sympathique de norépinéphrine durant la nuit stimule les récepteurs  $\alpha_1$  et  $\beta_1$ -adrénergiques des pinéaloctes et induit une augmentation du niveau intracellulaire de l'AMPc (Vanecek et al., 1985). Ce second messager induit la phosphorylation de l'élément de réponse liant l'AMPc (CREB ou c-AMP-response element-binding) via l'activation de la protéine kinase A (PKA). L'élément de réponse CREB phosphorylé se lie au promoteur du gène de l'AANAT et initie ainsi la transcription de cette enzyme. Deux heures après le début de la nuit, l'expression des ARNm de l'AANAT augmente, suivie de l'augmentation du niveau de la protéine et de l'activité de l'enzyme. Dans le modèle rongeur, la régulation de la synthèse de la mélatonine repose majoritairement sur ces mécanismes transcriptionnels (Figure 7A). Au contraire, chez les ongulés et les primates, la régulation de l'AANAT est exclusivement portée par des mécanismes post-traductionnels. En effet, l'AANAT est synthétisée de façon constitutive. La régulation de la quantité d'enzyme présente à l'intérieur de la cellule est effectuée par dégradation par le protéasome. Ce mécanisme de dégradation est diminué par l'augmentation de la concentration d'AMPc, responsable de l'augmentation de l'activité de l'enzyme pendant la nuit (Stehle et al., 2001) (Figure 7B).

Contrairement à la régulation de l'AANAT, l'activité de l'HIOMT serait modulée sur le long terme (sur plusieurs jours) par une stimulation noradrénergique nocturne liée à la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Ribelayga et al., 1999).



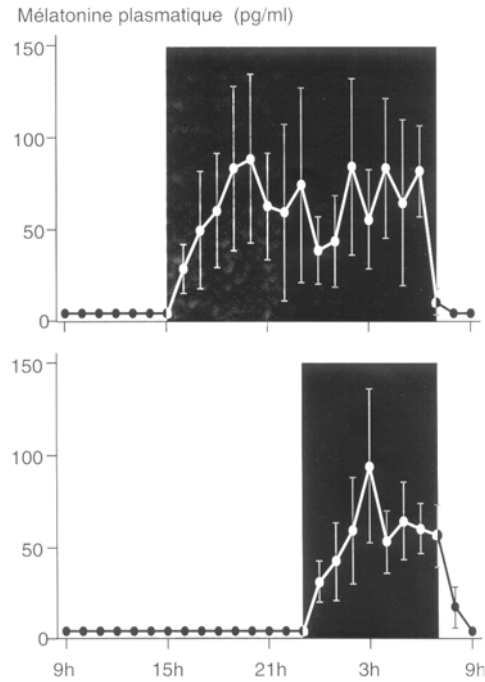
**Figure 7 : Schéma comparatif de la régulation noradrénergique de l'activité AANAT dans les pinéaloctes de rat (A) et de bovin (B).** AANAT : arylalkylamine N-acétyl-tranférése, AC : adénylate cyclase, CBP : protéine liant le CREB, CRE : élément de réponse liant l'AMPc, CREB : protéine liant le CRE, G : protéine liant le GTP, HIOMT : hydroxyindole-O-méthyltransférase, IP<sub>3</sub> : inositol tri-phosphate, PKAII : protéine kinase A de type 2, PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C. D'après Stehle et al., Journal of Biological Rhythms, 2001, vol 16.

### 1.1.3. Synthèses locales de la mélatonine

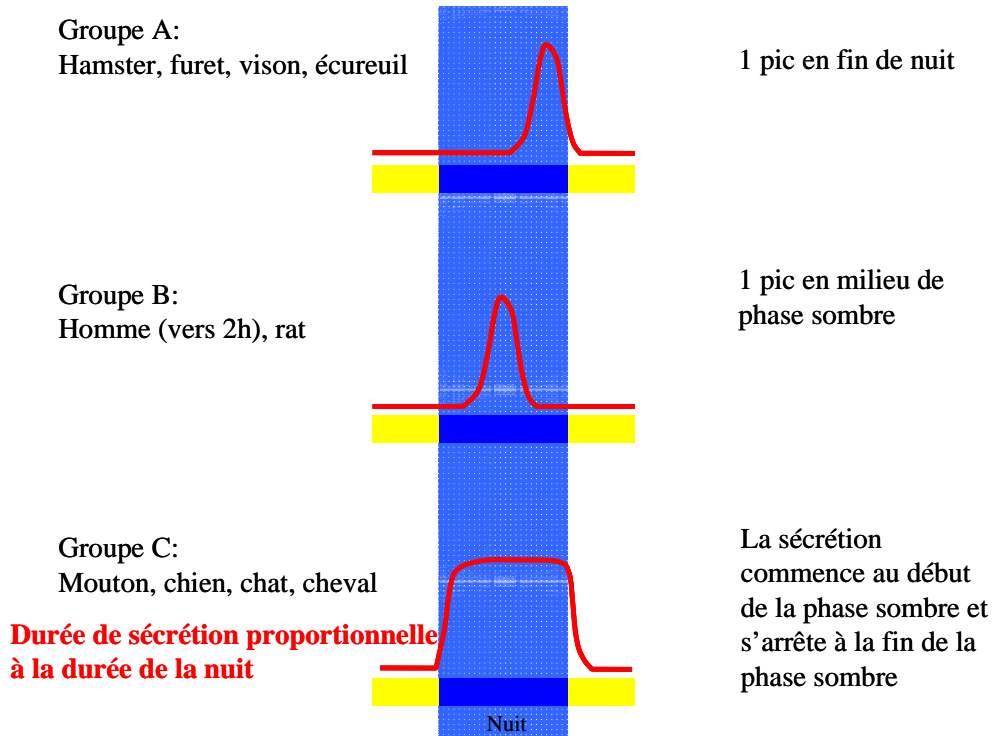
En utilisant la technique de la RT-PCR, qui permet de détecter de faibles taux de transcrits d'AANAT et d'HIOMT, il a été possible de démontrer leurs présences dans des tissus autres que la glande pinéale. Des synthèses locales se produiraient au niveau de la rétine, du tractus gastro-intestinal ainsi que dans des cellules de la moelle osseuse (Pour revue: Hardeland et al., 2006; Stefulj et al., 2001). La mise en évidence des ARNm des enzymes de synthèse ainsi que la détection de la mélatonine elle-même indique d'autres sites de synthèses locales au niveau de la peau (Slominski et al., 2002), du thymus de rat foetal (Jimenez-Jorge et al., 2005), des gonades (Tijmes et al., 1996) et des plaquettes (Champier et al., 1997). Cette mélatonine synthétisée localement est probablement impliquée, par une action paracrine, dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques, comme par exemple la régulation du système immunitaire et du tractus gastro-intestinal.

### 1.1.4. Sécrétion de la mélatonine

La mélatonine est une hormone hautement lipophile, par conséquent aucun stockage n'est possible dans les lieux de synthèse. Le profil de sécrétion de l'hormone circulante reflète donc l'activité de sa synthèse par la glande pinéale. Le profil de sécrétion de la mélatonine reflète les durées respectives du jour et de la nuit. Ainsi, plus les jours sont courts (durée de la phase claire), plus la durée de sécrétion de la mélatonine est longue (durée de la phase sombre), et inversement (Figure 8). La durée nécessaire pour atteindre la concentration maximale de mélatonine varie selon les espèces. Trois grands groupes peuvent être distingués (Figure 9). Dans le groupe A, les niveaux de mélatonine restent faibles durant la première partie de la nuit, puis augmentent en milieu de nuit pour finalement diminuer à des taux faibles juste avant le début du jour. Dans ce groupe sont retrouvés le hamster Syrien, la souris, le rat ou encore la gerbille. Dans le groupe B, les niveaux de mélatonine augmentent d'abord lentement dès le début de la phase sombre pour atteindre un pic en milieu de nuit et ensuite diminuer pour retrouver des niveaux faibles avant l'aube. L'homme et le rat sont des espèces qui présentent ce profil de sécrétion de mélatonine. Dans le groupe C, la durée de sécrétion de la mélatonine est égale à la durée de la nuit. En effet, les taux de mélatonine atteignent leur maximum dès le début de la phase sombre, pour ne diminuer qu'au début du jour. Ces profils sont décrits chez le mouton, la chèvre et le hamster sibérien (Karsch et al., 1984). Les caractéristiques du rythme de sécrétion de la mélatonine varient donc en réponse aux changements de la durée du jour et donc de la nuit. L'implication de la mélatonine dans



**Figure 8 : Profils nycthémeraux de sécrétion de la mélatonine chez la chèvre pendant les jours courts (en haut) et les jours longs (en bas).** Les cadres noirs représentent la nuit. D'après Malpaux *et al.*, *Productions Animales*, 1996, vol 9.



**Figure 9: Représentation schématique des différents profils de sécrétion de mélatonine.** Adapté d'après cours de Benoît Malpaux.

l'intégration de la photopériode est ainsi très importante pour l'induction des réponses physiologiques, notamment la mise en place de la saison de reproduction.

En plus du rythme endogène de sécrétion de la mélatonine, sa capacité de liaison à ses propres récepteurs varie au cours de la journée. L'information photopériodique traduite par la mélatonine peut influencer soit le niveau d'expression de ses récepteurs, soit leurs mécanismes transductionnels et/ou d'adressage aux compartiments cellulaires (Pour revue: Dubocovich et al., 2010).

#### 1.1.5. Dégradation de la mélatonine

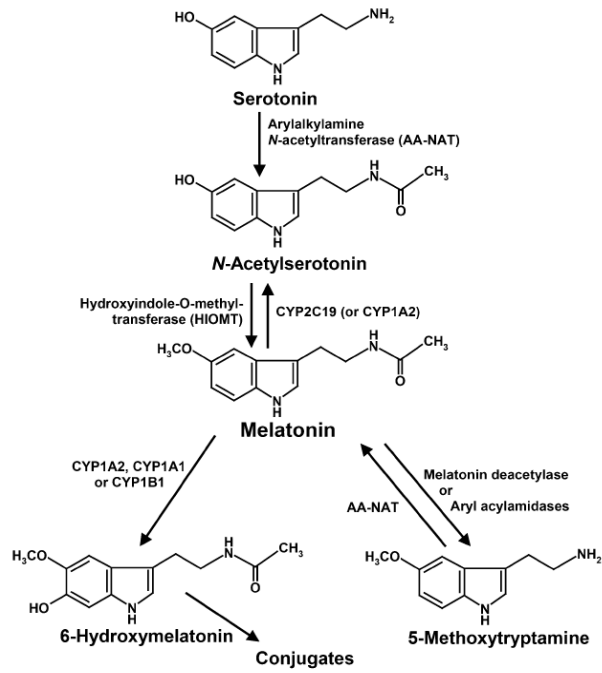
##### 1.1.5.1. Dégradation hépatique

La mélatonine circulante possède une demi-vie très courte, de l'ordre de 30 min (Bechgaard et al., 1999; Waldhauser et al., 1984; Zarazaga et al., 1998). Chez l'homme, l'hormone est dégradée à plus de 90% dans le foie, dès le premier passage (Young et al., 1985). La mélatonine circulante est convertie en 6-hydroxy-mélatonine, principalement par l'isoforme CYP1A2 du cytochrome P450 (Skene et al., 2001). La 6-hydroxy-mélatonine est ensuite conjuguée à un groupement sulfate ou, de façon plus rare, à un acide glucuronique (Figure 10). Ces réactions de conjugaison permettent l'élimination dans les urines (Leone et al., 1987). Chez l'homme, le rythme de mélatonine est fréquemment évalué par un dosage de ce métabolite, puisque son profil de concentration dans les urines reflète celui de la mélatonine circulante.

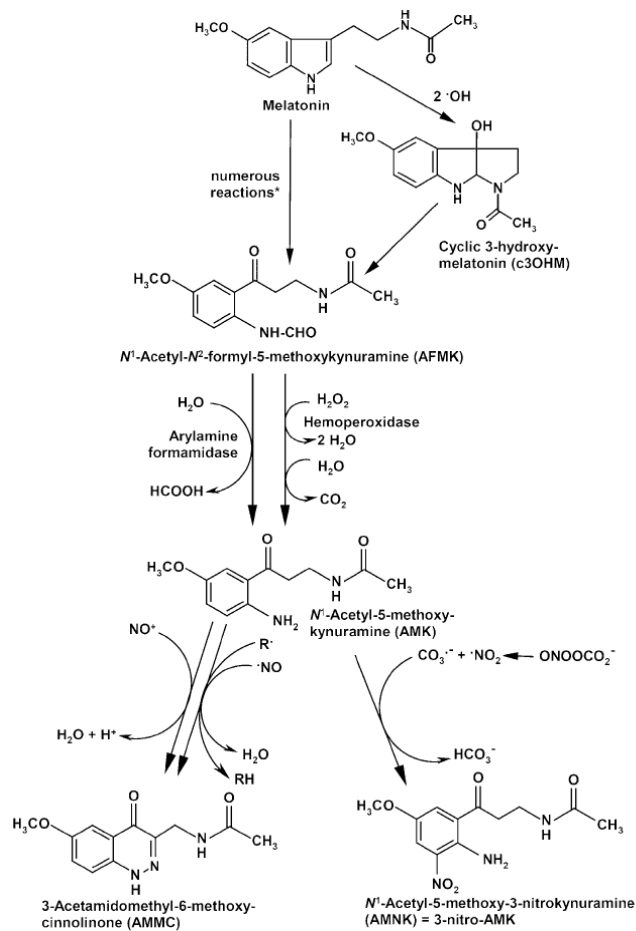
##### 1.1.5.2. Dégradation cérébrale

Le catabolisme de la mélatonine dans le cerveau est différent de celui observé au niveau hépatique. Le groupement pyrrole de la mélatonine est clivé. Le N<sup>1</sup>-acétyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-méthoxykynuramine (AFMK), premier produit de dégradation, subit une déformylation, par l'arylamine formidase ou l'hémopéroxydase, pour aboutir au N<sup>1</sup>-acétyl-5-méthoxykynuramine (AMK) (Arendt, 1995; Rozov et al., 2003) (Figure 11).

Dans les tissus d'origine neuronale, comme la rétine et la glande pinéale, l'aryl acylamidase catalyse la désacétylation de la mélatonine en 5-méthoxy-tryptamine. Ensuite, ce composé est dégradé en suivant la voie des indoleamines et des catécholamines. Une mono-amine oxydase intervient alors pour former le 5-méthoxyindole acétaldéhyde. La dernière étape est soit une oxydation en acide 5-méthoxyindoleacétique, soit une réduction en 5-méthoxytryptophol (Grace et al., 1991).



**Figure 10 : Synthèse et catabolisme hépatique de la mélatonine.** CYP: isoforme du cytochrome P450. D'après Pandi-Perumal at al., 2006



**Figure 11 : Catabolisme cérébral de la mélatonine.** D'après Pandi-Perumal at al., 2006

Ces métabolites produits dans le foie, 6-hydroxy-mélatonine, et dans le cerveau, l'AFMK et l'AMK, sont connus pour moduler l'activation des récepteurs mélatoninergiques. La 6-hydroxy-mélatonine empêche la liaison de la 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-mélatonine sur les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> (Dubocovich et al., 1997).

## 1.2. Effets de la mélatonine

L'effet le plus connu de la mélatonine concerne la régulation des rythmes biologiques aussi bien à l'échelle de la saison qu'à l'échelle de la journée avec le rythme circadien (Hardeland et al., 2006). Néanmoins d'autres rôles sont attribués à la mélatonine : des rôles anti-mitotiques et anti-oxydants, des rôles sur le système immunitaire, sur la dépression, sur le sommeil et sur le système cardio-vasculaire.

### 1.2.1. Effets physiologiques de la mélatonine sur les rythmes biologiques

#### 1.2.1.1. Effet de la mélatonine sur la saisonnalité

Chez la plupart des animaux, la majorité des naissances se fait au printemps, saison où les conditions environnementales sont les plus favorables pour les petits (disponibilité des ressources, prédation, conditions climatiques). De ce fait, la période d'activité sexuelle dépend de la durée de gestation de chaque espèce. Par exemple, pour l'espèce équine, la gestation dure en moyenne 11 mois, l'activité sexuelle aura lieu par conséquent au printemps, tout comme chez les animaux dont la durée de gestation est très courte (quelques semaines à quelques mois) tels certains rongeurs (Figure 12). Les variations de la durée du jour sont reproductibles d'une année à l'autre. Elles sont traduites au niveau central par un rythme nyctéméral de sécrétion de mélatonine qui traduit la durée de la nuit au cours de l'année. Cet événement sert de repère physiologique du moment de l'année pour le système nerveux central. Les animaux dits photopériodiques utilisent cette information (augmentation ou diminution de la durée du jour et de la nuit) pour adapter leur physiologie et leur comportement aux changements saisonniers. La mélatonine joue donc un rôle primordial dans la fonction de reproduction chez les animaux saisonnés puisque chez les animaux pinéalectomisés le rythme endogène de reproduction est en libre-cours et devient désynchronisé entre individus, alors que l'apport de mélatonine exogène restaure la synchronisation du rythme de reproduction entre les animaux (Figure 13).

Les sites d'actions de la mélatonine pour le contrôle de la saisonnalité de la reproduction sont identifiés chez plusieurs espèces dans différentes structures cérébrales. Des études

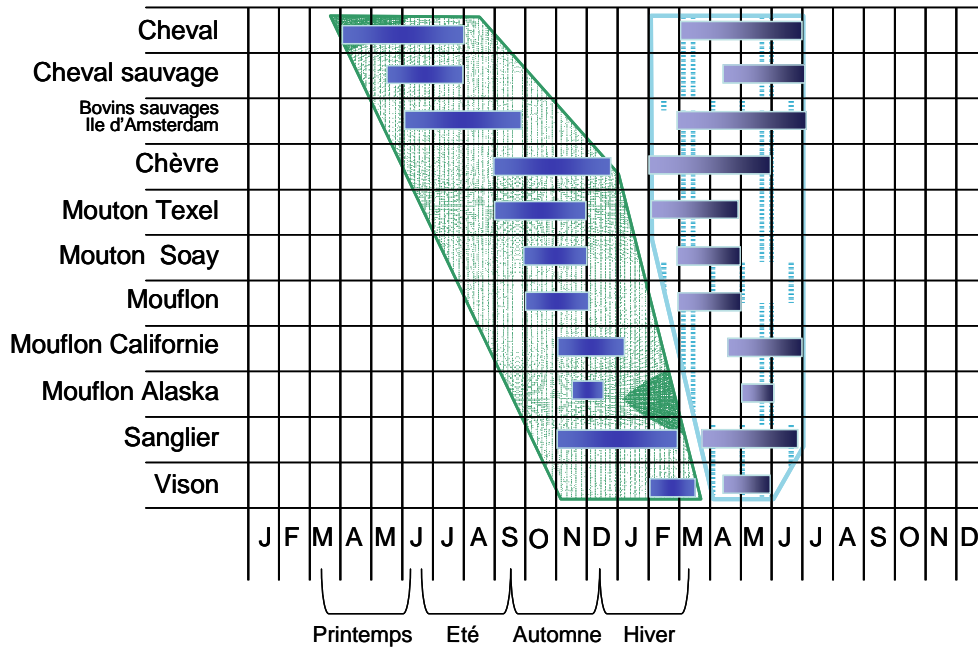


Figure 12 : Périodes d'accouplement et de naissance chez quelques mammifères sauvages européens (en vert: la saison sexuelle et la fécondation, en bleu: les naissances).

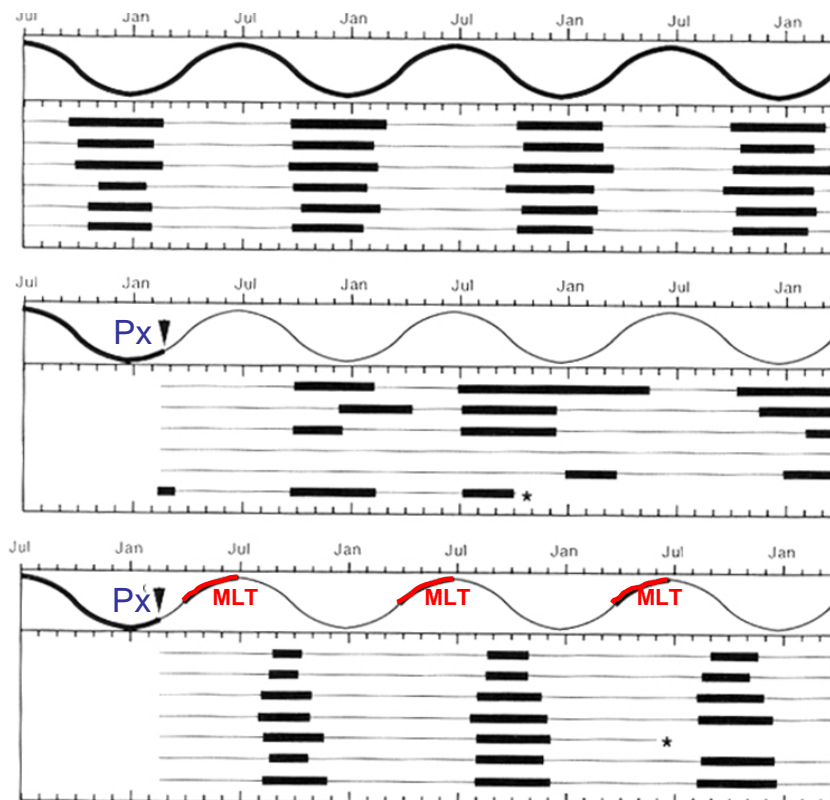


Figure 13 : Effet de la pinéalectomie sur la saisonnalité de la reproduction. Px : pinéalectomie, MLT : apport de mélatonine. Les flèches indiquent le moment de la pinéalectomie. Les barres noires correspondent à l'activité sexuelle. D'après Woodfill et al., 1992.

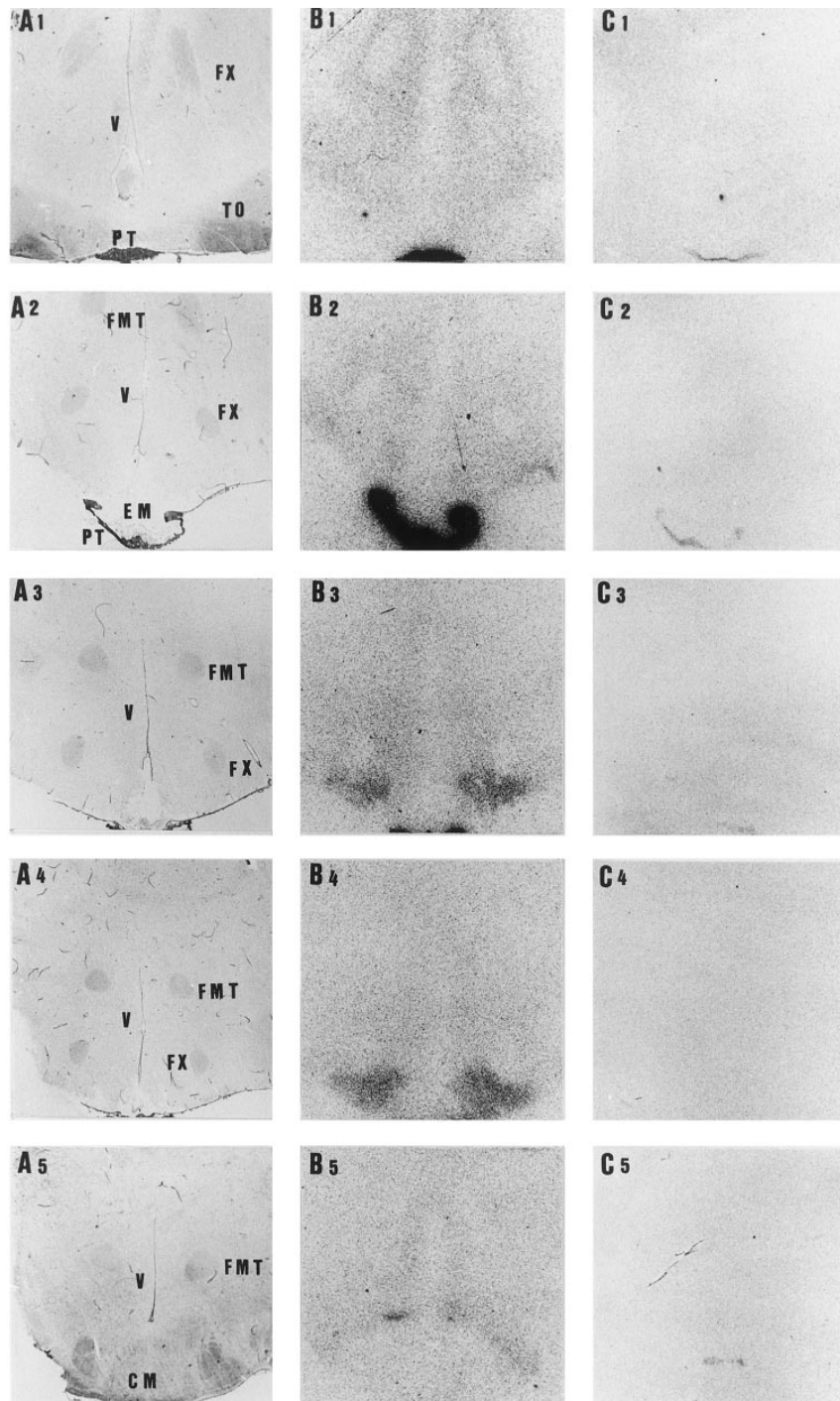


d'autoradiographies utilisant la 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-MLT sur tissus cérébraux révèlent l'existence de sites de liaison dans l'ensemble de l'hypothalamus. Deux sites de liaison sont communs à l'ensemble des espèces étudiées : la *pars tuberalis* (PT), partie la plus rostrale de l'adénohypophyse composée de cellules glandulaires entourant l'éminence médiane ainsi que les noyaux hypothalamiques (HPM pour hypothalamus medio-basal) (Malpaux et al., 1998; Masson-Pevet and Gauer, 1994; Vanecek, 1988a) (Figure 14). La mélatonine en agissant sur ces deux sites distincts affecte respectivement, la sécrétion de prolactine ainsi que la sécrétion des hormones gonadotropes.

**i) action de la mélatonine au niveau de la PT :**

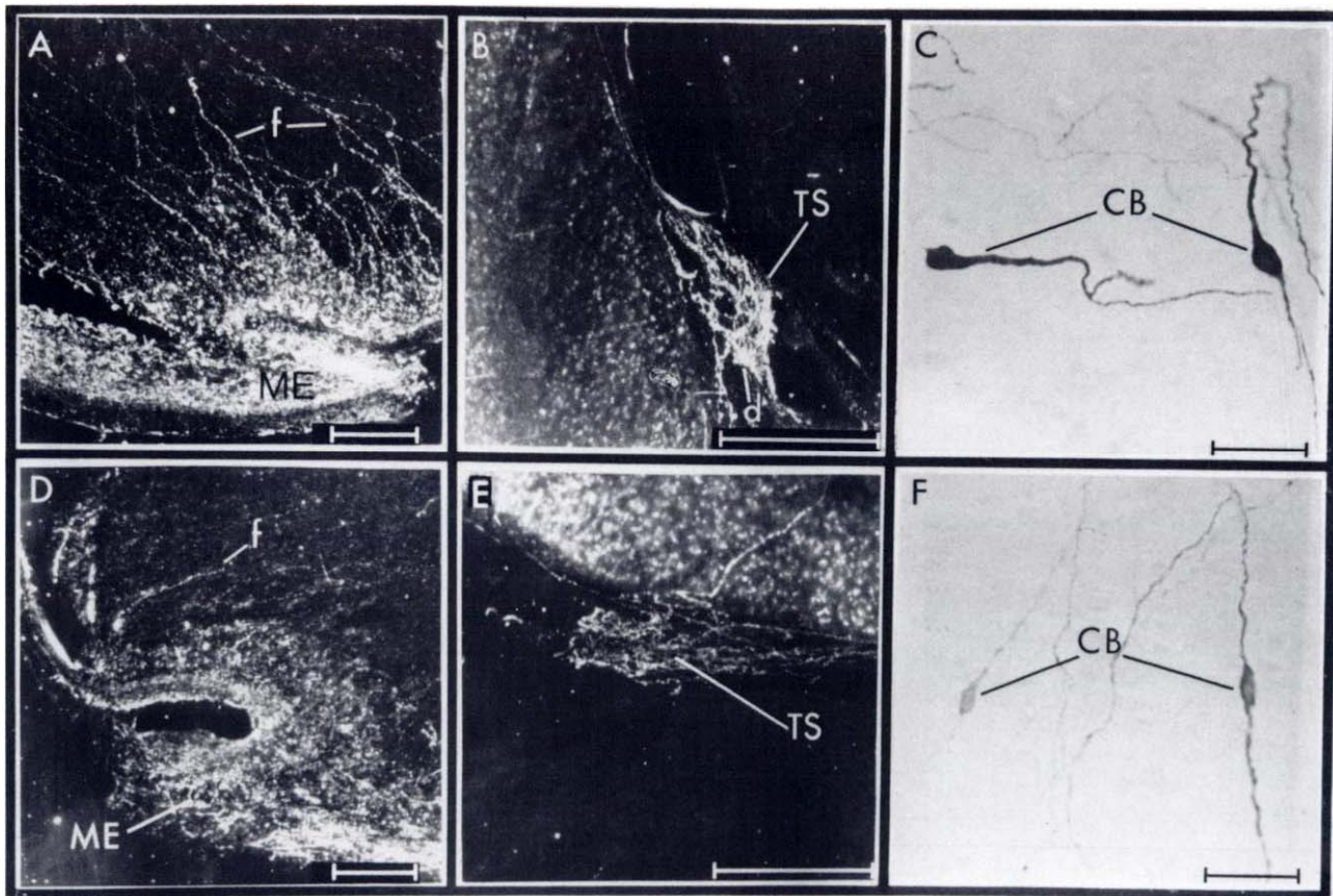
Dans l'espèce ovine, après avoir déconnecté chirurgicalement l'hypothalamus de l'hypophyse, les profils de sécrétion de prolactine restent normaux en réponse à des changements photopériodiques ou à un traitement avec de la mélatonine (Lincoln and Clarke, 1994). Suite à ces observations, les sites de liaison pour la mélatonine de la PT ont été proposés pour contrôler la sécrétion de la prolactine puisque les cellules lactotrophes de la PT ne possèdent pas de récepteurs à la mélatonine. Ce serait donc les cellules de PT qui serviraient d'intermédiaire pour transmettre le message photopériodique à l'hypophyse via essentiellement des produits de sécrétion spécifiques à la PT, connus sous le terme générique de tubéraline. La mélatonine, en agissant directement sur les récepteurs MT<sub>1</sub> exprimés par la PT (Lincoln and Clarke, 1994), module plusieurs fonctions, comme l'activité gonadique, le phénomène de lactation ou encore la mue saisonnière (Duncan, 2007). De plus, des études récentes démontrent que la mélatonine régule la sécrétion de TSH (thyrotropin stimulating hormone) par les cellules endocrines de la PT. La TSH active ensuite la transcription de plusieurs gènes incluant la déiodinase 2 dans les tanocytes, cellules épendymaires spécialisées bordant le troisième ventricule cérébral (Dardente et al., 2010; Hanon et al., 2008; Nakao et al., 2008). La déiodinase 2 catalyse la conversion de la T<sub>4</sub>, hormone thyroïdienne inactive en T<sub>3</sub>, hormone thyroïdienne bioactive, qui à son tour, agit au niveau hypothalamique pour activer l'activité de reproduction dans de nombreuses espèces (Anderson et al., 2002; Anderson et al., 2003; Barrett et al., 2007; Billings et al., 2002; Yasuo et al., 2006). Ces travaux étayaient l'hypothèse d'un rôle de la *pars tuberalis* comme site d'action de la mélatonine.

**ii) action de la mélatonine au niveau de l'HPM :**



**Figure 14: Sections coronales d'hypothalamus de mouton illustrant la distribution des sites de liaison de la mélatonine. De Haut en bas coupes de la plus rostrale à la plus caudale (1-5). Colonne gauche (A), Coupes colorées au violet de Crésyl; Colonne du milieu (B), autoradiographie de la liaison totale de l'iodomélatonine; Colonne droite (C), liaison non spécifique; V : troisième ventricule, FMT : fasciculus mamillothalamicus, Fx : fornix, TO : tractus opticus, CM : corpus mamillare, EM : median eminence, PT : pars tuberalis. D'après Malpoux et al., 1998**

La synthèse et la sécrétion des hormones gonadotropes, l'hormone lutéinisante ou LH (Luteinizing Hormone) et l'hormone folliculo-stimulante ou FSH (Folliculo Stimulating Hormone) sont sous le contrôle de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) sécrétée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Comme leur nom l'indique, ces hormones gonadotropes agissent directement au niveau des gonades pour moduler la stéroïdogénèse et la gamétogénèse. L'ovaire produit des stéroïdes sexuels, la progestérone et l'oestradiol, qui participent par des rétrocontrôles hypothalamiques et hypophysaires à la régulation de la sécrétion de GnRH puis de LH et FSH tout au long de l'année. La photopériode induit des changements de l'activité sexuelle à travers des modifications de sécrétion des hormones gonodotropes, LH et FSH. L'action de la mélatonine peut affecter les trois niveaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Seule l'action de la mélatonine au niveau de l'hypothalamus sera décrite dans ce paragraphe en raison de son rôle majeur. L'hypothalamus est le siège du processus neuronal du contrôle de la saisonnalité de la reproduction. Des sites de liaison de la mélatonine ont été identifiés dans de nombreux noyaux hypothalamiques, en particulier l'hypothalamus prémammillaire (HPM) (Malpaux et al., 1998) chez la brebis (Figure 14) et l'hypothalamus dorsomédian (HDM) chez le hamster (Maywood et al., 1996). Des expériences utilisant des micro-implants de mélatonine et/ou des approches neurochirurgicales montrent l'importance de ces aires hypothalamiques dans la synchronisation de la saisonnalité de la reproduction (Malpaux et al., 1998; Maywood et al., 1996). De plus, l'administration de mélatonine au niveau de la PT de brebis en anoestrus n'a pas d'effet sur les niveaux de LH, alors que la même approche dans l'HPM mène à une augmentation des niveaux de LH dans les 45 à 60 jours, suggèrent que l'HPM est nécessaire à la transduction du signal photopériodique vers le système neuronal contrôlant dans la reproduction. Dans plusieurs espèces, un traitement mélatoninergique induit une augmentation de l'immunoréactivité des corps cellulaires des neurones à GnRH dans l'hypothalamus, ainsi qu'une augmentation de la densité des cellules contenant du GnRH dans l'éminence médiane (Glass, 1986) (Figure 15). Chez le vison, des explants d'hypothalamus et de PT sont incubés *in vitro* pendant 8 ou 16h avec de la mélatonine, pour mimer respectivement les jours longs ou les jours courts. Une quantité plus importante de GnRH est sécrétée par les explants stimulés par des conditions mimant les jours longs (Messenger et al., 1999). Des études *in vivo* ont permis de vérifier l'effet de la saison et de la mélatonine sur la libération de GnRH. Chez les brebis, le GnRH est directement mesuré dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Caraty et al., 1995). La fréquence des pulses de



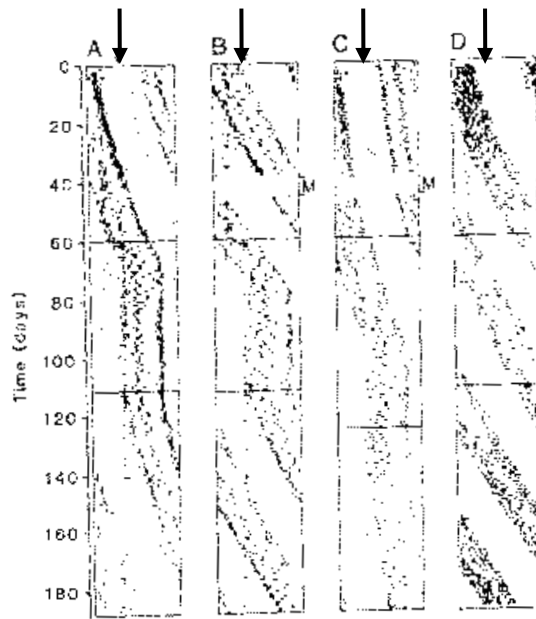
**Figure 15 : Immunoréactivité des corps cellulaires des neurones à GnRH dans l'hypothalamus et l'éminence médiane, chez la souris *P. leucopus*.** A-C : sections parasagittales de l'hypothalamus basal (A), du noyau triangulaire du septum (B), et de l'aire préoptique médiane (C) d'animaux exposés à une photopériode courte ; D-F : sections parasagittales de l'hypothalamus basal (D), du noyau triangulaire du septum (E), et de l'aire préoptique médiane (F) d'animaux exposés à une photopériode longue ; **CB**: corps cellulaires, **f**: Fibres à GnRH, **ME**: éminence médiane, **TS**: noyau triangulaire du septum. Les barres de calibrations: A, B, D, E = 125  $\mu$ m et C, F = 40 $\mu$ m. (D'après Glass, 1986)

GnRH en anoestrus ainsi que pendant la phase lutéale de l'oestrus est faible (1 pulse/12h). En saison de reproduction, la fréquence des pulses augmente significativement (8 pulses/ 6h) (Barrell et al., 1992; Viguie et al., 1995). Les brebis ovariectomisées avec implant d'oestradiol, placées en jours courts, voient la fréquence de leurs pulses de GnRH augmenter. La sécrétion pulsatile de LH est stimulée 40 à 60 jours après le début du traitement photopériodique ce qui correspond au déclenchement de l'ovulation chez des femelles entières (Karsch et al., 1984). Toutes ces études indiquent un rôle de la mélatonine sur les neurones à GnRH mais cet effet n'est pas direct et implique un réseau neuronal (stéroïdes (Bittman et al., 1985), catécholamines (Havern et al., 1994; Thiery et al., 1995), sérotonine (Le Corre and Chemineau, 1993), opioïdes (Aurich et al., 1994; Lincoln et al., 1987), NPY (Tillet et al., 1989), acides aminés excitateurs (Brann and Mahesh, 1994)).

#### 1.2.1.2.Effet de la mélatonine sur les rythmes circadiens

La première mise en évidence de l'effet de la mélatonine sur les rythmes circadiens a été faite par Redman et Armstrong en 1983 (Figure 16). L'activité en libre cours de rats, mesurée en obscurité constante, est entraînée par une injection journalière de mélatonine. Cette synchronisation du rythme n'est obtenue que lorsque l'injection de mélatonine coïncide avec le début de la nuit subjective (Redman et al., 1983). Quand les injections cessent, les animaux retrouvent une activité en libre cours, avec une période différente de 24h. La mélatonine entraîne les rythmes circadiens dans plusieurs espèces de rongeurs, mais le rôle synchroniseur de la mélatonine comme synchroniseur est débattu chez le hamster syrien. La mélatonine, apportée par infusion prolongée pendant la journée, est capable d'entraîner un rythme de l'activité locomotrice chez des hamsters syriens pinéalectomisés. La mélatonine affecterait donc indirectement ou directement le fonctionnement de l'horloge biologique (Schuhler et al., 2002). L'effet chronobiologique de la mélatonine exogène sur les espèces de rongeurs nocturnes et diurnes est bien établi avec une fenêtre de sensibilité pour la mélatonine exogène située au moment des transitions lumière/obscurité (Sloten et al., 2002).

Chez l'homme, la mélatonine est utilisée pour rétablir le rythme circadien suite à un décalage horaire (Wynn and Arendt, 1988) ou à des conditions de travail décalé (3 x 8). Des études montrent un effet positif de la prise de mélatonine sur les effets « secondaires » liés au décalage horaire, comme la perte de sommeil et la diminution de la vigilance (Herxheimer, 2005). Le caractère nocturne de la sécrétion de mélatonine a conduit à considérer cette



**Figure 16:** Tracé sur 24h de l'activité de trois rats recevant des injections journalières de mélatonine (A, B et C) et d'un rat recevant une injection de solution contrôle (D). Les lignes horizontales délimitent les enregistrements avant, pendant et après les injections. Les flèches indiquent le moment des injections et le M indique des données manquantes. (D'après Redman et al. 1983)

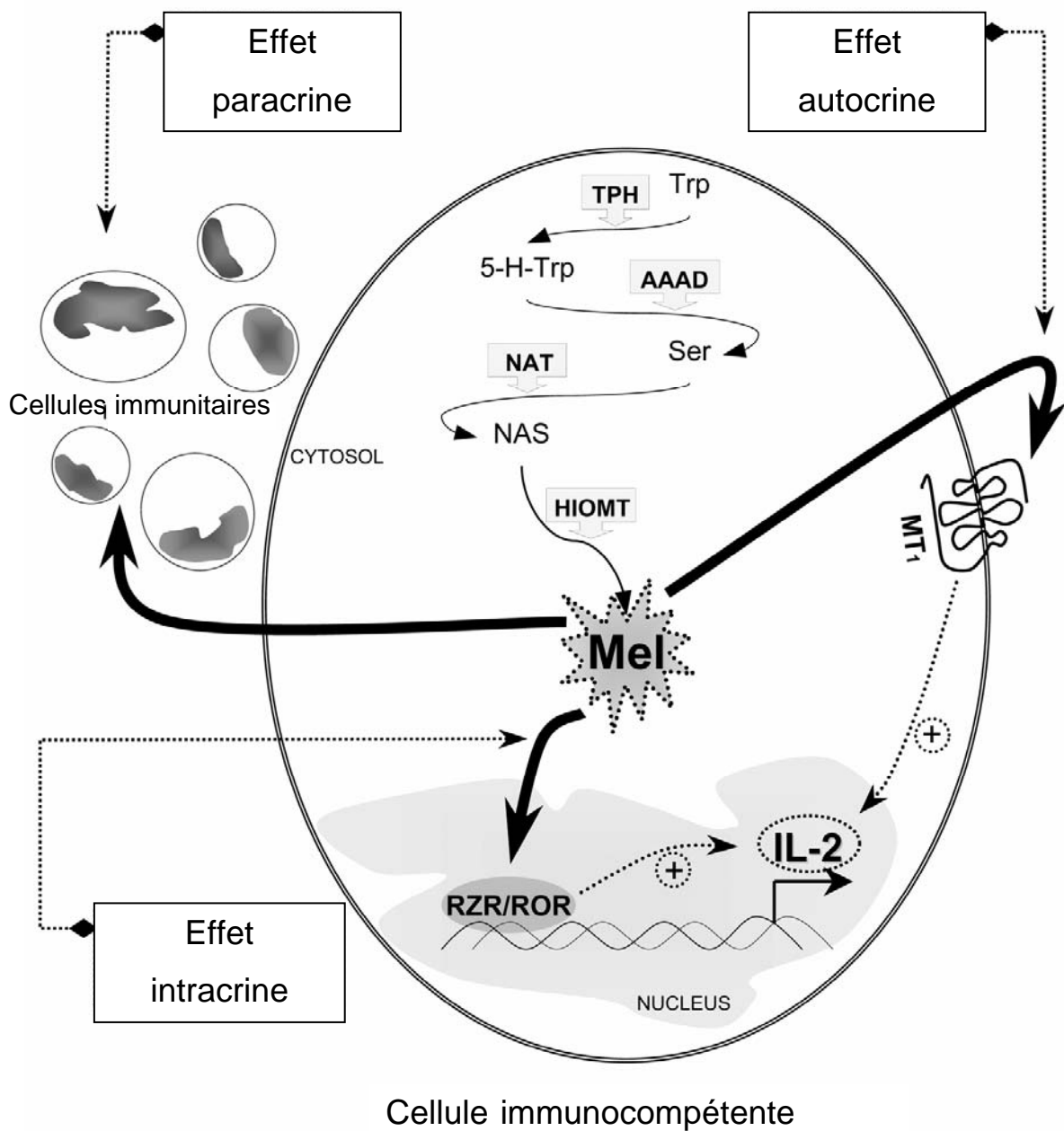
hormone comme un hypnotique naturel, ou comme une molécule capable de moduler le sommeil. L'effet hypnotique de la mélatonine est controversé. En comparant des sujets sains et des sujets insomniaques, Brzezinski et ses collaborateurs (Brzezinski et al., 2005), concluent à un effet significatif mais minime de la mélatonine sur la latence d'apparition, l'efficacité et la durée du sommeil. Une autre étude (Agency for Healthcare research and Quality de l'Université d'Alberta) conclut sur le peu d'intérêt de la mélatonine comme promoteur de sommeil, sauf dans le cas particulier des insomnies par retard de phase. Un traitement mélatoninergique n'est absolument pas adapté à l'insomnie des personnes âgées, causée par une diminution de l'amplitude du rythme de mélatonine. Ce phénomène est probablement lié à la calcification de la glande pinéale liée à l'âge (Schmid, 1993). De plus, chez les animaux de laboratoires, essentiellement nocturnes, le pic de production de mélatonine est également nocturne, bien que les animaux soient en pleine activité, démontrant que la mélatonine n'est pas une substance hypnotique ; elle ne régite pas le sommeil, mais la succession des phases diurnes et nocturnes.

### 1.2.2. Effets physiologiques de la mélatonine sur d'autres fonctions biologiques

#### 1.2.2.1. Effets activateurs sur le système immunitaire

Des rats pinéalectomisés ne peuvent pas générer de réponse immunitaire complète suite à, par exemple, une transplantation de peau (Jankovic et al., 1970). Plus récemment, il a été mis en évidence que de la mélatonine était produite au niveau des lymphocytes (Pour revue: Carrillo-Vico et al., 2005) et que cette production était fortement liée à la sécrétion de l'interleukine-2 (IL-2) (Carrillo-Vico et al., 2004). Les récepteurs mélatoninergiques sont exprimés par les lymphocytes et semblent être impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (Guerrero and Reiter, 2002; Skwarlo-Sonta et al., 2003) (Figure 17). Le luzindole, antagoniste mélatoninergique, bloque la prolifération lymphocytaire induite par la mélatonine, aussi bien chez la souris sauvage que chez la souris invalidée pour le gène  $MT_1$ . Cet effet semble être directement relayé par les récepteurs  $MT_2$  (Drazen and Nelson, 2001).

Les effets de la mélatonine sur le système immunitaire sont dépendants de la concentration de celle-ci. Par exemple, la prolifération des lymphocytes et des cellules T est inhibée par des concentrations importantes de mélatonine (1mM) (Konakchieva et al., 1995). A des concentrations physiologiques de mélatonine, la prolifération des cellules T ainsi que la synthèse de cytokines pro-inflammatoires sont accélérées (Caroleo et al., 1992).



**Figure 17: Représentation schématique du mode d'action intracrine, autocrine et paracrine de la mélatonine sur le système immunitaire.**

**Trp:** Tryptophane, **TPH:** Tryptophane Hydroxylase, **5-H-Trp:** 5-hydroxy-tryptophane, **AAAD:** L-amino-acide aromatique decarboxylase ou tryptophane décarboxylase, **Ser:** Sérotonine, **NAT:** N-acétyl-transférase, **NAS:** N-acétyl-sérotonine, **HIOMT:** hydroxyindole-O-méthyltransférase, **Mel:** Mélatonine, **MT1:** récepteur MT1, **IL-2:** interleukine 2, **RZR/ROR:** récepteurs nucléaires RZR/ROR. D'après Carrillo-Vico, 2004.



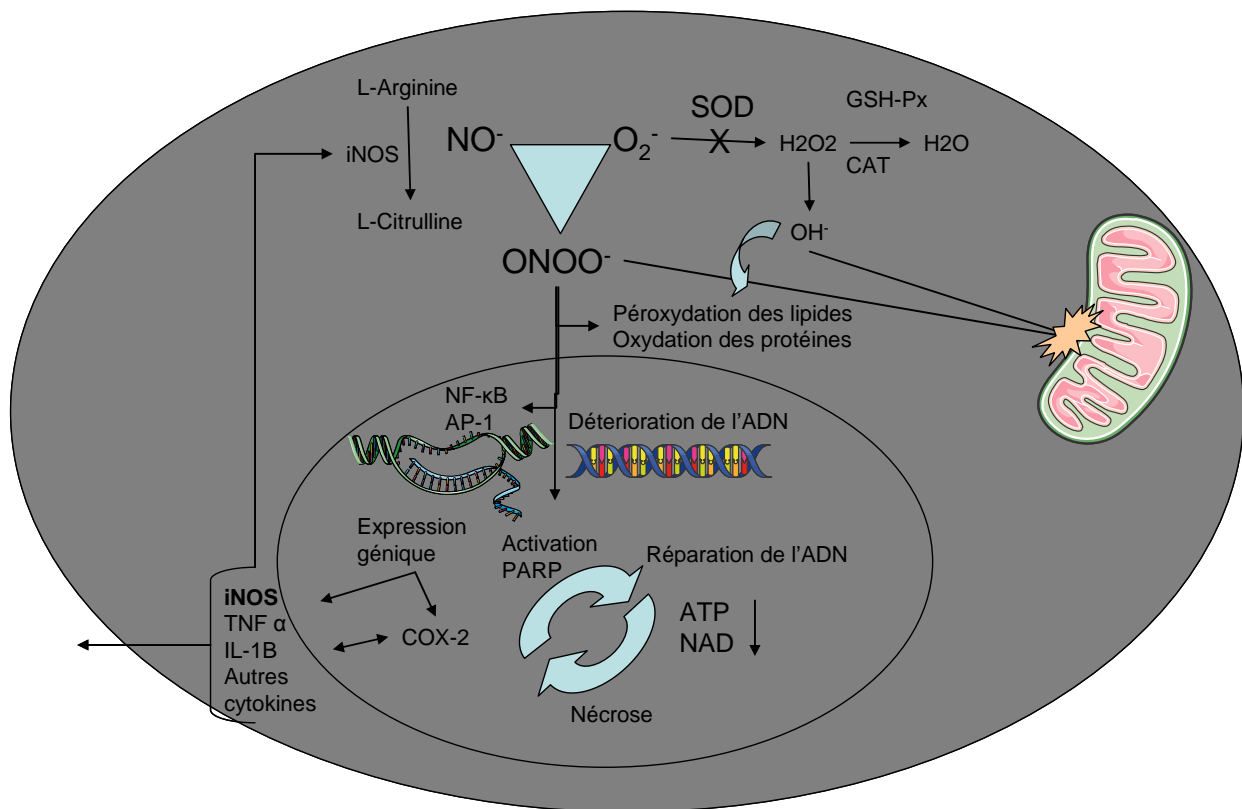
#### 1.2.2.2.Effets sur le système cardio-vasculaire et sur la température corporelle

De nombreuses études ont montré le rôle de la mélatonine dans la régulation du système cardio-vasculaire (Krause et al., 1999). Il semblerait que la vasodilatation des artères induite par la mélatonine et l'augmentation de la pression sanguine joueraient un rôle dans l'action hypothermique de l'hormone (Krauchi et al., 1997). Chez l'homme, le pic nocturne endogène de mélatonine est corrélé avec une augmentation de la température corporelle (Cagnacci et al., 1992) et avec une réduction de la pression sanguine ((Reiter et al., 2009b; Simko and Pechanova, 2009)

#### 1.2.2.3.Effets anti-oxydants et anti-mitotiques

Les effets anti-oxydants de la mélatonine ont été initialement décrits en 1993 puis confirmés en 2002 par Tan et ses collaborateurs (Reiter et al., 2002). En plus de sa capacité à neutraliser les radicaux libres, la mélatonine capte d'autres agents d'oxydation tels que les anions peroxy-nitreux, les singlets d'oxygène, les radicaux hydroxyle et l'oxyde nitreux (Reiter et al., 2009a). Il apparaît donc que la mélatonine ainsi que certains de ses métabolites sont capables de protéger les cellules du stress oxydatif (Figure 18). L'oxygène est le précurseur de nombreux radicaux libres. Les mitochondries, sièges de la chaîne respiratoire, contribuent à une production massive de radicaux libres. Dans une culture d'astrocytes de rat, Jou et ses collaborateurs (Jou et al., 2004) observent que la mélatonine interrompt la formation des radicaux libres et d'autres agents toxiques. De plus, les changements morphologiques (modifications de la membrane plasmique, condensation du noyau, augmentation du volume des mitochondries) caractéristiques du stress oxydatif, pouvant entraîner la mort cellulaire, sont réduits en présence de mélatonine.

Cette propriété anti-apoptotique de la mélatonine est intéressante dans le système nerveux central, compte tenu du fait que la majorité des maladies neuro-dégénératives sont dues à une dérégulation de la mort cellulaire. La mélatonine inhibe la cascade moléculaire aboutissant à l'apoptose, réduit la perte neuronale dans les modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson (Chetsawang et al., 2009; Kaur and Ling, 2008) et de la maladie d'Alzheimer (Olcese et al., 2009; Pappolla et al., 1997; Zhou et al., 2008). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, un dysfonctionnement des mitochondries est observé. Une étude récente montre qu'un traitement d'un mois par la mélatonine diminue l'apparition de la protéine beta-amyloïde dans les mitochondries des souris utilisées comme modèle de la maladie d'Alzheimer (Dragicevic, 2011).



**Figure 18 : Représentation schématique du stress oxydatif.** La mélatonine est une molécule unique qui possède des effets bénéfiques sur l'ensemble des étapes de ce processus pathophysiologique. La mélatonine bloque la production de cytokines pro-inflammatoires en réduisant la translocation dans le noyau des facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B et AP-1) et elle inhibe directement iNOS et l'enzyme inflammatoire COX-2. Le mode d'action de mélatonine atténue le stress oxydatif et réduit l'inflammation. La mélatonine préserve l'énergie cellulaire notamment en prévenant les mitochondries du stress nitro-oxydatif.

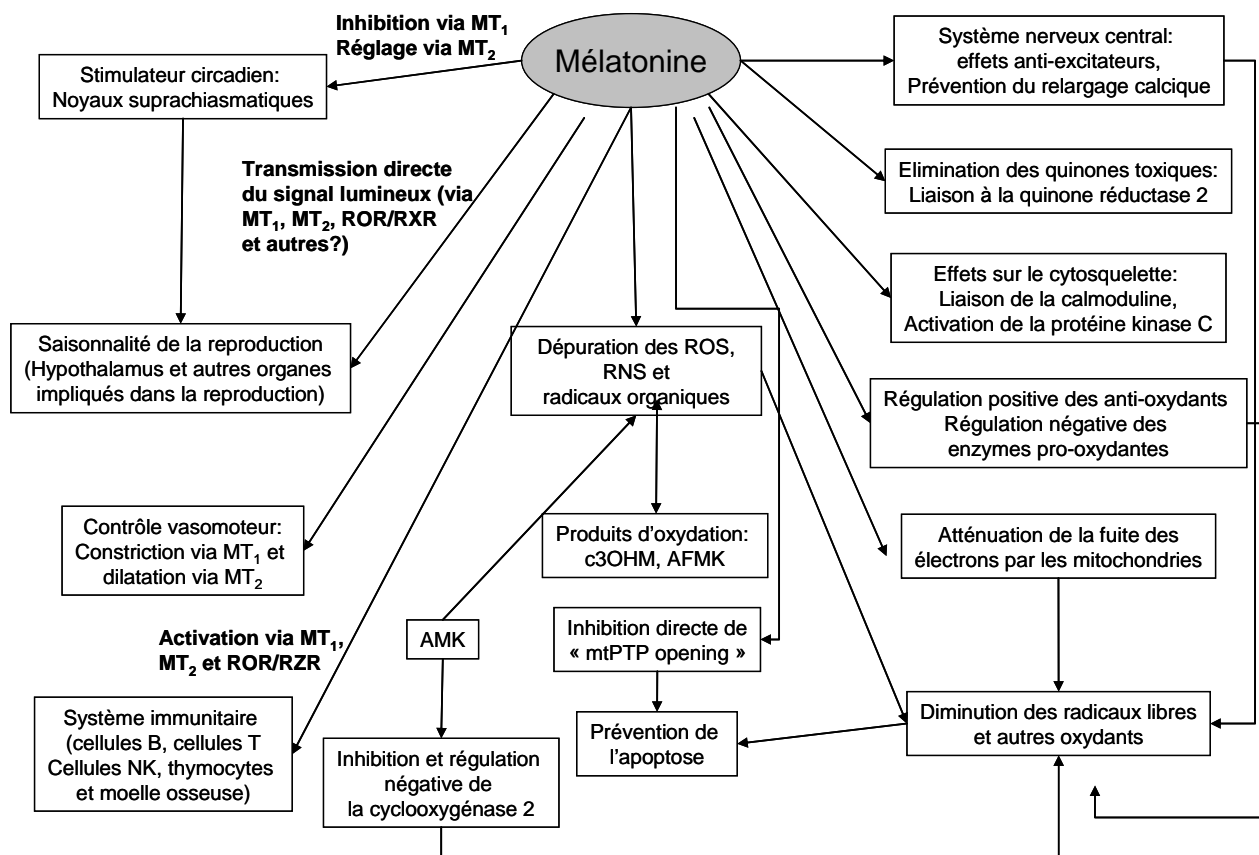
**ONOO<sup>-</sup>** : anion peroxy-nitrique, **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : superoxyde, **NO** : oxyde nitreux, **iNOS** : oxyde nitrique synthase inductible, **SOD** : superoxyde dismutase, **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène, **H<sub>2</sub>O** : monoxyde de dihydrogène, **OH<sup>-</sup>** : ion hydroxyde, **GSH-Px** : glutathione peroxydase, **CAT** : catalase, **NF- $\kappa$ B**, **AP-1** : facteurs de transcription, **TNF $\alpha$** , **IL-1 $\beta$**  : produits pro-inflammatoires, **NAD<sup>+</sup>** : nicotinamide adénine dinucléotide, **PARP** : poly-(ADP-ribose) polymérase. D'après Korkmaz et al., 2009

Depuis quelques années, il a été suggéré que la mélatonine aurait un rôle dans l'inhibition de la progression des cancers. La plupart des tumeurs se développent suite à une lésion irréversible de l'ADN. Les responsables de ces dégâts sont souvent les radicaux libres (Cerutti, 1994). Puisque la mélatonine neutralise les radicaux libres, elle pourrait par conséquent protéger l'ADN des dommages de ceux-ci (Assayed and Abd El-Aty, 2009; Karbownik and Reiter, 2000). En plus de ces propriétés protectrices, la mélatonine pourrait participer à la réparation de l'ADN endommagé (Sliwinski et al., 2007), mais aussi à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales et des métastases (Cos and Sanchez-Barcelo, 2000) et à l'augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses (Sainz et al., 2003). Ces actions anti-prolifératives, pro-apoptotiques et anti-métastases, permettent d'attribuer à la mélatonine des effets limitant l'initiation des tumeurs cellulaires et par conséquent la fréquence/survenue/apparition des cancers. Il faut tout de même rester prudent quant à cette activité oncostatique de la mélatonine, car d'une part, les mécanismes d'action sont encore mal compris et d'autre part, les doses utilisées pour observer ces effets sont supra-physiologiques.

#### 1.2.2.4.Effets sur la dépression

Des études ont mis en évidence des taux faibles de mélatonine chez les patients bipolaires ou atteints de dépression majeure (Srinivasan et al., 2006). Chez le rat, l'administration de mélatonine exogène améliorerait l'état des animaux suite à un stress chronique (Papp et al., 2003). L'agomélatine, agoniste des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> et antagoniste des récepteurs de la sérotonine 5HT<sub>2C</sub>, possède des propriétés anti-dépressives (Bertaina-Anglade et al., 2006; Lemoine et al., 2007). Les études cliniques sur des patients atteints de dépression majeure montrent que les syndromes de la dépression sont significativement diminués avec l'agomélatine en comparaison avec le placebo. Il semble que l'agomélatine soit aussi efficace que les autres traitements anti-dépresseurs, mais avec moins d'effets secondaires (Ghosh and Hellewell, 2007; Olie and Kasper, 2007).

D'autres formes de dépressions existent, dont les dépressions saisonnières. Celles-ci correspondent à des troubles de l'humeur qui apparaissent communément entre l'équinoxe d'automne et celui du printemps, accompagnés notamment de troubles du sommeil et de perte d'appétit. Initialement, ce type de dépression était traité par l'application d'une lumière vive, dont l'intensité est supérieure à 2500 lux, tôt le matin et en début d'après-midi. Il a été montré que l'application de lumière vive le matin garantissait de meilleurs résultats que celle appliquée l'après-midi. Les patients atteints de dépression saisonnière connaîtraient un



**Figure 19 : Actions majeures de la mélatonine.** AFMK: N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine, AMK: N<sup>1</sup>-acetyl-5-methoxykynuramine, c3OHM: 3-hydroxymélatonine cyclique, MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>: sous-type 1 et 2 des récepteurs membranaires de la mélatonine, mtPTP: pore mitochondriale de transition membranaire, ROR/RZR: récepteurs nucléaires de la super-famille des acides rétinoïques, ROS: Espèces réactives de l'oxygène, RNS: Espèces réactives du nitrogène. D'après Pandi-Perumal et al., 2006.

décalage de phase. Cette hypothèse de décalage de phase propose que, l'application de lumière vive les matins d'hiver induirait une avance de phase du rythme circadien (Lewy et al., 2006) réduisant ainsi les symptômes de la dépression. La mélatonine étant un signal physiologique de l'obscurité est utilisé comme marqueur de phase. Il semblerait qu'une majorité de patients atteints de dépression saisonnière présente une durée de sécrétion de mélatonine prolongée l'hiver (Wehr et al., 2001). L'utilisation matinale de la lumière peut réduire les symptômes dépressifs en inhibant la sécrétion de mélatonine et en synchronisant le rythme circadien et la lumière ambiante. Plusieurs causes de la dépression saisonnière sont admises : la diminution de l'exposition à la lumière pendant l'hiver, la diminution de la capacité à convertir la lumière en signal physiologique et la difficulté/vulnérabilité à réguler ses émotions (Pour revue: Workman and Nelson, 2010).

La mélatonine possède une myriade d'effets. Il n'est pas possible de les décrire tous dans ce manuscrit. Un schéma exhaustif des principaux rôles de celle est présenté (Figure 19).



## 2. Pharmacologie des récepteurs mélatoninergiques

Un des concepts de base de la pharmacologie se résume par l'adage de J.N. Langley (1852-1925) et de P. Ehrlich (1845-1915) : « *corpora non agunt nisi fixata* », c'est à dire « les substances n'agissent pas si elles ne sont pas fixées ». Cette citation met en avant la capacité de certaines molécules, les ligands, à se fixer spécifiquement sur une protéine partenaire, le récepteur, afin d'activer un système cellulaire. Une action pharmacologique déclenchée par un récepteur engendre une séquence de phénomènes cellulaires spécifiques.

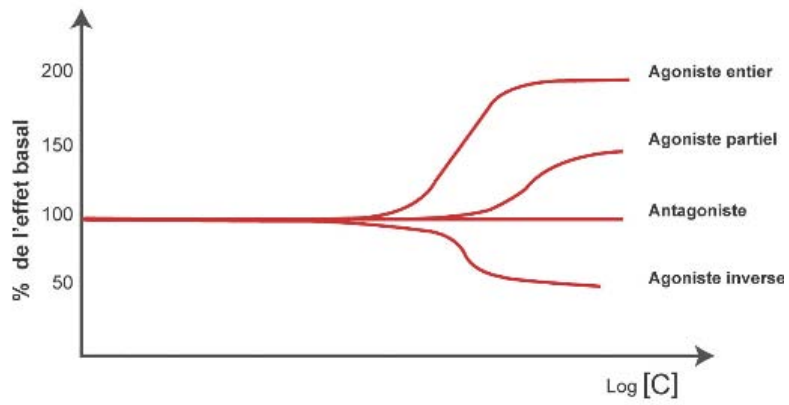
### 2.1. Ligands : Généralités

Un ligand est donc une molécule qui en se fixant sur un récepteur déclenche un effet. Les effets des ligands peuvent être mesurés par des paramètres qualitatifs (agonistes, antagonistes) et quantitatifs (affinité, spécificité, sélectivité).

#### 2.1.1. Paramètres qualitatifs

Une molécule capable de déclencher, par sa liaison aux récepteurs, une action biologique, est par définition un agoniste. Les produits capables de stimuler un récepteur de la même façon que l'agoniste de référence sont dits des **agonistes pleins**. Ceux qui ont un effet d'intensité moindre par rapport à l'agoniste de référence seront considérés comme des **agonistes partiels**. Le site de liaison d'un agoniste est généralement le même que celui du ligand endogène. Cependant, il existe des situations où l'agoniste ne se fixe pas sur le même site que le ligand endogène, on parle alors de sites allostériques (par exemple sur les récepteurs du glutamate (Pin and Acher, 2002)). Les agonistes pleins stabilisent la forme active du récepteur et par conséquent décalent au maximum l'équilibre vers l'état actif. Le même déséquilibre est produit par les agonistes partiels mais dans une moindre mesure.

Par opposition à un agoniste, un **antagoniste** est un ligand s'opposant à la liaison de l'agoniste endogène en se liant au même site de liaison (antagonisme compétitif réversible ou irréversible), ou en se liant à un site distinct du site de liaison de l'agoniste (antagonisme non compétitif réversible ou irréversible). La réponse à la liaison de l'antagoniste correspond à la diminution de la réponse au ligand endogène : l'antagoniste n'a pas d'effet par lui-même. Il ne possède donc pas d'activité intrinsèque, et ne fait que diminuer l'effet de l'agoniste endogène. Les antagonistes neutres ne modifient ni l'équilibre entre les formes active et



**Figure 20: Représentation schématique du comportement pharmacologique de différents ligands** : les agonistes (pleins ou partiels), les antagonistes et les agonistes inverses (pleins ou partiels).



inactive du récepteur, ni le niveau d'échange GDP/GTP de la sous-unité  $G\alpha$ . En revanche, ils bloquent les effets stimulateurs des agonistes et les effets inhibiteurs des agonistes inverses.

Les **agonistes inverses** sont des ligands qui possèdent une activité intrinsèque négative. Ces ligands révèlent l'activité constitutive d'un récepteur. Cette propriété sera développée dans le paragraphe suivant. Contrairement aux agonistes **pleins**, les **agonistes inverses pleins** stabilisent au maximum la forme inactive du récepteur et réduisent ainsi l'échange GDP/GTP de la sous-unité  $G\alpha$ . Les **agonistes inverses partiels** sont moins efficaces que les agonistes inverses **pleins**. En plus de réduire le taux d'échange du GTP/GDP, les agonistes inverses inhibent l'effet des agonistes. C'est pour cette raison que la majorité des agonistes inverses sont initialement décrits comme des antagonistes (Figure 20).

### 2.1.2. Paramètres quantitatifs

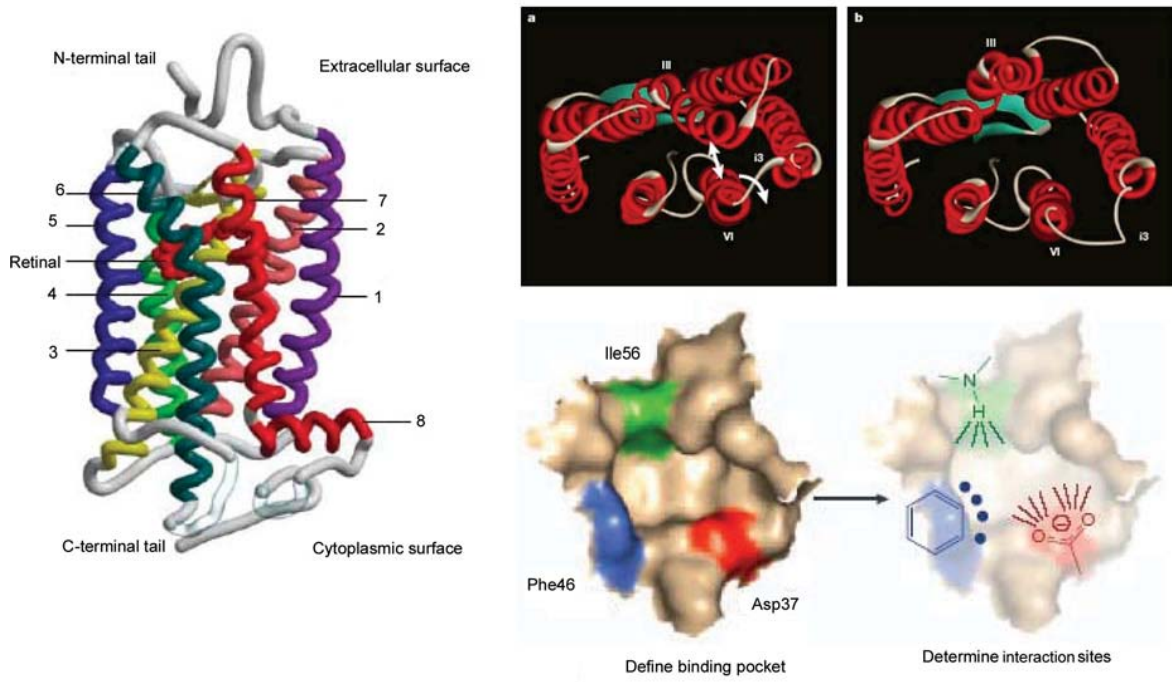
Les paramètres quantitatifs permettent d'évaluer l'affinité, la spécificité ou encore la sélectivité d'un ligand pour le récepteur d'intérêt.

L'**affinité** d'un ligand pour un récepteur correspond à la puissance de l'interaction physico-chimique entre les deux composés. Plus l'affinité est élevée, plus faible est la concentration d'agoniste nécessaire pour activer le récepteur, ou plus faible est la concentration d'antagoniste pour empêcher l'activation du récepteur par un agoniste.

Un ligand est **spécifique** quand il se lie uniquement à un seul type de récepteur. Le terme spécificité est souvent utilisé, à tort, à la place de sélectivité. La **sélectivité** est un terme relatif correspondant au rapport entre l'affinité du ligand pour le récepteur et celle pour d'autres cibles.

## 2.2. Les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques : Généralités

Les récepteurs à la mélatonine,  $MT_1$  et  $MT_2$ , appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG). La famille des RCPG comprend plusieurs milliers de membres, représentant ainsi 1% du génome. Les RCPG sont capables d'assurer la reconnaissance et la transduction de messages très variés, comme des acides aminés, des peptides, des protéines, des amines, des lipides, des nucléotides et nucléosides, des ions, des photons, des molécules gustatives ou odorantes et des phéromones (Pour revue: Foreman and Johanson, 2003). Pourtant, à ce jour, la plupart des RCPG sont des récepteurs orphelins, dont le ligand endogène n'a pas été encore identifié.



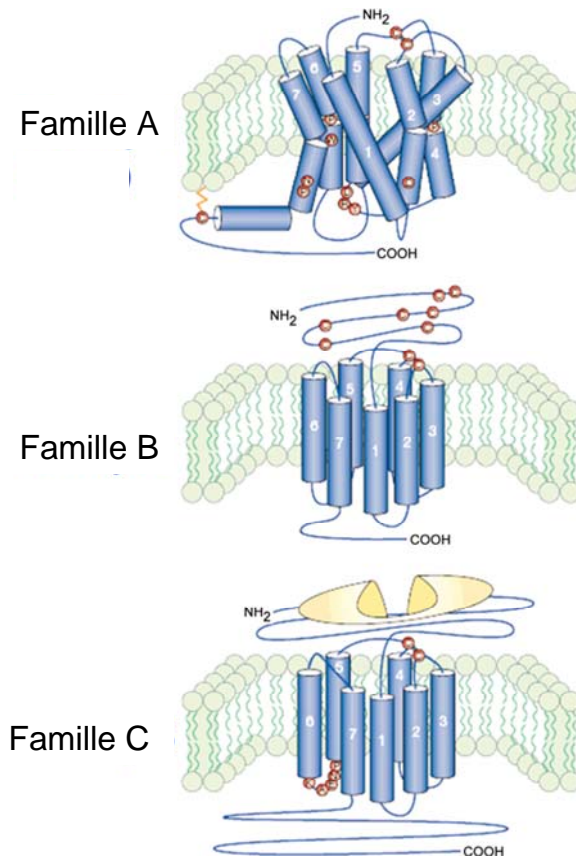
**Figure 21: Structure de la rhodopsine bovine avec son ligand lié, le rétinal.** La structure est présentée perpendiculairement et parallèlement au plan de la membrane. D'après Strosberg et al., 2007.

### 2.2.1. Structure des RCPG

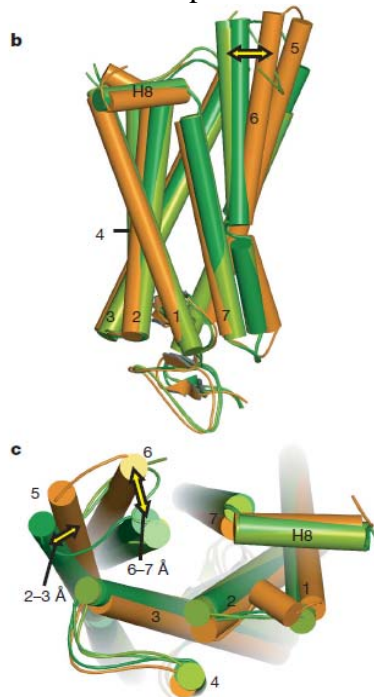
Les RCPG, de par leur structure, sont fortement ancrés dans la membrane plasmique, qui participe à la stabilisation de leur structure tridimensionnelle. C'est pour cette raison que leur purification et leur étude conformationnelle sont difficiles. Néanmoins, divers modèles structuraux (Schertler and Hargrave, 1995; Unger et al., 1997; Unger and Schertler, 1995), ainsi que quelques structures cristallographiques de RCPG disponibles à ce jour (la rhodopsine, le récepteur  $\beta$ 1-adrénérgique, le récepteur  $\beta$ 2-adrénérgique, le récepteur à l'adénosine A2A et le récepteur à l'histamine H1) ont permis de mettre en évidence une structure commune pour l'ensemble de cette famille de récepteurs (Cherezov et al., 2007; Jaakola et al., 2008; Li et al., 2004; Palczewski et al., 2000; Park et al., 2008; Rasmussen et al., 2007; Scheerer et al., 2008; Shimamura et al., 2011; Warne et al., 2008). Les RCPG sont des protéines monomériques qui comportent trois parties : 1) le domaine N-terminal extracellulaire, impliqué dans la liaison du ligand, 2) la partie transmembranaire avec ces sept hélices  $\alpha$  hydrophobes qui forment les sept domaines transmembranaires (TM). Ces domaines sont interconnectés par trois boucles extracellulaires intervenant dans la liaison du ligand et trois boucles intracellulaires impliquées dans le recrutement de protéines partenaires et l'activation de voies de signalisation, 3) le domaine C-terminal intracellulaire qui participe également au recrutement et à l'activation des voies de signalisation (Figure 21).

Plusieurs familles ont été établies en fonction des différences structurelles qui existent entre les RCPG: la famille A, la plus importante avec comme modèle la rhodopsine ; la famille B qui comprend la famille des récepteurs à la calcitonine/VIP/glucagon et, la famille C qui regroupe les récepteurs métabotropiques (glutamate) et les chémosenseurs. La famille A comprend la majorité des RCPG. Cette famille possède des résidus très conservés dans les domaines transmembranaires. Ballesteros et Weinstein ont établi une nomenclature des résidus de ces domaines transmembranaires. Le résidu le plus conservé au sein du RCPG de classe A dans chaque hélice transmembranaire reçoit le numéro 50 et tous les autres résidus de l'hélice transmembranaire sont numérotés relativement par rapport à ce résidu de référence. De plus, afin d'identifier l'hélice transmembranaire dans laquelle le résidu se situe, la numérotation du résidu est précédée par le numéro de l'hélice transmembranaire. Ainsi, la nomenclature 7.50 se réfère au résidu le plus conservé dans la septième hélice transmembranaire (Ballesteros and Weinstein, 1995).

Les domaines transmembranaires des RCPG de la famille A, aussi bien au niveau de la séquence en acides aminés qu'au niveau de la structure, sont fortement conservés au cours de



**Figure 22: Structure schématique d'un exemple de chaque récepteur des trois familles des récepteurs couplés aux protéins G.** Adapté de Strosberg A.D., 2007.



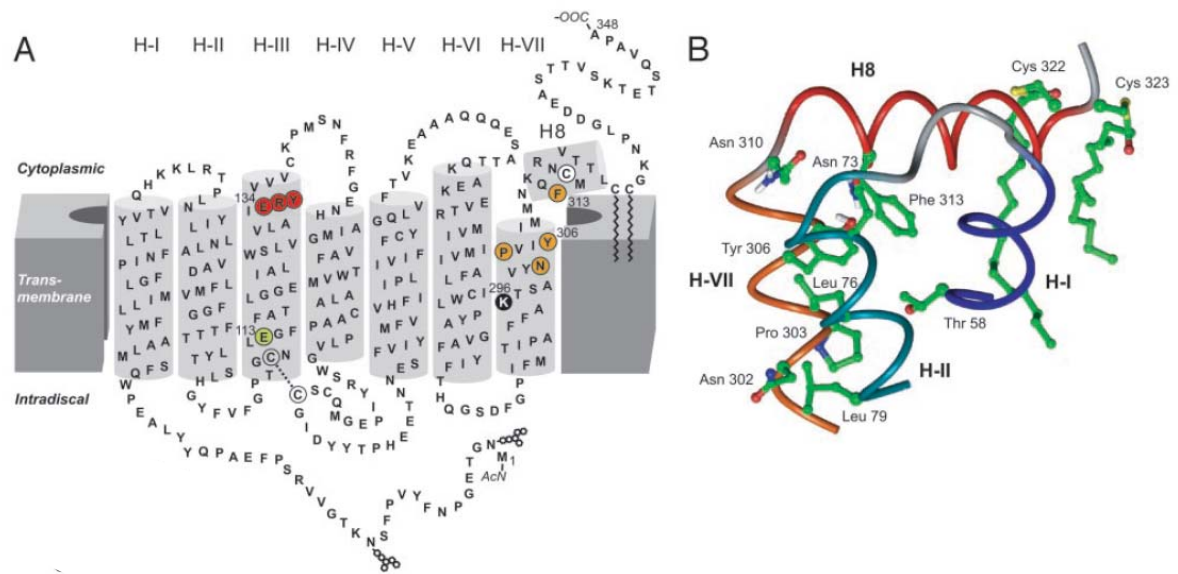
**Figure 23: Structure de l'opsine.** Les hélices sont représentées comme des bâtonnets et les boucles ont été estompées pour plus de clareté. b) vue de coté, c) vue du côté cytoplasmique. La double flèche jaune indique les différentes positions du segment cytoplasmique du domaine transmembranaire TM6, avec le tryptophane en position 265 (Trp 265) comme point de pivot du mouvement. D'après Park et al., 2008.

l'évolution. Des acides aminés font la signature de ce groupe. Le résidu le plus conservé serait un résidu arginine (R, 3.50) à l'extrémité intracellulaire du troisième domaine transmembranaire. Cette arginine fait partie du motif E/DRY/W impliqué dans la signalisation des protéines G. Deux cystéines conservées au cours de l'évolution forment un pont disulfure entre la première et la seconde boucle extracellulaire. De plus, des acides aminés hydrophobes tels que la proline (P), la phénylalanine (F), et l'asparagine (N) situés dans les domaines transmembranaires 6 et 7 semblent être importants pour l'activation du récepteur. Les récepteurs des familles B et C ne présentent pas de motifs particuliers. Les récepteurs de la famille B ont un domaine extracellulaire très structuré, capable de lier de grands peptides comme le glucagon. Les récepteurs de la famille C ont également un domaine extracellulaire très grand qui possède une similitude de séquence avec certaines protéines périplasmiques des bactéries Gram négatifs (Figure 22).

L'ensemble des RCPG possède une poche due au positionnement des sept hélices  $\alpha$ , initialement identifiée comme le site de liaison de l'agoniste. Cette cavité retrouvée dans les différentes familles de RCPG a connu au cours de l'évolution des modifications afin de reconnaître les ligands spécifiques. En fonction de la nature du ligand, le site de liaison ne serait pas exclusivement au niveau de la cavité. En effet, il a été montré que la liaison de certains peptides impliquait la partie N-terminale, les boucles extracellulaires ainsi que la partie supérieure des domaines transmembranaires (Trumpp-Kallmeyer et al., 1995). Initialement, il été envisagé que les antagonistes se liaient au même site que les agonistes, et qu'ils fonctionnaient en perturbant simplement la liaison de l'agoniste au récepteur. Les agonistes inverses, puisqu'ils possèdent la capacité de fonctionner en absence d'agoniste et d'inhiber l'activité intrinsèque du RCPG, peuvent posséder des sites de liaison propres, qui peuvent coïncider ou pas avec le site de liaison de l'agoniste.

### 2.2.2. Activation des RCPG

L'activation du RCPG fait suite au changement de conformation des domaines transmembranaires du récepteur suite à la liaison du ligand. Le TM 6 joue un rôle crucial lors de ce changement conformationnel. Un mouvement caractéristique de ce domaine a été mis en évidence pour la rhodopsine (Scheerer et al., 2008) et a été généralisé à l'ensemble des RCPG de la famille A (Figure 23). A l'état inactif, la rhodopsine est maintenue dans une conformation inactive grâce à un réseau d'interactions moléculaires. Deux motifs sont très importants pour contraindre les 7 hélices transmembranaires dans une conformation inactive : le motif E/DRY/W du TM 3 ainsi que le motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F du TM 7. A l'état inactif, les

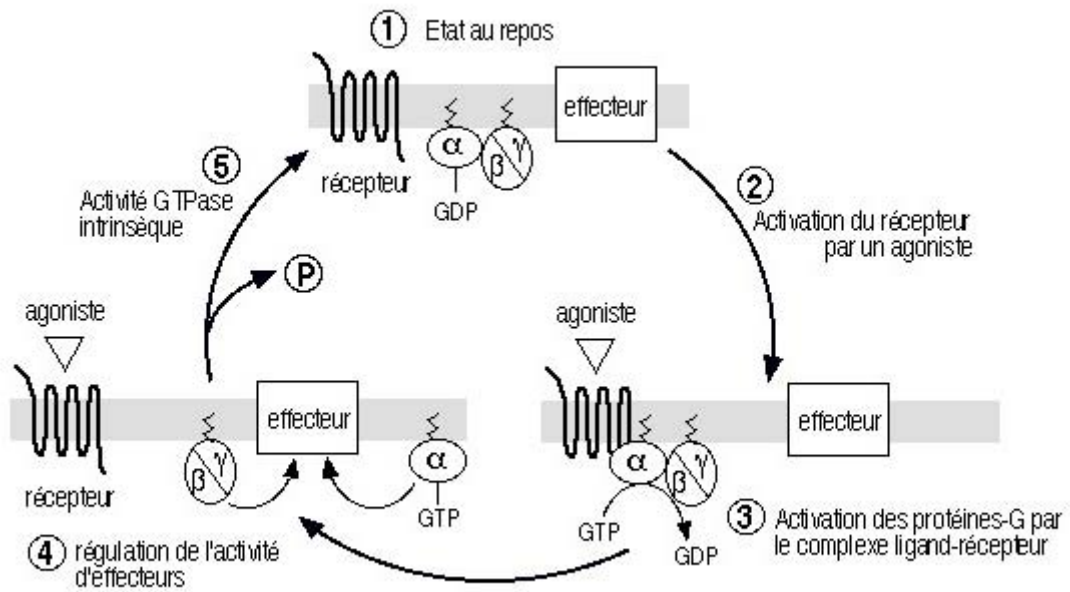


**Figure 24: Motifs D(E)RY et NPxxY(x)5,6F de la rhodopsine.** (A) Schéma de la structure secondaire de la rhodopsine bovine avec les motifs conservés D(E)RY (rouge) et NPxxY(x)5,6F (orange) dans l'hélice transmembranaire 3 (H-III) et 7 (H-VII), respectivement. Dans la structure cristalline, une hélice amphipatique est observée après l'hélice 7 (H-VII). Cette hélice (H8) est terminée par résidus cystéines palmitoylées (C322 et C323), permettant l'ancrage de l'hélice H8 à la membrane lipidique. (B) Schéma tridimensionnel de la région du motif NPxxY(x)5,6F et des hélices voisines (H-I, H-II et H8). D'après Fritze et al., 2003.

liaisons hydrogènes entre l'arginine du motif E/DRY/W, le glutamate du motif E/DRY/W et du TM 6 (E 6.30) forment un verrou ionique. Ces liaisons hydrogènes permettent de relier le TM 3 et le TM 6. Le motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F est impliqué dans deux types d'interaction à l'état inactif. La tyrosine du motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F forme une liaison avec la phénylalanine (F 7.60) de l'hélice 7. L'asparagine du motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F forme un réseau de liaisons hydrogènes avec l'alanine (A 7.46) et la sérine (S 7.45) du TM 7, l'asparagine (N 1.50) du TM 1 et l'asparagine (N 2.50) du TM 2 afin d'établir un réseau entre les TM 1, 2 et 7. L'activation de la rhodopsine par son ligand provoque un mouvement des TM 5 et 6 suite à un réarrangement des résidus impliqués dans le verrou ionique et interagissant avec le motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F. La rupture des liaisons hydrogènes du verrou ionique permet le déplacement de 6Å du TM 6 qui se rapproche du TM 5. Le pont di-sulfure formé entre le glutamate (E 6.50) du TM 6 et la lysine (K 5.65) du TM 5 permet de stabiliser l'interaction entre le TM 5 et le TM 6. L'arginine du motif E/DRY/W se lie alors à la tyrosine (Y 5.57) du TM 5 pour former la base de la cavité de la liaison de la protéine G. La rupture de la liaison entre la tyrosine du motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F et la phénylalanine (F 7.60) de l'hélice 7 provoque un retournement de la tyrosine ainsi libérée qui se place alors sous l'arginine du motif E/DRY/W ce qui permet de maintenir le TM 6 à l'extérieur de la cavité de liaison de la protéine G. La fente ainsi créée suite à l'ensemble de ces réarrangements permet le couplage de la protéine G au RCPG activé. Les résidus arginine du motif E/DRY/W et tyrosine du motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F ont également été décrits comme étant importants pour l'interaction protéine G/ RCPG, l'arginine formant une liaison hydrogène avec le résidu de la partie C-terminale de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G (Hofmann et al., 2009) (Figure 24).

### 2.2.3. Couplage aux protéines G

La transduction du signal passe donc par l'activation des protéines G couplées au récepteur activé. Les protéines G hétérotrimériques sont constituées d'une sous-unité  $\alpha$  et d'un dimère  $\beta$ - $\gamma$ . Il existe 17 types de G $\alpha$ , 5 de G $\beta$  et 12 de G $\gamma$ . Potentiellement il existe donc un grand nombre de combinaisons, cependant toutes ne sont pas possibles. Quatre grandes familles de protéines G sont proposées sur la base d'homologies entre les séquences protéiques des sous-unités  $\alpha$  : G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> et G<sub>12</sub>. En absence de ligand sur le récepteur, la protéine G est sous forme inactive, c'est à dire que la sous-unité  $\alpha$  est liée au GDP (guanine nucleotide diphosphate) et qu'ils forment avec le dimère  $\beta$ - $\gamma$  un trimère. Une fois le ligand fixé au récepteur, la sous-unité  $\alpha$  s'active en échangeant le GDP avec un GTP (guanine nucleotide tri-



**Figure 25 : Représentation schématique de l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G hétérotrimériques : dissociation des protéines G.  $\alpha$  : sous-unité  $\alpha$ ,  $\beta\gamma$  : dimère des sous-unités  $\beta\gamma$ , GDP : guanosine diphosphate, GTP : guanosine triphosphate. D'après site internet rcpg.chez.com.**



phosphate). Ce processus d'échange diminue l'affinité des sous-unités entre elles et aboutit à la dissociation de la protéine G en deux modules, d'une part la sous-unité  $\alpha$  et d'autre part, le dimère  $\beta$ - $\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  interagit avec les différents effecteurs des voies de signalisation impliquées dans la réponse pharmacologique. Il est désormais admis que le dimère  $\beta$ - $\gamma$  pouvait également être impliqué dans la signalisation (Clapham and Neer, 1993). La sous-unité  $\alpha$  possède une activité GTPase (hydrolyse du GTP en GDP) qui permet de limiter la demi-vie du module  $G\alpha$ -GTP. Une fois le GTP hydrolysé en GDP la protéine G reforme alors un complexe hétérotrimérique inactif (Figure 25).

#### 2.2.4. Activité constitutive des récepteurs couplés aux protéines G

Un équilibre dynamique existe entre les formes active et inactive des RCPG (Kenakin, 1996). La forme inactive des RCPG n'est pas couplée à la protéine G hétérotrimérique, alors que l'état actif est couplé et active celle-ci. Dans le cas d'un récepteur dit constitutivement actif, cet équilibre est décalé vers l'état actif. L'activité constitutive d'un récepteur correspond à la capacité de celui-ci à adopter la conformation active et d'engager des voies de signalisation en absence d'agoniste. Par conséquent, le niveau basal d'activité des protéines G associées est augmenté. Ce phénomène d'activité constitutive a été mis en évidence pour la première fois pour les récepteurs aux opiacés de type  $\delta$  (Koski et al., 1982) et pour les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques (Cerione et al., 1984). Depuis, de nombreux exemples de RCPG ayant une activité constitutive ont été publiés.

Les mutations touchant les RCPG ont été largement étudiées car elles peuvent être la cause de maladies génétiques. Certains sites de mutations, comme l'aspartate du motif E/DRY/W, sont connus pour induire l'activité constitutive des RCPG, tels que par exemple les récepteurs H2 à l'histamine (Alewijns et al., 2000), les récepteurs mu opioïdes (Li et al., 2001) ou encore les récepteur  $\beta$ 1 adrénergiques (Scheer et al., 1996). Ce phénomène d'activité constitutive a été largement décrit *in vitro*, dans des systèmes sur-exprimant les RCPG. Une sur-expression des RCPG, même faiblement constitutivement actifs, augmente la proportion des RCPG à l'état actif et les rend capables d'activer les protéines G et les effecteurs associés. Par exemple, dans un modèle de souris transgénique sur-exprimant le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, l'accumulation de ces récepteurs a permis d'identifier des agonistes inverses (Bond et al., 1995). Par ailleurs, une augmentation du niveau d'expression des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> induit une augmentation significative de l'activité constitutive de ce récepteur (Newman-Tancredi et al., 2000). Un fort niveau expression des RCPG facilite donc la détection de leur activité constitutive (Bond et al., 1995; Milano et al., 1994; Nagaraja et al.,



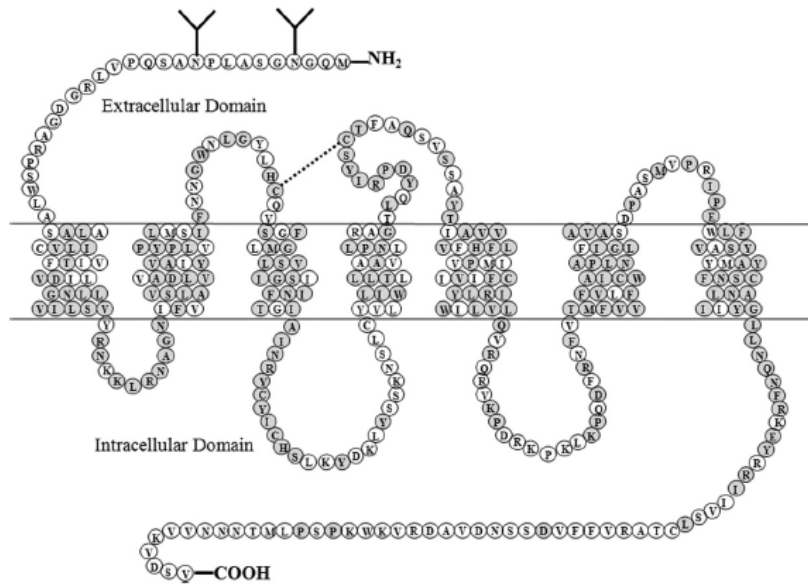
1999). En revanche, une forte expression du RCPG n'induit pas automatiquement un niveau d'activité constitutive important. Les niveaux d'expression des RCPG dans les systèmes de sur-expression sont largement supérieurs à ceux des RCPG exprimés dans des conditions physiologiques. La question de l'importance physiologique de l'activité constitutive peut alors se poser. Les études dans des conditions natives sont nécessaires pour analyser l'importance de l'activité constitutive *in vivo*. En effet, les systèmes natifs réunissent les conditions physiologiques, ainsi bien en termes de la stœchiométrie entre les RCPG et les protéines G, qu'en termes de niveaux d'expression des RCPG. Pour exemple, l'activité constitutive a été observée pour de nombreux RCPG, comme les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques exprimés dans du tissu cardiaque (Varma et al., 1999), les récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1D}$ -adrénergiques exprimés dans l'aorte de rat (Noguera et al., 1996), les récepteurs à la sérotonine 5-HT<sub>1B</sub> exprimés dans le gyrus denté de cobaye (Roberts et al., 2000) et les récepteurs histaminiques H3 exprimés dans l'hypothalamus de rat (Wieland et al., 2001). L'activité constitutive *in vivo* est à considérer comme un phénomène physiologique permettant de contrôler l'état d'activité des cellules. Berg et ses collaborateurs considèrent l'activité constitutive des récepteurs 5-HT<sub>2C</sub> *in vivo* comme un moyen de contrôler l'excitabilité des neurones dopaminergiques au niveau du cerveau (Berg et al., 2005).

### 2.3. Les récepteurs mélatoninergiques

Des sites centraux de liaison de la mélatonine ont été décrits dans un premier temps chez le bovin (Cardinali et al., 1979) suite à des autoradiographies avec la [<sup>3</sup>H]-MLT. D'autres expériences ont mis en évidence des sites de liaison de la mélatonine au niveau d'organes périphériques chez le rat (Cohen et al., 1978). Les études pharmacologiques ainsi que le clonage des récepteurs mélatoninergiques ont permis la caractérisation fonctionnelle de ces derniers.

#### 2.3.1. Classification des récepteurs mélatoninergiques

Initialement, les récepteurs mélatoninergiques étaient divisés en deux classes, ML<sub>1</sub> et ML<sub>2</sub>, sur la base des différences d'affinité et de cinétique de liaison avec le radioligand de référence, la 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-mélatonine (2-[<sup>125</sup>I]-MLT), ainsi que des différences au niveau des profils pharmacologiques de ligands synthétiques (la 2-iodo-mélatonine, la N-acétyl-sérotonine et la mélatonine). ML<sub>1</sub> présente une affinité pour la 2-[<sup>125</sup>I]-MLT, de l'ordre du



**Figure 26: Structure protéique schématisée du récepteur hMT<sub>1</sub>.** Les cercles gris correspondent aux acides aminés communs aux récepteurs hMT<sub>1</sub> et hMT<sub>2</sub>. D'après Reppert and Weaver (1995).

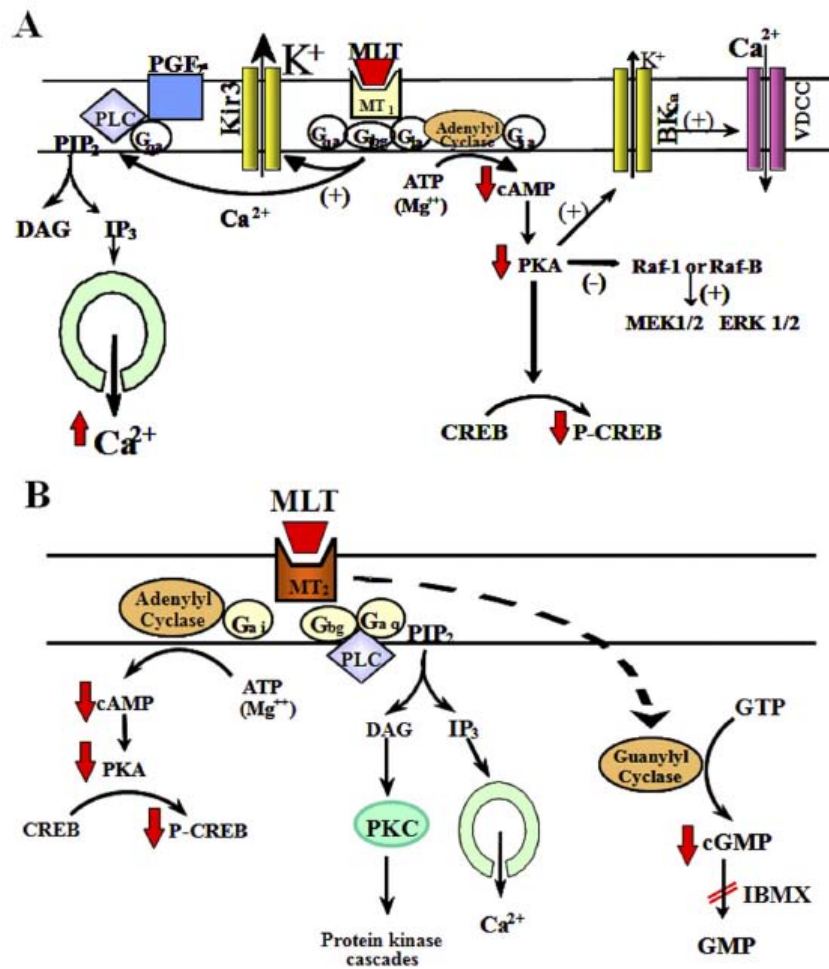
picomolaire, alors que  $ML_2$  lie le radioligand avec une affinité moindre, de l'ordre du nanomolaire.

Chez les mammifères, le site de liaison à faible affinité, initialement identifié comme  $ML_2$  a été pharmacologiquement caractérisé et renommé  $MT_3$  (Molinari et al., 1996; Nosjean et al., 2001; Pickering and Niles, 1990). La mélatonine et un de ses précurseurs, la N-acétylsérotinine, entrent en compétition lors de la liaison de la 2- $[^{125}I]$ -MLT sur le site de liaison  $MT_3$ , avec un profil pharmacologique distinct de celui des récepteurs couplés aux protéines G,  $MT_1$  et  $MT_2$  (Mailliet et al., 2005; Nosjean et al., 2001; Paul et al., 1999). Le site de liaison  $MT_3$  a été purifié à partir de tissu rénal de hamster et identifié comme étant une enzyme, la quinone réductase II (QR2) (Nosjean et al., 2000). Cette protéine QR2 présente un profil de liaison de la 2- $[^{125}I]$ -MLT identique au profil de liaison de  $MT_3$  dans le cerveau de hamster (Nosjean et al., 2000). Historiquement, l'enzyme QR2 a été considérée comme une enzyme de détoxification, par analogie avec l'enzyme QR1. Pour le moment, il n'a pas été clairement démontré que l'enzyme QR2 possède ces propriétés de détoxification (Vella et al., 2005).

En 1994, le premier véritable récepteur mélatoninergique ( $Mel1c$ ) a été cloné à partir des mélanophores de xénope (*Xenopus laevis*) (Ebisawa et al., 1994). Cette découverte a permis de révéler différents sous-types de récepteurs avec une pharmacologie apparentée à la classe  $ML_1$  :  $Mel_{1a}$ , actuellement  $MT_1$ ;  $Mel_{1b}$ , correspondant à  $MT_2$  et  $Mel_{1c}$ , retrouvé chez les oiseaux, les poissons et le xénope mais pas chez les mammifères. Il s'agit dans tous les cas de RCPG. Une étude phylogénétique a démontré que le récepteur orphelin GPR50 des mammifères est un récepteur orthologue de  $Mel_{1c}$  (Dufourny et al., 2008a). Ce récepteur GPR50 est apparenté à la famille des récepteurs à la mélatonine, malgré la perte de la capacité de liaison de la mélatonine (Levoye et al., 2006a). Le récepteur GPR50 présente une distribution dans de nombreux tissus neuro-endocriniens comme l'hypothalamus dorso-médian, l'hypothalamus latéral, le noyau arqué ou encore la couche de cellules épendymaires bordant le troisième ventricule. Cette expression semble être conservée dans plusieurs espèces (mouton, souris, rat et hamster) suggérant une fonction biologique pour ce récepteur (Drew et al., 2001; Sidibe et al., 2010).

### 2.3.2. Structure protéique des récepteurs à la mélatonine

La région codante des récepteurs  $MT_1$  et  $MT_2$  est composée de deux exons séparés par un intron d'environ 10 kB. L'exon 1 code pour la partie N-terminale et jusqu'à la première boucle intracellulaire du récepteur. L'exon 2 lui code pour le reste de la protéine (Reppert et al., 1995; Reppert et al., 1994). Les récepteurs  $MT_1$  et  $MT_2$  présentent une forte identité de



**Figure 27 : Voies de signalisation des récepteurs mélatoninergiques MT<sub>1</sub> (A) et MT<sub>2</sub> (B).** cAMP : adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate, BK<sub>Ca</sub> : canal potassique activé par le calcium, Ca<sup>2+</sup> : ion calcium, CREB : protéine se liant à l'élément de réponse liant l'AMPc, DAG : diacylglycérol, ER : réticulum endoplasmique, FP : récepteur de la prostaglandine F<sub>2α</sub>, G<sub>ai</sub>, G<sub>βγ</sub> et G<sub>aq</sub> : sous-unités des protéines Gi et Gq, GMP : guanosine monophosphate, GTP : guanosine triphosphate, IBMX : isobutykmethylxantine, IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate, MLT : mélatonine, MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> : sous-types 1 et 2 des récepteurs membranaires de la mélatonine, P-CREB : forme phosphorylée de CREB, PGF<sub>2α</sub> : Prostaglandine F<sub>2α</sub>, PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol 4,5-diphosphate, PKA : protéine kinase A, PLC : phospholipase C, VDCC : canal calcique voltage-dépendant. D'après Masana et Dubocovich (2001).

séquence en acides aminés : 55% pour l'ensemble de la séquence et 70% pour uniquement les domaines transmembranaires (Reppert et al., 1995). Les récepteurs possèdent environ 300 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 40 kDa.

Comme mentionné précédemment, les récepteurs MT sont apparentés à la famille A des RCPG (Figure 26). Vingt à vingt-cinq acides aminés très conservés représentent la signature de cette classe de RCPG. Le haut degré de conservation de cette séquence d'acides aminés suggère qu'ils joueraient un rôle important dans la conservation de l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle de ces récepteurs. Parmi ces acides aminés, l'aspartate du TM 2 et trois résidus hydrophobes des TM 6 et TM 7 (proline, phénylalanine, asparagine) seraient importants pour l'activation des récepteurs ainsi que l'arginine du motif DRY (Asp-Arg-Tyr) entre le passage du TM 3 et la seconde boucle intracellulaire. Deux cystéines sur les deux premières boucles extracellulaires engagées dans un pont disulfure et un site possible de palmitoylation après la courte hélice 8 située directement à la sortie du TM 7 sont également très conservés au cours de l'évolution. Ce site de modification post-traductionnelle représente un possible point d'ancrage à la membrane plasmique pouvant former une quatrième boucle intracellulaire. Kokkola et ses collaborateurs (Kokkola et al., 2005) montrent par mutagenèse dirigée que ces cystéines sont nécessaires à l'activation des protéines G ainsi que des voies de signalisation. Le site de liaison des ligands implique principalement les domaines transmembranaires ainsi que les boucles extracellulaires (Hibert et al., 1991; Kristiansen, 2004). Le motif E/DRY/W, et plus particulièrement le résidu aspartate, semble important dans le couplage aux protéines G. Seul le récepteur MT<sub>2</sub> ovin possède un motif DRY. Les récepteurs MT<sub>2</sub> des autres espèces qui possèdent un motif NRY, où l'asparagine est remplacée par l'acide aspartique. Ce motif participerait à l'état inactivé des RCPG (Coge et al., 2009). L'extrémité N-terminale du récepteur MT<sub>1</sub> présente deux sites de glycosylation potentielle sur des résidus asparagine (Asn), alors que celle du récepteur MT<sub>2</sub> n'en possède qu'un seul. L'extrémité C-terminale des deux récepteurs contient un site pour la caséine kinase 1 $\alpha$ , la caséine kinase II et la protéine kinase C (PKC). Ce site participerait à l'ancrage membranaire et à la mise en place des voies de signalisation des récepteurs MT.

### 2.3.3. Voies de signalisation

La MLT active différentes cascades moléculaires en fonction du contexte cellulaire. La voie de signalisation principalement décrite pour les récepteurs MT est la voie dite « AMPc ». Des voies de signalisation secondaires sont également décrites (Figure 27).

	Liaison de 2-[125I]-iodo-MLT (cellules COS-7)			Test de liaison Stimulation GTPγS			Accumulation AMPc		
	hMT1 (pKi)	hMT2 (pKi)	Ratio Ki (MT1/MT2)	hMT1 (pEC50)	hMT2 (pEC50)	Ratio pEC50 (MT1/MT2)	hMT1 (pEC50)	hMT2 (pEC50)	Ratio pEC50 (MT1/MT2)
2-Iodomélatonine	10.2	9.7	0.3	9.7	9.8	1.1	11	10.1	0.1
S 20088	9.1	10.2	14	8.8	10	16	9.4	10.3	7.9
Mélatonine	9.1	9.8	4.9	8.6	9.8	4.5	9.5	9.7	1.6
GR196429	8.6	9.3	4.7	8.3	9.3	9.6	8	9.0	12.6
6-chloromélatonine	7.9	9.7	5.7	8.3	9.3	9.6	8.1	9.8	50
6-hydroxymélatonine	9.4	8.3	7.3				7.2	7.4	0.6
5-méthoxyluzindole	7.5	9.6	130				N.D	N.D	
8M-PDOT	7.2	8.5	20				N.D	N.D	
N-acétylsérotonine	6.7	6.7	1.2				5.7	6.6	7.9
5-MCA-NAT	5.6	6.6	10				N.D	N.D	
Ilk7	8.4	10.3	90				8.7	10.3	44

**Figure 28 : Profils pharmacologique de ligands avec des efficacités agonistes/agonistes partiels sur les récepteurs hMT1 et hMT2. N.D.: non déterminé. D'après Dubocovich et al., 2009.**



### 2.3.3.1. Voies de signalisation des récepteurs MT<sub>1</sub>

Le couplage des récepteurs MT<sub>1</sub> peut se faire avec des protéines hétérotrimériques inhibitrices G<sub>i</sub>, sensibles à la toxine pertussique (PTX), inhibiteur spécifique, et avec des protéines G<sub>q/11</sub>, insensibles à la PTX. Lors de la liaison de la mélatonine sur son récepteur de type 1, une protéine G<sub>i</sub> s'active pour inhiber l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et ainsi diminuer la production d'AMPc à partir de l'ATP. L'activité de la protéine kinase A (PKA) et la phosphorylation de la protéine CREB (cAMP-response element-binding) sont par conséquent inhibées (Masana and Dubocovich, 2001; Witt-Enderby et al., 2003). En parallèle de la voie AMPc, les récepteurs MT<sub>1</sub> peuvent directement activer la voie de la phospholipase C (PLC), ou indirectement via la sous-unité βγ de la protéine G. L'activation des récepteurs MT<sub>1</sub> peut réguler également certains canaux ioniques. Dans des cellules de *pars tuberalis* ovine, l'activation des récepteurs MT<sub>1</sub> entraîne l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Ca<sup>2+</sup>) via les protéines G insensibles à la PTX. (ref). En revanche, dans des cellules d'hypophyse de rat néonatal et dans les cellules AtT20 exprimant de façon stable les récepteurs MT<sub>1</sub>, la mélatonine agit via les protéines G sensibles à la PTX et inhibe le flux calcique. Les récepteurs MT<sub>1</sub> peuvent également se coupler aux canaux potassiques activés par le calcium (BK<sub>Ca2+</sub>) ainsi qu'aux canaux potassiques rectifiant entrant activés par les protéines G (GIRK Kir3). L'activation de ce récepteur peut également moduler la formation de l'acide arachidonique, stimuler l'activité de la kinase c-Jun N-terminale et moduler l'activité des MAP kinases (Pour revue: Masana and Dubocovich, 2001; Witt-Enderby et al., 2003).

### 2.3.3.2. Voies de signalisation des récepteurs MT<sub>2</sub>

Les récepteurs MT<sub>2</sub> sont également couplés à l'inhibition de la formation de l'AMPc. De plus, l'activation de ce sous-type de récepteur induit l'inhibition de la formation d'un nucléotide, le guanoside monophosphate cyclique (GMPc) (Schuster, 2007). Dans les NSC, la mélatonine en se liant aux récepteurs MT<sub>2</sub> active la protéine kinase C (PKC), une réponse qui est abolie suite à l'administration du 4-phényl-2-propionamidotétraline (4-P-PDOT). Ces résultats suggèrent que les récepteurs MT<sub>2</sub> sont couplés à la voie de signalisation de l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). En effet, la liaison de la mélatonine sur MT<sub>2</sub> induit l'activation d'une protéine G<sub>q</sub> qui active la phospholipase C (PLC). Celle-ci produit à partir d'un lipide transmembranaire, le phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP<sub>2</sub>), le diacyl glycérol (DAG) et le second messager, l'IP<sub>3</sub>. L'IP<sub>3</sub> possède des récepteurs exprimés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, ainsi il module le relargage intracellulaire du Ca<sup>2+</sup>.



#### 2.3.4. Pharmacologie des récepteurs mélatoninergiques

De nombreuses molécules pharmacologiques ont été développées pour mimer spécifiquement les effets de la mélatonine. Le paragraphe suivant présente plusieurs de ces molécules bien connues pour leur sélectivité sur les récepteurs MT (Figure 28).

Les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> présentent une affinité de l'ordre du picomolaire pour le radioligand de référence, 2-[<sup>125</sup>I]-iodomélatonine. Les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>, exprimés de façon transitoire dans la lignée cellulaire COS-7 (Dubocovich et al., 1997) ou de façon stable dans les lignées cellulaires CHO (Nonno et al., 1999) et NIH-3T3 (Browning et al., 2000), sont caractérisés par le classement suivant des affinités : 2-iodomélatonine ≥ mélatonine >> N-acétylsérotinine >> sérotinine. Par ailleurs, le récepteur MT<sub>1</sub> se distingue du récepteur MT<sub>2</sub> par une plus forte affinité pour la 2-iodomélatonine et le ramelteon que pour la mélatonine et une très faible affinité pour la 6-chloromélatonine. Le récepteur MT<sub>2</sub> est caractérisé par des affinités similaires pour la 2-iodomélatonine, le ramelteon, la mélatonine et la 6-chloromélatonine (Browning et al., 2000; Dubocovich et al., 1997; Kato et al., 2005). Les ligands présentant une meilleure affinité pour MT<sub>2</sub> que pour MT<sub>1</sub> sont les suivants : le luzindole (2-benzyl N-acetyl-tryptamine) (15 à 25 fois plus forte), GR128107 (113 fois) (Dubocovich et al., 1997), IIK7 (90 fois) (Sugden et al., 1999b), K185 (140 fois) (Sugden et al., 1999b) et un analogue du luzindole, le DH97 (90 fois) (Behrens et al., 2000). Le 4P-PDOT (4-phenyl-acetamidotetraline) est un ligand sélectif du MT<sub>2</sub>. Cependant, le ratio d'affinité MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> (300/22000) varie en fonction du niveau d'expression des récepteurs ou des voies de signalisation présentes (Dubocovich et al., 1997; Dubocovich et al., 1998; Nonno et al., 1999). De nombreux ligands mélatoninergiques sont des antagonistes compétitifs avec un degré de sélectivité variable. Le luzindole, premier antagoniste compétitif découvert, montre une meilleure affinité pour MT<sub>2</sub> que pour MT<sub>1</sub>. Les ligands spécifiques et sélectifs de MT<sub>2</sub>, 4P-PDOT ainsi que ses dérivés, 4P-ADOT (4-phenyl-2-acetamidotetraline) et 4P-CADOT (4-phenyl-2-chloro-acetamidotetraline), sont des antagonistes compétitifs dans des tissus natifs, où le niveau d'expression des récepteurs est faible. En revanche, le 4P-PDOT et le luzindole se comportent comme des agonistes ou des agonistes partiels dans des systèmes recombinants. Le 4P-PDOT présente également une forte affinité pour l'hétérodimère MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> (Ayoub et al., 2004). Le HEAT (5-hydroxyethoxy-N-acetyltryptamine), un ligand non-sélectif MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>, montre des efficacités différentes en agissant comme un agoniste plein pour MT<sub>1</sub> et comme un antagoniste de MT<sub>2</sub> (Nonno et al., 2000). IIK7 est un agoniste sélectif de MT<sub>2</sub>, qui inhibe la formation d'AMPC induite par la forskoline, quand les



récepteurs sont exprimés dans la lignée NIH-3T3 (Sugden et al., 1999b). L'ensemble de ces études indique que les effets pharmacologiques du luzindole et du 4P-PDOT sont complexes, aussi bien en tissus natifs qu'en systèmes recombinants.

Les récepteurs MT<sub>1</sub> recombinants présentent une activité constitutive, produisant une régulation spontanée des effecteurs en absence de ligand (Roka et al., 1999). Comme indiqué précédemment, les agonistes inverses stabilisent les formes libres du récepteur et réduisent ainsi l'activité du récepteur indépendante du ligand. De ce fait, le luzindole et le 4P-PDOT peuvent être considérés comme des agonistes inverses de MT<sub>1</sub> (Ersahin et al., 2002; Roka et al., 1999). Le comportement agoniste inverse du luzindole et du 4P-PDOT est remis en cause dans plusieurs travaux (Devavry et al., 2011; Nonno et al., 1999). Dans la lignée CHO exprimant une forte concentration de récepteurs hMT<sub>1</sub>, ces molécules présenteraient une plus grande affinité pour MT<sub>1</sub> en présence plutôt qu'en absence de GTP. De plus, le luzindole et le 4P-PDOT diminueraient la liaison basale du [<sup>35</sup>S]-GTPγS et augmenteraient la formation d'AMPc (Browning et al., 2000).

#### 2.3.5. Distributions centrale et périphérique

Les récepteurs MT humains ont été localisés dans le cerveau et dans les tissus périphériques par différentes techniques comme l'autoradiographie à la 2-[<sup>125</sup>I]-MLT, la technique de RT-PCR, ainsi que par immunohistochimie. Chez les oiseaux et les vertébrés inférieurs, les récepteurs MT sont largement répartis dans le système nerveux central. Chez les mammifères, ces récepteurs sont plus localement distribués. La *pars tuberalis*, subdivision du lobe antérieur de l'hypophyse, possède un niveau d'expression des récepteurs MT très élevé (Vanecek and Kosar, 1994). Les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> sont retrouvés dans la rétine, l'hypothalamus, notamment au niveau des NSC et de l'HPM, mais dans l'hippocampe et le cervelet. Les récepteurs MT<sub>1</sub> sont retrouvés également dans le thalamus, la cornée et le cortex cérébral (Alarma-Estrany and Pintor, 2007; Dubocovich et al., 2003; Migaud et al., 2005; Wu et al., 2006) (Pour revue: Zawilska et al., 2009).

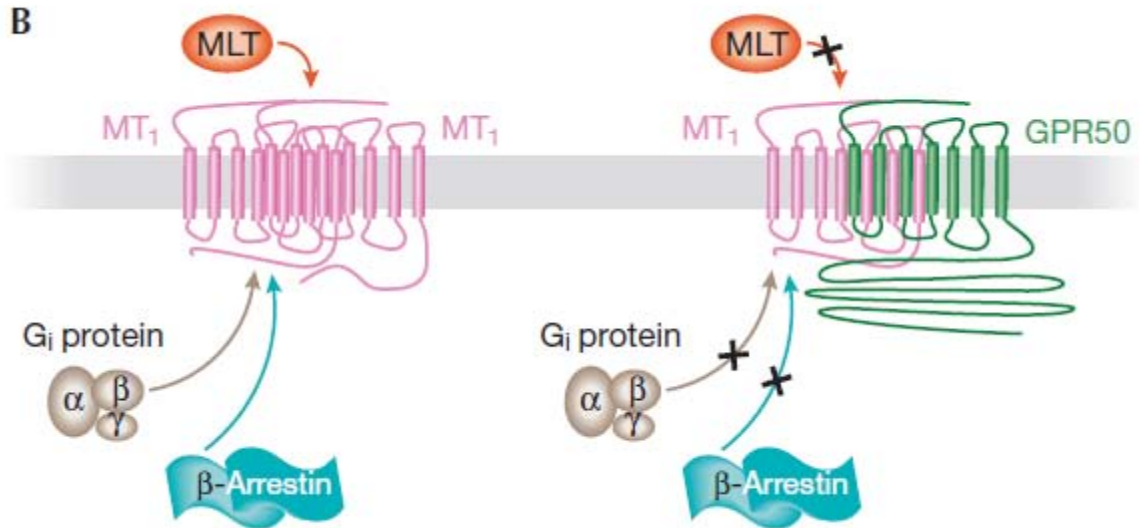
Des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> ont aussi été localisés dans des tissus périphériques, tels que le cœur et les artères (Viswanathan et al., 1990), le poumon (Drew et al., 2001; Naji et al., 2004; Paul et al., 1999), le foie (Naji et al., 2004; Paul et al., 1999; Sallinen et al., 2005) et la peau (Drew 2001). Le récepteur MT<sub>1</sub> est retrouvé au niveau des glandes surrénales (Drew et al., 2001), des reins (Drew et al., 2001; Naji et al., 2004; Paul et al., 1999) et des lymphocytes T



et B (Carrillo-Vico et al., 2004). Le récepteur MT<sub>2</sub> est également détecté au niveau des intestins (Drew et al., 2001; Paul et al., 1999; Sallinen et al., 2005; Vanecek, 1988a).

### 2.3.6. Implication physiologique des récepteurs à la mélatonine

Même si les récepteurs à la mélatonine sont bien connus, la fonction propre du récepteur MT<sub>1</sub> versus celle du récepteur MT<sub>2</sub> n'est pas bien établie. Chez des nombreuses espèces, incluant l'homme, les ARNm codant pour les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> et les récepteurs eux-même sont exprimés dans les artères périphériques et cérébrales (Masana et al., 2002; Viswanathan et al., 1990). Au niveau de l'artère caudale du rat, importante pour le mécanisme de thermorégulation, l'activation du récepteur MT<sub>1</sub> induit une vasoconstriction alors que celle du récepteur MT<sub>2</sub> entraîne une vasodilatation (Geary et al., 1997; Masana et al., 2002; Viswanathan et al., 1997). L'action de la mélatonine passerait par l'inhibition des canaux potassique à large conductance activés par le calcium (BK<sub>Ca2+</sub>). Ces résultats sont cependant contrversés. Les études d'invalidation des gènes codant pour les récepteurs MT permettent de comprendre l'implication physiologique de chaque sous-type de récepteur. Dans la *pars tuberalis* de souris délétées du gène codant pour le récepteur MT<sub>1</sub>, l'expression des gènes horloges (mPer1, mCry1, Clock, and Bmal1) est diminuée drastiquement. Ces résultats permettent d'identifier le rôle du récepteur MT<sub>1</sub> exprimé dans la *pars tuberalis*, chez la souris. En effet, en agissant par les récepteurs MT<sub>1</sub>, la mélatonine est un important régulateur de l'expression rythmique des gènes horloges (von Gall et al., 2005). Des études de double invalidation du gène codant pour les récepteurs MT<sub>1</sub> et /ou MT<sub>2</sub>, cette fois dans les NSC, montrent *in vitro* que les avances de phase du rythme circadien impliqueraient l'activation du sous-type 2 du récepteur, alors que *in vivo*, l'activation des deux sous-types (MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>) semble être nécessaire pour l'expression de ces avances de phase induite par la mélatonine (Dubocovich et al., 2005). D'autre part, lors d'un test de nage forcée sur des souris invalidées pour un des gènes codant pour les récepteurs MT, les effets anti-dépresseurs du luzindole passent uniquement par les récepteurs MT<sub>2</sub> (Sumaya et al., 2005). L'approche par invalidation de gènes permet d'une part, quand celle-ci est ciblée à une région, de connaître l'implication précise des récepteurs à la mélatonine dans une fonction biologique particulière. D'autre part, l'invalidation d'un seul des gènes codant pour les récepteurs aide à discriminer les rôles respectifs de ceux-ci *in vivo*. Mais la mise en œuvre de cette méthodologie, notamment pour l'espèce ovine est difficile.



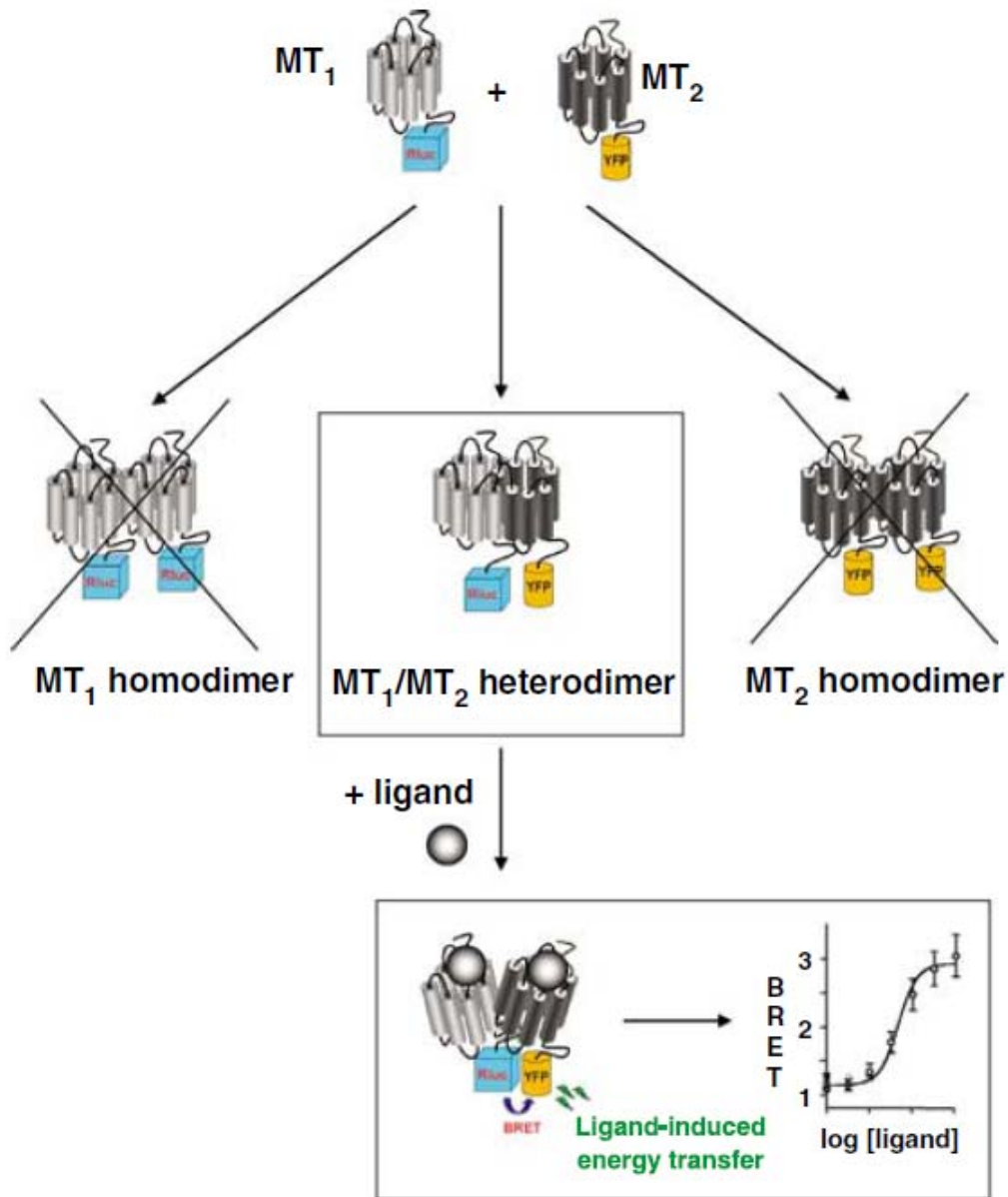
**Figure 29: Dimérisation des récepteurs  $MT_1$  et GPR50.** La stimulation des homodimères  $MT_1$  (rose) avec la mélatonine augmente le couplage avec les protéines  $G_i$  et le recrutement des  $\beta$ -arrestines, et inhibe la production d'AMPC. La coexpression avec le récepteur orphelin GPR50 (vert) empêche les interactions avec les  $\beta$ -arrestines et les protéines  $G_i$ , probablement en raison de l'encombrement stérique causé par la longue queue C-terminal de GPR50. **GPR50:** récepteur couplé aux protéines G 50, **MLT:** mélatonine, **MT:** récepteurs mélatoninergiques. D'après Levoye et al. (2006)



### 2.3.7. Dimérisation

Il s'avère que des RCPGs sont capables de former des homo- et des hétérodimères. En effet, plusieurs études menées à partir de cellules modèles ont montré que des RCPG sont capables de s'assembler entre eux en formant ainsi des homodimères (dimérisation de RCPG identiques) mais aussi des hétérodimères (dimérisation de RCPG différents) aux propriétés différentes de celles de chacun des deux protomères (Maggio et al., 2005; Prinster et al., 2005; Terrillon and Bouvier, 2004). Ces découvertes sont d'autant plus intéressantes qu'elles ont été validées dans des tissus exprimant les récepteurs de façon endogène. De plus, quelques études ont décrits l'implication de la dimérisation dans certains aspects de la biologie des récepteurs, comme leur biosynthèse, leur maturation, leur activation et leur régulation (Bulenger et al., 2005).

Les trois membres de la famille des récepteurs à la mélatonine,  $MT_1$ ,  $MT_2$  et GPR50 exprimés transitoirement dans la lignée HEK293 (human embryonic kidney 293) peuvent se dimériser (Levoye et al., 2006b) (Figure 29). Comme indiqué précédemment, il faut remarquer que les récepteurs  $MT_1$ ,  $MT_2$  et GPR50 peuvent former des homodimères mais également des hétérodimères (Ayoub et al., 2002). La formation d'hétérodimères  $MT_1/MT_2$  semblerait modifier la fonctionnalité de ceux-ci. En effet, le profil pharmacologique de l'hétérodimère  $MT_1/MT_2$  est différent de celui des homodimères correspondant (Ayoub et al., 2004) (Figure 30). Les récepteurs MT ont tendance à s'hétérodimériser plus fréquemment qu'à s'homodimériser. Dans un hétérodimère, la sélectivité de liaison des sites  $MT_1$  et  $MT_2$  est conservée. Dans le cas de l'hétérodimère  $MT_1/GPR50$ , la capacité de liaison de la mélatonine par le récepteur  $MT_1$  est complètement perdue, ainsi que son couplage avec les protéines Gi et les  $\beta$ -arrestines (Levoye et al., 2006b). En revanche, l'hétérodimérisation du récepteur  $MT_2$  avec le récepteur GPR50 ne modifie pas la fonction de  $MT_2$ . Ce phénomène de dimérisation avec GPR50 peut être interprété comme un mode de régulation de la fonction des récepteurs de la mélatonine (Jockers et al., 2008). Il est possible que les récepteurs MT s'hétérodimérisent avec d'autres récepteurs, en particulier avec le sous-type de récepteurs sérotoninergiques  $5HT_{2C}$ . Des études fonctionnelles sur l'agomélatine, agoniste mélatoninergique ( $MT_1$  et  $MT_2$ ) et antagoniste sérotoninergique ( $5HT_{2C}$ ), suggèrent cette possible dimérisation (de Bodinat et al., 2010). Ce phénomène de dimérisation des récepteurs MT et GPR50 a été étudié dans des contextes forcés (expression transitoire, haut niveau d'expression du/des récepteur(s)). La signification de cette dimérisation n'est pas encore élucidée, ni même démontrée dans des conditions physiologiques. Cependant, pour d'autres



**Figure 30: Détermination du profil pharmacologique des hétérodimères  $MT_1/MT_2$  par BRET (transfert d'énergie par résonance de bioluminescence).** La co-expression des protéines de fusion  $MT_1$ -Rluc (luciférase Renilla) et  $MT_2$ -YFP (variant jaune de la protéine verte fluorescente) résulte en la formation de trois espèces d'oligomères différents (homodimères  $MT_1$ -Rluc, homodimères  $MT_2$ -YFP et hétérodimères  $MT_1$ -Rluc/ $MT_2$ -YFP). La technique de BRET permet de détecter uniquement les hétérodimères  $MT_1$ -Rluc/ $MT_2$ -YFP. D'après Jockers et al. (2008).

RCPG, des études ont montré l'existence de dimères à la membrane plasmique dans leurs tissus d'origine. Tout d'abord, suite à une observation de cellules en microscopie de force atomique, des dimères de la rhodopsine en condition native ont été visualisés à la membrane plasmique (Fotiadis et al., 2003). Le phénomène de dimérisation a été déduit par coopération négative (la liaison d'un ligand sur l'un des récepteurs inhibe fortement la liaison d'un second ligand sur le deuxième récepteur) dans des cellules de thyroïde porcine qui expriment de façon endogène le récepteur à la TSH. Comme la coopération négative implique une dimérisation du récepteur, ces résultats montrent que le récepteur à la TSH existe sous forme de dimère dans ce tissu (Urizar et al., 2005). De plus, des études, utilisant différents ligands fluorescents du récepteur à l'ocytocine, montrent l'existence de dimères de récepteurs à l'ocytocine à la surface des cellules de la glande mammaire (Albizu et al., 2010). Des études sont donc encore nécessaires d'une part pour établir formellement l'existence des dimères MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> et GPR50 dans les tissus et d'autre part leur importance physiologique. Néanmoins, des données permettent d'envisager l'existence de ces dimères, puisque la co-expression des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> a été décrite dans plusieurs tissus comme la rétine et différentes structures cérébrales (Dubocovich, 1983; Reppert et al., 1994). La dimérisation des récepteurs mélatoninergiques dans les tissus où ils sont exprimés reste à établir.

### 2.3.8. Régulation des récepteurs mélatoninergiques

#### 2.3.8.1. Facteurs de régulation de l'expression des récepteurs à la mélatonine

La régulation de l'expression des récepteurs MT peut être contrôlée par trois facteurs : le stade de développement de l'animal, la présence de mélatonine et la période de l'année. La régulation par la mélatonine de l'expression de ses propres récepteurs sera développée dans le paragraphe suivant.

En fonction du stade de développement de l'animal, la densité de récepteurs varie. Chez le hamster syrien, la densité de récepteurs dans les NSC diminue après la naissance (Duncan and Davis, 1993). Dans la *pars distalis*, les ARNm codant pour le récepteur MT<sub>1</sub> ainsi que le récepteur lui-même sont présents à la naissance, mais diminuent drastiquement ensuite. Vingt et un jours après la naissance, le récepteur MT<sub>1</sub> n'est plus détecté dans la *pars distalis* (Vanecek, 1988b). En revanche, son expression apparaît dans la PT (Johnston et al., 2003).

Un autre paramètre pouvant contrôler l'expression des récepteurs de la mélatonine est le moment de l'année. Chez le vison mâle, la densité de récepteurs de la mélatonine est plus importante en hiver qu'en été (Messenger et al., 1997). Alors que chez le hérisson, le hamster



et le mouton, l'expression des récepteurs MT est plus accrue en été qu'en hiver (Gauer et al., 1993a; Piketty, 2001; Skene et al., 1993).

#### 2.3.8.2. Régulation de l'expression des récepteurs MT par la mélatonine

La régulation de l'expression des récepteurs MT par l'hormone elle-même fait intervenir les phénomènes de désensibilisation. Ce phénomène intervient dans les secondes qui suivent la liaison du récepteur. La désensibilisation des RCPG permet de réduire fortement la capacité de réponse du récepteur en présence d'agoniste. Ce mécanisme permet à la fois d'éviter la sur-production de seconds messagers mais également de dégrader ceux déjà produits. Il existe deux types de désensibilisation : la désensibilisation hétérologue et la désensibilisation homologue. La désensibilisation hétérologue fait intervenir la PKA et la PKC. Ces kinases sont activées par le récepteur lié à son agoniste, mais aussi par le récepteur à l'état inactif. Elles exercent un rétrocontrôle négatif en phosphorylant des résidus Sérine et Thréonine sur le récepteur. Ces phosphorylations empêchent la liaison de la protéine G au récepteur et provoque donc sa désensibilisation. La désensibilisation homologue, contrairement à la désensibilisation hétérologue, est spécifique des récepteurs activés. Elle fait intervenir deux protéines majeures, les kinases des RCPG (GRK) et les arrestines. Les GRK phosphorylent les résidus Sérine et Thréonine des boucles intracellulaires et du domaine intracellulaire des récepteurs activés (Premont et al., 1995). Ces phosphorylations entraînent à la fois une diminution de l'affinité des protéines G pour le récepteur mais également une augmentation de l'affinité des  $\beta$ -arrestines pour celui-ci. Les GRK ne sont pas les molécules effectrices du découplage entre le récepteur et les protéines G mais elles permettent de potentialiser le recrutement des arrestines. Ce sont alors les arrestines qui conduisent au découplage du complexe récepteur/protéine G.

La mélatonine (concentration et durée d'exposition) contrôle l'expression de ses propres récepteurs. Les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> sont régulés différemment en fonction des concentrations physiologiques (30 à 400pM) ou supra-physiologiques (1 à 1000nM) de mélatonine. Les concentrations physiologiques de la MLT sont bien en dessous de la puissance (EC<sub>50</sub>) de cette hormone pour ses récepteurs MT, qui sont activés par des concentrations de mélatonine de l'ordre du picomolaire (Audinot et al., 2008; Dubocovich et al., 1997; Reppert et al., 1996b). Les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> sont régulés différemment également en fonction de la durée de stimulation de la mélatonine. Une exposition longue (environ 8 heures) à des concentrations diurnes de mélatonine (30pM) peut induire l'activation et la désensibilisation des récepteurs MT. Suite à une exposition mimant la durée



de la nuit (environ 8 heures) à des concentrations physiologiques, aucune différence de densité, d'affinité et de sensibilité des récepteurs MT<sub>1</sub> humain (hMT<sub>1</sub>) n'est observée. En revanche, suite à une exposition longue à des concentrations supra-physiologiques (100nM), la densité des récepteurs hMT<sub>1</sub> et hMT<sub>2</sub> exprimés de façon stable dans la lignée immortalisée d'ovaires de hamster chinois (CHO) augmente alors que leur affinité pour la mélatonine diminue (Gerdin et al., 2003). Dans ces conditions (exposition longue et forte concentration de mélatonine), la désensibilisation des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> apparaît avec une diminution de la formation d'AMPC et de l'hydrolyse des phosphoinositols) (MacKenzie et al., 2002; Witt-Enderby et al., 2003). Dans des cellules de *pars tuberalis* ovine, ce même phénomène de désensibilisation des récepteurs endogènes a été observé (Hazlerigg et al., 1993). Ces études montrent que la mélatonine endogène et exogène régule négativement ses propres récepteurs après une exposition longue (supérieure à 5h). Cette régulation négative des récepteurs MT suite à une exposition prolongée à l'agoniste est la conséquence de la dégradation des récepteurs et/ou de la régulation négative de sa transcription.

La régulation des récepteurs MT par leur ligand endogène reste toute fois ambiguë. En effet, au niveau des NSC et de la *pars tuberalis* de rat, il existe une corrélation inverse entre le taux de mélatonine et la densité de récepteurs MT (Gauer et al., 1993b; Tenn and Niles, 1993), alors qu'au niveau des NSC de hamster, cette corrélation n'est pas observée (Recio et al., 1996). Toute fois, dans les cellules neuronales GT1-7, exprimant de façon endogène les récepteurs MT<sub>1</sub>, une internalisation dépendant de l'arrestine a été détectée suite à une brève exposition à la mélatonine (Roy et al., 2001). De plus, une exposition de courte durée (environ 10 minutes) induit une désensibilisation et une internalisation dépendante de l'arrestine des récepteurs hMT<sub>2</sub> exprimés dans la lignée CHO. Ces phénomènes ne sont pas observés dans la lignée CHO exprimant les récepteurs hMT<sub>1</sub> (Gerdin et al., 2003). Cette régulation différentielle des récepteurs hMT<sub>1</sub> et hMT<sub>2</sub> pourrait être le mécanisme par lequel la mélatonine régule dans le temps ses effets physiologiques.

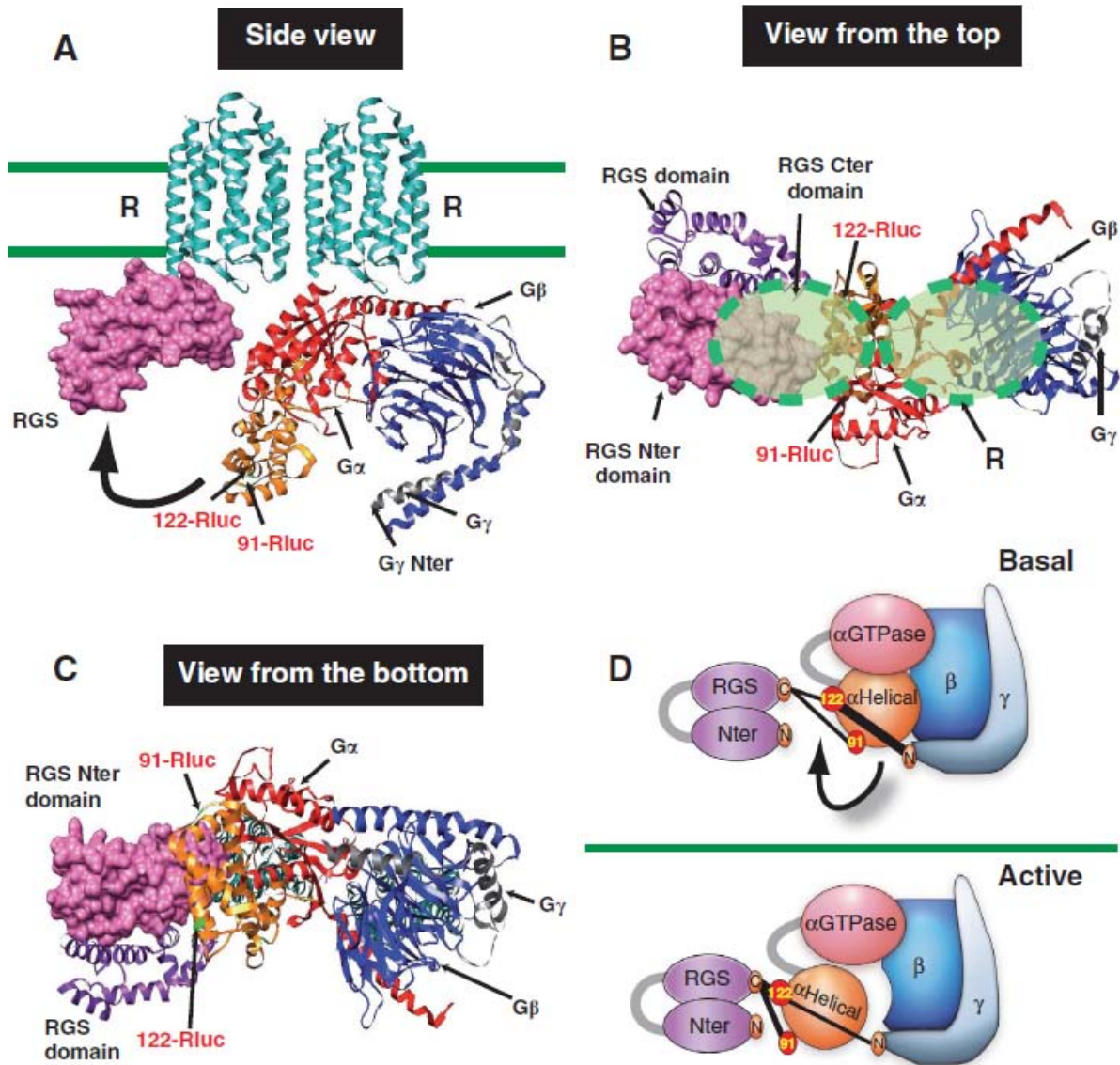
D'autre part, les récepteurs hMT<sub>1</sub> exprimés dans des cellules de mammifères non-neuronales seraient constitutivement actifs (Ersahin et al., 2002; Roka et al., 1999). Les récepteurs hMT<sub>1</sub> constitutivement actifs présenteraient une conformation faiblement phosphorylable et par conséquent seraient incapables d'interagir avec les arrestines qui participent au mécanisme de désensibilisation et donc d'internalisation. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que l'extrémité C-terminale des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> était impliquée dans le processus d'internalisation (Sethi et al., 2008).





### 2.3.8.3. Implication des protéines régulatrices de la signalisation par les protéines G

Des approches protéomiques ont montré que les RCPG, en plus d'interagir avec les protéines G, pouvaient interagir avec une multitude de protéines régulatrices intracellulaires. Parmi celles-ci, les protéines régulatrices de la signalisation par les protéines G (RGS). Les RGS sont des protéines activant l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$  des protéines G. Ce mécanisme d'action indique que les RGS modulent bien la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G. Maurice et al. (2010) ont montré l'existence constitutive d'un complexe ternaire avec comme partenaires, le récepteur  $MT_1$ , la protéine  $G_i$  et la protéine RGS20 (Maurice et al., 2010). Considérant l'encombrement stérique des partenaires cytoplasmiques (protéines  $G_i$  et RGS20), il a été suggéré que les partenaires se lient à deux protomères différents au sein d'un dimère  $MT_1$ . Cette organisation asymétrique du complexe est schématisée sur la figure 31. Une stimulation avec de la mélatonine ne modifie pas la stoechiométrie et l'architecture moléculaire de ces complexes. En présence de complexes  $MT_1$ /RGS, la cinétique d'activation des canaux potassiques de type Kir3 est accélérée suite à une stimulation de la mélatonine. Un autre membre de la famille des RGS, le RGS4, se lie au récepteur  $MT_1$  et sert d'interface cette fois-ci entre le récepteur  $MT_1$  et le récepteur à la TSH. La protéine RGS4 est connue pour atténuer la signalisation de nombreux RCPG couplés à des protéines  $G_i$  et/ou  $G_q$ . Etant donné que le récepteur à la TSH est couplé à une protéine  $G_s$ , la protéine RGS4 module les effets inhibiteurs du récepteur  $MT_1$  sur la voie de signalisation AMPc (Dupré and Dardente, 2011).



**Figure 31 : Schéma de l'organisation asymétrique du complexe protéique  $MT_1/Gi/RGS20$  à l'état basal et à l'état activé par la mélatonine.** (A-C) Représentation schématique du complexe entre le dimère de RCPG, la protéine G hétérotrimérique et la RGS (protéine régulatrices de la signalisation des protéines G). (A) : vue de côté ; (B) vue d'en haut ; (C) vue d'en bas. (D) Représentation schématique de l'arrangement structural au sein du complexe  $MT_1/Gi/RGS20$  détecté par BRET après activation par la mélatonine.

# Objectifs



## Objectifs de la thèse

La mélatonine est une hormone synthétisée et sécrétée uniquement la nuit par la glande pinéale. Les cibles cérébrales de la mélatonine ont été identifiées et de nombreux rôles lui sont attribués, le principal étant son implication dans la synchronisation des rythmes saisonniers en traduisant au niveau central la durée du jour. Les effets de la mélatonine sont relayés principalement par les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, appelés  $MT_1$  et  $MT_2$ . L'objectif général de cette thèse a été de caractériser la pharmacologie des récepteurs mélatoninergiques. Cet objectif général a été sub-divisé en trois objectifs distincts.

**- La caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur o $MT_2$ .** Le clonage du récepteur o $MT_2$  dans son intégralité a été réalisé pour la première fois dans notre laboratoire à partir de rétines de mouton. L'expression stable du récepteur o $MT_2$  dans la lignée cellulaire CHO-K1 a permis la caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur o $MT_2$ , une étape indispensable pour la compréhension de son implication éventuelle dans la régulation de la saisonnalité de la reproduction. Notre étude se concentre sur le comportement du récepteur o $MT_2$  vis-à-vis des molécules de référence, telles que la mélatonine, le 4P-PDOT et le luzindole. Il s'avère que la pharmacologie du récepteur  $MT_2$  ovin est similaire à celle des autres récepteurs  $MT_2$  étudiés (humain et rat). La seule particularité du récepteur o $MT_2$  serait son éventuelle activité constitutive.

**- La mise en évidence d'une activité constitutive des récepteurs MT.** Le travail de la première partie a suggéré que le récepteur o $MT_2$  serait constitutivement actif. Afin de tester cette hypothèse, dans un premier temps, le niveau d'activité basale des protéines G associées aux récepteurs MT a été mesuré dans des conditions expérimentales pouvant modifier le niveau d'activité constitutive (nature des lignées cellulaires, niveau d'expression des récepteurs, nature des protéines G impliquées). Dans un second temps, nous avons cherché à identifier un agoniste inverse, un outil pharmacologique indispensable à l'étude des récepteurs constitutivement actifs.

**- Le développement d'une approche permettant d'inhiber spécifiquement l'expression des récepteurs mélatoninergiques.** La compréhension de la pharmacologie de ces récepteurs et de leur(s) rôle(s) respectif(s) est sévèrement limitée à cause de l'absence de ligands sélectifs et d'anticorps spécifiques des récepteurs  $MT_1$  et/ou  $MT_2$ . Nous avons donc choisi une approche d'interférence par ARN, afin d'inhiber spécifiquement l'expression de



ces récepteurs dans des cultures primaires de *pars tuberalis* ovine. La lignée cellulaire CHO-K1 exprimant de façon stable les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> a été utilisée comme contrôle de cette méthodologie. L'effet de ces siRNA dirigés contre les récepteurs MT a été mesuré aussi bien au niveau fonctionnel, par l'étude des voies de signalisation (dosage de l'AMPc et mesure du niveau de phosphorylation de certains effecteurs) et par des saturations avec la 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-mélatonine qu'au niveau transcriptionnel, par des RT-PCR en temps réel.





Première partie:  
Caractérisation pharmacologique et  
fonctionnelle du récepteur  $\alpha\text{MT}_2$



# Introduction

Le récepteur MT<sub>1</sub> est exprimé chez l'ensemble des mammifères. Le récepteur MT<sub>2</sub> s'exprime chez de nombreuses espèces de mammifères (homme, rat, souris) (Reppert et al., 1996a) mais il n'est pas retrouvé dans deux espèces qui pourtant présente une saisonnalité de la reproduction très marquée. En effet, le récepteur MT<sub>2</sub> n'est détecté ni chez plusieurs genres de hamster (*Phodopus sungorus*, *Phodopus campbelli* et *Mesocricetus auratus*) (Weaver et al., 1996) ni chez le mouton ((Drew et al., 1998); (Barrett et al., 2003); (Migaud et al., 2005)). Chez le hamster sibérien, le gène codant pour le récepteur MT<sub>2</sub> a été identifié mais ce gène n'est pas fonctionnel, puisque dans sa séquence codante, plusieurs mutations non-sens ont été identifiées (Weaver et al., 1996).

Le récepteur MT<sub>2</sub> n'étant pas identifié chez le mouton malgré les tentatives de plusieurs laboratoires et le récepteur oMT<sub>1</sub> étant cloné, identifié et caractérisé (Mailliet et al., 2004), il a été suggéré que ce récepteur oMT<sub>1</sub> était impliqué dans la régulation de la saisonnalité de la reproduction. Cette suggestion était renforcée par plusieurs observations. En premier lieu, des ARNm codant pour oMT<sub>1</sub> ont été détectés dans l'hypothalamus pré-mammillaire, structure cible de la mélatonine connue pour ces effets sur la reproduction (Migaud et al., 2005). Ensuite, il existe une corrélation entre la fréquence des mutations alléliques du gène oMT<sub>1</sub> et l'intensité de l'activité anovulatoire des brebis (Pelletier et al., 2000). Chez le buffle, une relation entre le polymorphisme du second exon du gène MT<sub>1</sub> et la saisonnalité de la reproduction a été également établie (Carcangiu et al., 2011). Les études de mutations affectant le second exon du gène oMT<sub>1</sub> montrent une altération de la voie de signalisation AMPc. En revanche, ni l'affinité, ni l'internalisation, ni même le niveau d'expression du récepteur ne sont affectés. Ces mutations modifient donc la signalisation cellulaire et par conséquent l'interprétation du signal mélatoninergique (Trecherel et al.).

L'identification d'une séquence partielle du gène codant pour MT<sub>2</sub> chez le mouton a renouvelé l'intérêt pour ce récepteur (Xiao et al., 2007). Cette découverte est un premier indice en faveur de l'existence de MT<sub>2</sub> dans cette espèce mais cette étude n'apporte pas



une preuve formelle de la fonctionnalité du récepteur. D'autre part, une étude montre que, dans un système de sur-expression de MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>, MT<sub>2</sub> s'impliquerait préférentiellement dans la formation d'hétérodimères (Ayoub et al., 2004). Même si l'existence de l'hétérodimérisation des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> *in vivo* n'est toujours pas établie, ces résultats renforcent l'intérêt pour le récepteur MT<sub>2</sub> en tant que partenaire du récepteur MT<sub>1</sub> pour traduire les effets de la mélatonine.

Dans notre laboratoire, après de nombreuses tentatives d'amplification des ARNm codant pour le récepteur oMT<sub>2</sub>, il a été possible dans des conditions particulières de RT-PCR de cloner l'intégralité de l'ADNc du récepteur oMT<sub>2</sub> à partir de rétines. Comme dans de nombreuses espèces, ce tissu est très riche en récepteur MT<sub>2</sub> (Alarma-Estrany and Pintor, 2007; Reppert et al., 1995). Après expression stable dans la lignée CHO-K1, la caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur oMT<sub>2</sub> a été possible en utilisant des molécules de référence pour les récepteurs mélatoninergiques, comme le luzindole et le 4-phényl-2-propionamidotétraline (4P-PDOT) (Jockers et al., 2008). Par un ensemble de tests (dosage AMPc, test de liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS et spectroscopie diélectrique cellulaire), j'ai réalisé la caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur oMT<sub>2</sub> tout en le comparant aux récepteurs des autres espèces (homme et rat).<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> L'ensemble des résultats d'identification et de caractérisation du récepteur oMT<sub>2</sub> est rapporté dans l'article inclus en page 52-67. Je décris ci-après ma contribution à ce travail sur la caractérisation pharmacologique.



## RESEARCH PAPER

The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT<sub>2</sub> receptor

F Cogé<sup>1</sup>, SP Guenin<sup>1</sup>, I Fery<sup>1</sup>, M Migaud<sup>2</sup>, S Devavry<sup>1,2,4</sup>, C Slugocki<sup>2</sup>, C Legros<sup>2</sup>, C Ouvry<sup>1</sup>, W Cohen<sup>1</sup>, N Renault<sup>3</sup>, O Nosjean<sup>1</sup>, B Malpoux<sup>2</sup>, P Delagrange<sup>4</sup> and JA Boutin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Institut de Recherches SERVIER, Suresnes, France, <sup>2</sup>Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France, <sup>3</sup>Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Lille Cedex, France, and <sup>4</sup>Département des Sciences Expérimentales, Institut de Recherches SERVIER, Suresnes, France

**Background and purpose:** For many years, it was suspected that sheep expressed only one melatonin receptor (closely resembling MT<sub>1</sub> from other mammal species). Here we report the cloning of another melatonin receptor, MT<sub>2</sub>, from sheep.

**Experimental approach:** Using a thermo-resistant reverse transcriptase and polymerase chain reaction primer set homologous to the bovine MT<sub>2</sub> mRNA sequence, we have cloned and characterized MT<sub>2</sub> receptors from sheep retina.

**Key results:** The ovine MT<sub>2</sub> receptor presents 96%, 72% and 67% identity with cattle, human and rat respectively. This MT<sub>2</sub> receptor stably expressed in CHO-K1 cells showed high-affinity 2[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding ( $K_D = 0.04$  nM). The rank order of inhibition of 2[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding by melatonin, 4-phenyl-2-propionamidotetralin and luzindole was similar to that exhibited by MT<sub>2</sub> receptors of other species (melatonin > 4-phenyl-2-propionamidotetralin > luzindole). However, its pharmacological profile was closer to that of rat, rather than human MT<sub>2</sub> receptors. Functionally, the ovine MT<sub>2</sub> receptors were coupled to G<sub>i</sub> proteins leading to inhibition of adenylyl cyclase, as the other melatonin receptors. In sheep brain, MT<sub>2</sub> mRNA was expressed in pars tuberalis, choroid plexus and retina, and moderately in mammillary bodies. Real-time polymerase chain reaction showed that in sheep pars tuberalis, premammillary hypothalamus and mammillary bodies, the temporal pattern of expression of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> mRNA was not parallel in the three tissues.

**Conclusion and implications:** Co-expression of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors in all analysed sheep brain tissues suggests that MT<sub>2</sub> receptors may participate in melatonin regulation of seasonal anovulatory activity in ewes by modulating MT<sub>1</sub> receptor action. *British Journal of Pharmacology* (2009) **158**, 1248–1262; doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00453.x; published online 8 October 2009

**Keywords:** melatonin; sheep; MT<sub>2</sub> receptor; cloning; pharmacology

**Abbreviations:** BSA, bovine serum albumin; CHO, Chinese hamster ovary cell line; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GPCR, G protein coupled receptor; HA, haemagglutinin epitope; 4P-PDOT, 4-phenyl-2-propionamidotetralin; RACE, rapid amplification of cDNA 3' and 5' ends; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; ZT, zeitgeber time

## Introduction

Melatonin is the pineal hormone that is secreted exclusively at night by the pineal gland (Arendt, 2005) and is implicated in a number of physiological functions. These include, among others, mood, sleep, circadian rhythms, the immune system and reproduction. In seasonally breeding animals, there is unequivocal evidence that melatonin, through its daily duration of secretion, is the primary transducer of photoperiodic

information to the neuroendocrine axis (Malpoux, 2006). However, the mechanisms of action are poorly known and particularly the type of receptor mediating this effect has not yet been identified.

So far, three high-affinity melatonin receptor subtypes have been cloned. They have been classified as MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> (previously known as Mel1a and Mel1b respectively) and Mel1c (Reppert *et al.*, 1996; Boutin *et al.*, 2005). All these subtypes display similar high binding affinity for melatonin (subnanomolar range) and the same rank of order for the binding of common ligands (Dubocovich, 1995; Dubocovich and Markowska, 2005). Structurally, high-affinity melatonin receptor subtypes define a distinct receptor family within the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCRs), as they

Correspondence: Dr Jean A Boutin, Division de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Institut de Recherches Servier, 125 chemin de Ronde, 78290 Croissy-sur-Seine, France. E-mail: jean.boutin@fr.netgrs.com

Received 26 March 2009; revised 19 May 2009; accepted 21 May 2009

have been shown to be functionally coupled to both *Pertussis* toxin-sensitive and *Pertussis* toxin-insensitive G proteins (Morgan *et al.*, 1990; Drew *et al.*, 2002). A fourth melatonin binding site, MT<sub>3</sub>, displaying lower affinity for melatonin (in the nanomolar range), was purified from human tissues using a biochemical approach and identified as the enzyme, quinone reductase 2 (Nosjean *et al.*, 2000). In mammals, MT<sub>1</sub> receptors are expressed in all species studied to date. By contrast, the situation is more complex concerning MT<sub>2</sub> receptors that have been found to be expressed in many mammalian species (human, rat, mice, see Reppert *et al.*, 1996 for details) but not in two species: several genera of hamsters (*Phodopus sungorus*, *Phodopus campbelli* and *Mesocricetus auratus*) (Weaver *et al.*, 1996) and sheep (Drew *et al.*, 1998; Barrett *et al.*, 2003; Migaud *et al.*, 2005), in which melatonin is a major regulator of seasonal physiology. In the Siberian hamster, the MT<sub>2</sub> receptor gene cannot encode a functional receptor, due to nonsense mutations in the coding region of the receptor cDNA (Weaver *et al.*, 1996). In sheep, only MT<sub>1</sub> receptors have been identified, cloned and characterized (Mailliet *et al.*, 2004) and have thus been thought to be involved in mediating all the effects of melatonin on seasonal reproduction. Indeed, MT<sub>1</sub> receptor mRNA is detected in the premammillary hypothalamus, the target structure of melatonin for its reproductive effects (Migaud *et al.*, 2005). In addition, a correlation has been observed between the frequency of a mutated allele of the gene of the MT<sub>1</sub> receptor and the intensity of seasonal anovulatory activity in ewes (Pelletier *et al.*, 2000). Interest in the MT<sub>2</sub> receptor was recently revived by two observations. First, Xiao and colleagues (2007) have reported a partial sequence for the ovine *MTNR1B* gene encoding the MT<sub>2</sub> receptor, indicating that this subtype might also be expressed in sheep, but no proof of the existence of a functional MT<sub>2</sub> receptor in this species was brought in this particular work. Second, recent studies suggested that MT<sub>2</sub> receptors may be preferentially engaged into heterodimers in cells co-expressing both MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors (Ayoub *et al.*, 2004). Although the importance of this heterodimerization has to be established in native mammalian tissues, this reinforces the need to analyse jointly where MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors are expressed and how their expression is regulated.

In order to check whether the absence of the ovine MT<sub>2</sub> receptor mRNA was due to technical cloning difficulties, we tested numerous reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) conditions. Using a thermo-resistant reverse transcriptase, we succeed in cloning the complete cDNA of the MT<sub>2</sub> receptor from sheep retina. After stable expression of this receptor in CHO-K1 cells, we have pharmacologically and functionally characterized the ovine MT<sub>2</sub> receptor, using as reference compounds, luzindole and 4-phenyl-2-propionamidotetraline (4P-PDOT) (Jockers *et al.*, 2008). Interestingly, these two antagonists distinguished between ovine MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. Real-time PCR also allowed the comparison of the expression of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors in different sheep brain tissues. Obviously, the demonstration that sheep possesses functional MT<sub>2</sub> receptors changes our understanding of melatonin physiology in these species. As sheep is the preferred species for *in vivo* studies on melatonin (as it is less distantly related to human in terms of diurnal/nocturnal behaviour than rodents), this

discovery is of great importance for the understanding of melatonin actions.

## Methods

### *Animals and tissue preparation*

Animals were killed between 06:00 and 12:00 h (late night and morning) by licensed butchers in an official slaughterhouse under the authorization No A37801 for Animal Experimentation and Surgery from the French Ministry of Agriculture. Tissue samples (retina, mammillary bodies, hippocampus, premammillary hypothalamus, caudate nucleus, choroid plexus, pineal gland and pars tuberalis) were collected from 14 adult Ile-de-France ewes, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for RNA extraction. The interval between death and freezing of the brain samples was less than 10 min.

### *Cloning of ovine MT<sub>2</sub> receptor cDNA*

Sheep retina DNA-free total RNA (4 µg) was converted into cDNA with oligodT in accordance with ThermoScript cDNA synthesis protocol from Invitrogen. Oligonucleotide primers for *MTNR1B* receptor gene were designed from bovine *MTNR1B* receptor cDNA and gene previously cloned (XM\_607095 and contig Ensembl ENSBTAG00000001270; Genbank). The sequences of the primers of the first primer set were as follows: sense primer, 5'-ataaaggagcagggctgaggc-3' (5'UTR bovine *MTNR1B*; bases 265–287 of contig Ensembl ENSBTAG00000001270) and antisense primer 5'-tcatttctgagtgcgtggc-3' (end of coding region of bovine *MTNR1B*; bases 15583–15603 of contig Ensembl ENSBTAG00000001270) to produce a band of 1667 base pairs. PCR reaction was performed in 100 µL containing 10 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 µM primers, 2 µL cDNA, 20 µL of solution Q and 1U DNA polymerase (Core kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) with a 35-cycle programme of 94°C for 40 s, 55°C for 40 s and 72°C for 2 min, a hot start at 94°C for 3 min and a final extension at 72°C for 5 min. The amplified DNA fragment was subcloned into pcR4TOPO and then into pcDNA3.1D-V5HisTOPO vectors in accordance with Invitrogen protocols. The 3 haemagglutinin (HA) flag epitope (sequence YPYDVPDYAYPYDVPDYAYPYDVPDYAD) was introduced by PCR reaction into the ovine MT<sub>2</sub> receptor/pcDNA3.1D-V5HisTOPO expression construct at the N-terminus between the first methionine residue and the second residue of the ovine MT<sub>2</sub> receptor. The nucleotide sequence analysis on both DNA strands was determined by the dideoxy chain termination method using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit in a Model 3730 Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The nomenclature of the receptors follows the recommendations of BJP's Guide to Receptors and Channels (Alexander *et al.*, 2008).

### *Rapid amplification of cDNA 5' and 3' ends (5'- and 3'-RACE)*

The corresponding first-strand cDNAs were prepared from 4 µg of total RNA, using the ThermoScript reverse



transcriptase, 5'-CDS<sup>®</sup> primer (modified oligo-dT primer) and BD<sup>™</sup> SMART IIA<sup>®</sup> primer of the BD<sup>™</sup> SMART<sup>®</sup> RACE cDNA amplification kit (Clontech, Mountain View, CA). Dilutions of each 5' and 3' RACE-ready cDNAs were used in PCR amplification reactions with the SMART<sup>®</sup> RACE kit universal primer mix and either gene-specific antisense exon 2 primers (5'-ccgactccaagaacaggttacc-3'; position 737 of 761, EU679365) to amplify 5' ends of ovine MT<sub>2</sub> mRNA. Alternatively, an MT<sub>2</sub>-specific sense primer (5'-ggcaaccgcaagctccggaacgc-3'; position 713 of 735, EU679365) was also used in combination with the universal primer mix to amplify 3' ends of ovine MT<sub>2</sub> mRNA. The 5' and 3' RACE cDNAs syntheses and PCR amplifications were performed according to the manufacturer's instruction (Clontech, Mountain View, CA). The 3' and 5' RACE PCR products were purified from the gel and inserted into a pCR4-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). To avoid possible sequencing errors due to RACE artefacts, the sequence analyses were performed on five (5' RACE) and four (3' RACE) independent clones derived from each RACE. DNA sequencing was performed on both strands using an automated DNA sequence analyser 3730.

#### *Establishment of stable CHO-K1/3HA-oMT<sub>2</sub> cell line*

CHO-K1 cells, obtained from the American Type Culture Collection, were transfected with 3HA-oMT<sub>2</sub>/pcDNA3.1D-V5HisTOPO plasmid using lipofectAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA). CHO-K1 cells stably expressing 3HA-oMT<sub>2</sub> were selected using geneticin (0.8 mg·mL<sup>-1</sup>). CHO-K1/3HA-oMT<sub>2</sub> cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM glutamine, 500 units·mL<sup>-1</sup> penicillin/streptomycin and 400 µg·mL<sup>-1</sup> geneticin.

#### *Indirect immunofluorescence and confocal microscopy*

CHO-K1 cells stably expressing ovine MT<sub>2</sub> receptors were seeded at 1 × 10<sup>5</sup> cells per well of the eight-well Lab-Tek chamber slide (Nunc, Naperville, IL) in 0.4 mL medium. Cells were fixed by treatment with 4% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 15 min then blocked with 0.2% bovine serum albumin (BSA) and glycine (100 mM) in PBS for 30 min at 25°C. For visualization of HA epitope-tagged ovine MT<sub>2</sub> receptors, cell surface receptors were stained using a 1:500 dilution of monoclonal anti-HA IgG for 1 h at 37°C in PBS containing 0.2% BSA. After washing in PBS supplemented with 10% goat serum and 0.2% BSA, cells were incubated in a humidified chamber for 45 min at 37°C with secondary antibody (1:100 Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG; Sigma). Cells were then washed twice with PBS/0.2% BSA, and coverslips were applied using Vectashield<sup>®</sup> Mounting medium containing 4', 6'-diamidino-2-phenylindole to stain nuclei (Vector Lab, Burlingame, CA). Confocal microscopy was performed using a Zeiss LSM510 laser scanning microscope and a Zeiss 63 × 1.4 numerical aperture water immersion lens with dual line switching excitation (488 nm for Alexa fluor 488) and emission (515–540 nm) filter sets. Immunofluorescence images were captured with a Photometrics 16-bit cooled digital camera.

#### *Membrane preparations*

Human and rat receptors were used as previously cloned and described in our laboratory (Audinot *et al.*, 2003; 2008 respectively). CHO-K1 cell lines stably expressing rat, human or ovine MT<sub>2</sub> receptors or the ovine MT<sub>1</sub> receptor were grown to confluence, harvested in phosphate buffer containing 2 mM EDTA and centrifuged at 1000× *g* for 5 min (4°C). The resulting pellet was suspended in 5 mM Tris/HCl, pH 7.4, containing 2 mM EDTA, and homogenized using a Kineatica Polytron (30 s, in ice 13 000 rpm). The homogenate was then centrifuged (20 000× *g*, 30 min, 4°C), and the resulting pellet was suspended in 75 mM Tris/HCl, pH 7.4, containing 2 mM EDTA and 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Determination of protein content was performed according to Lowry using the Biorad kit (Bio-Rad SA, Ivry-sur-Seine, France). Aliquots of membrane preparations were stored in binding buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4 containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EDTA) at -80°C until use.

#### *2-[<sup>125</sup>I]-melatonin binding assay*

Membranes were incubated for 2 h at 37°C in binding buffer in a final volume of 250 µL containing 2-[<sup>125</sup>I]-melatonin (20 pM) for competition experiments. The results were expressed as K<sub>i</sub>, taking into account the concentration of radioligand used in each experiments. Non-specific binding was defined with 1 µM 2-iodomelatonin. Reaction was stopped by rapid filtration through GF/B Unifilters, followed by three successive washes with ice-cold buffer. Data were analysed by using the program PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). For saturation assays, the density of binding sites B<sub>max</sub> and the dissociation constant of the radioligand (K<sub>D</sub>) values were calculated according to the method of Scatchard. For competition experiments, inhibition constants (K<sub>i</sub>) were calculated according to the Cheng-Prussoff equation:  $K_i = IC_{50}/[1 + (L/K_D)]$ , where IC<sub>50</sub> is the measured inhibitory concentration 50%, L, the concentration of 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin and K<sub>D</sub>, the dissociation constant (Cheng and Prussoff, 1973).

#### *[<sup>35</sup>S]-GTPγS binding assay*

Membranes and drugs were diluted in binding buffer (20 mM HEPES, Ph 7.4, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 µM GDP, 20 mg·mL<sup>-1</sup> saponin). For agonist tests, incubation was started by the addition of 0.2 nM [<sup>35</sup>S]-GTPγS to membranes and ligands, and carried on for 60 min at room temperature in a final volume of 250 µL. To test for antagonist activity, membranes were pre-incubated for 30 min with 3 nM melatonin and concentration of the tested compound. Reaction was started by the addition of 0.2 nM [<sup>35</sup>S]-GTPγS and followed by 60 min incubations. Non-specific binding was assessed using unlabelled GTPγS (10 µM). All reactions were stopped by rapid filtration through GF/B unifilters pre-soaked with distilled water, followed by three successive washes with ice-cold buffer. Data were analysed by using the program PRISM to yield EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> values for agonists. Antagonist potencies were expressed as K<sub>B</sub> with  $K_B = IC_{50}/1 + ([ago]/EC_{50}ago)$ , where IC<sub>50</sub> is the inhibitory concentration of antagonist that gives 50% inhibition of [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding in the presence of a fixed

concentration of agonist [ago] and EC<sub>50</sub>ago is the EC<sub>50</sub> of the agonist when tested alone.

#### cAMP assay

CHO-K1/3HA-oMT<sub>2</sub> cells were maintained in culture at less than 80% confluence. They were detached using Cell Dissociation Buffer (SIGMA), washed in 1× PBS (Invitrogen) and resuspended in HAM-F12 medium (Invitrogen) + IBMX (500 μM). Production of cAMP was assessed in triplicates, in black half-well 96-well plates (CORNING), using the cAMP dynamic2 kit (CISBIO), as described by the manufacturer. In brief, 30 000 cells were incubated with 5 μM forskolin and varying concentrations of melatonin in 50 μL of HAM-F12 medium for 30 min at 20°C. Then, 25 μL of cAMP-d2 followed by 25 μL europium cryptate anti-cAMP antibody (diluted as described in the manufacturer's protocol) was added in each well. The signal was quantified after 60 min of incubation using an EnVision time resolved-fluorescence resonance energy transfer reader (Perkin Elmer). Graphic representations and data analysis were generated with PRISM 4.03 (Graphpad).

#### Cellular dielectric spectroscopy

CHO-K1 cells expressing ovine, human or rat MT<sub>2</sub> receptors were plated at the density of 80 000 cells per well onto MDS Analytical 96-well assay plates with embedded electrodes, and were incubated at 37°C, CO<sub>2</sub> 6% for 24 h, in the presence of 100 ng·mL<sup>-1</sup> Pertussis toxin, as specified. Prior to the measurement, cells were washed three times with Hank's balanced salt solution, 0.1% BSA, 20 mM HEPES, pH 7.4 and were left to equilibrate at 28°C for 30 min. The impedance measurement was performed on a CellKey system (MDS Analytica, Concord, Canada), where the signal was recorded for 5 min before online addition of melatonin and 15 min thereafter. The cells in each well were stimulated once with a single concentration of compounds. The resulting data are expressed as the maximal signal corrected for the baseline, and represented as a percentage.

#### RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted from tissues using Trizol protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA), purified by phenol/chloroform and ethanol precipitation. Total RNA Samples were then heated at 96°C for 6 min and digested with 2 U of DNase I (DNA-free kit, Ambion, Austin, TX) at 37°C for 1 h. DNase I was removed using DNase I inactivation reagent (DNA-free kit, Ambion, Austin, TX) following the manufacturer's recommendations. Specific sense and antisense 22-25mer oligonucleotides were directed towards selected regions of exon 2 of the gene coding *MTNR1A* receptor (Genbank: U14109). The sequences 5'-gaattgccatcaaccgctattgc-3' (bases 445-469) and 5'-acagaagacgactacgacatcg-3' (bases 691-714) correspond to the upper-strand and lower-strand primers respectively. Oligonucleotide primers for *MTNR1B* receptor gene encoding MT<sub>2</sub> receptor were designed from exon 2 of the ovine receptor gene previously cloned (Genbank: EU679365). The sequences of the primers were as follows: sense primer, 5'-ggtaacctgttctgtgtagtctgg-3' (bases 1164-1184) and

antisense primer 5'-gcagataatctcccactgatgcc-3' (bases 1545-1567) to produce a band at 800 base pairs. The ovine GAPDH (Genbank: AF030943) served as a control for the quality of cDNA and forward and reverse primers were 5'-gtgatgctgggtgctgagtagc-3' (bases 127-146) and 5'-gtagaagagtggagtgctgcg-3' (bases 745-727) respectively. Total RNAs were primed with oligodT (successively 70°C 5 min, 0°C 5 min and 25°C 5 min) and converted into cDNA using a reverse-transcriptase (ImProm RT System, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) for 60 min at 42°C. After enzyme inactivation (15 min at 70°C), cDNAs were subjected to PCR amplification. PCRs were run in 100 μL containing 10 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 μM primers, 2 μL cDNA and 1U DNA polymerase (PCR green GoTaq Master Mix, Promega, Charbonnières-les-Bains, France). PCRs were preceded by 2 min pre-denaturation step at 95°C, then run for 30 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1 min followed by a 5 min extension period. A PCR control was performed by replacing the cDNA sample with water. mRNA not reverse-transcribed and ovine genomic DNA were used as a negative and positive control respectively. Ten microliters of PCR were loaded in parallel with the molecular weight marker (Gel Pilot 1 kb Plus Ladder, Qiagen, Courtaboeuf, France) on a 2% agarose gel containing ethidium bromide. To confirm the identity of the sequences, the amplified cDNA fragments were sequenced.

#### Real-time PCR

Thirty Ile de France sires were placed in a controlled photoperiodic environment under 12:12 light : dark cycle. In order to collect the biological samples during the same day, animals were separated in two groups and placed in opposite photoperiodic conditions with lights on between 09:00 and 21:00 h for half of the animals ( $n = 15$ ) and lights on between 18:00-06:00 for the other half ( $n = 15$ ). After 3 weeks of adaptation in these controlled photoperiodic regimen, animals were killed and three tissues, pars tuberalis, premammillary hypothalamus and mammillary bodies were collected at six time points of the day-night cycle. These points are expressed using ZT 0 (zeitgeber time 0, time of lights on) as a reference: ZT 1.5, 6, 10.5, 13.5, 18 and 22.5 ( $n = 5$  structures per condition). Pars tuberalis and premammillary hypothalamus express MT<sub>1</sub> receptors and are involved in seasonal control of physiological functions, in contrast to the mammillary bodies. When tissue collection occurred during the night, dim red light was used in order to prevent a potential effect of the light. Structures were then immediately frozen in liquid nitrogen and stocked at -80°C until RNA extraction. After tissue homogenization in QIAzol Lysis Reagent from the RNeasy Lipid Tissus MiniKit (Qiagen, France), 1 pg of luciferase mRNA (Promega, France) was added in each sample as an exogenous standard. Reverse transcription was performed at 37°C for 50 min using oligo(dT)<sub>15</sub> primers (Promega, France) by ThermoScript reverse transcriptase (Invitrogen, France) onto DNase-treated RNA.

Resulting target cDNAs were quantified by real-time PCR with iQ SYBR green supermix (Bio-Rad, France) using a iCycler system (Bio-Rad) with specific primers for ovine MT<sub>1</sub> receptor (5'-CCTCCATCCTCATCTTACCATC; reverse 5'-GGCTCACC

ACAAACACATTCC), for ovine MT<sub>2</sub> receptor (5'-CGTCGTGTGCTTCTGCTACC and reverse 5'-GCTTGCTCTCCGCCTTGAC) and for *luciferase* (forward 5'-TCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG; reverse 5'-AGCCCATATCCTTGTCGTATCCC). A standard three-step protocol (95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 20 s) was repeated for 40–50 cycles, followed by acquisition of the melting curve. Amplicons were sequenced to check the identity of the amplified cDNA. The standard curve was deduced from serial dilutions (100–0.01 fg) of a plasmid including the target sequence incorporated in each run. A cDNA amount was used in triplicate PCR reactions, and the median value was considered (0 when not detected). For each sample, the data were normalized to the median value for exogenous luciferase.

#### Data analysis

All the results of real-time quantitative PCR assay were expressed as mean values ( $\pm$ SEM). One-way ANOVA was performed to assess time-related changes in oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> mRNA expression in the PT, PMH and MB of sheep kept under LD conditions. A probability of  $P < 0.05$  is considered statistically significant.

#### Materials

The two radioligands 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin (specific activity: 2000 Ci·mmol<sup>-1</sup>) and [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S (guanosine-5' [<sup>35</sup>S]-triphosphate; specific activity: 1000 Ci·mmol<sup>-1</sup>) were purchased from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France). Melatonin was obtained from Sigma (St Louis, MO) and 4P-PDOT and luzindole (2-benzyl-N-acetyltryptamine) from Tocris (Bristol, UK). Compounds were dissolved in dimethylsulphoxide at a stock concentration of 10 mM and stored at -20°C.

## Results

#### Cloning and sequence analysis of the ovine MT<sub>2</sub> receptor

Because the partial ovine MT<sub>2</sub> sequence released by Xiao *et al.* (2007) was rich in GC, we wondered if the complete cloning was impaired by a technical problem. We therefore tested all commercially available thermo-resistant reverse transcriptases (with stable activity at temperatures over 37°C) after denaturation of mRNA at 70°C for 5 min followed by 5 min on ice. Using Thermoscript reverse transcriptase, we successfully amplified by RT-PCR from sheep retina, a cDNA fragment corresponding to the complete coding region (1131 bp) of the

mRNA for the ovine MT<sub>2</sub> receptor (Figure 1). 5' and 3' RACE analyses revealed 5'UTR of 514 bases and a short 3'UTR of 194 bases of ovine MT<sub>2</sub> mRNA (Figure 1). The nucleic acid sequence isolated by RT-PCR from sheep retina (Figure 1) revealed 67% of GC, which is higher than all other known MT<sub>2</sub> receptor sequences cloned so far. These results confirmed our starting hypothesis. The analysis of the initiation and stop codons identified only one open reading frame compatible with a receptor of 376 amino acids (Figure 1). The ovine MT<sub>2</sub> receptor cDNA isolated in the study possesses the residues T97, A99, A111, S154, L159, G243, A244, I276, I285, I307, K313, V323, S335 and D357, which corresponded to the major genotype (AA CC EE GG PP) described by Xiao *et al.* (2007) from five ovine breeds (Figure 1). With regards to sequence alignments between the human, rat and sheep MT<sub>2</sub> receptor sequences, there are global sequence identity and similarity [64% and 78% respectively (Figure 2)]. Local alignments are more significant with a 90% sequence similarity percentage in helices and 95% in extracellular loops, with the noticeable exception of the N-terminus region. Furthermore, there is no gap in this whole alignment. This result highlights the highly conserved structure of MT<sub>2</sub> receptors between species. The carboxy-terminal domain of ovine and bovine MT<sub>2</sub> receptors contains 10 additional amino acids compared with other species (Figure 2). The computational analysis of this carboxy-terminal region did not allow the identification of any potential specific property of ovine MT<sub>2</sub> and bovine MT<sub>2</sub> compared with MT<sub>2</sub> receptors from other species. The amplification of the ovine *MNTR1B* gene by PCR using cloning primers described in the *Methods* section showed that the coding region is composed of two exons spaced by a large intron (>10 kbp; data not shown) as described in human, rodent *MTNR1B* genes (Ensembl data bank: human ENSG00000134640, rat ENSRNO00000008972 and mouse ENSMU000000050901) and mouse *MTNR1A* gene (Roca *et al.*, 1996).

#### Expression and subcellular localization of recombinant ovine MT<sub>2</sub> receptors in CHO-K1 cells

After the addition of a flag with three influenza HA epitopes at the amino-terminal end of the coding region, the modified ovine MT<sub>2</sub> receptor was stably transfected in CHO-K1 cells. Immunostaining of non-permeabilized CHO-K1/3HA-oMT<sub>2</sub> cells with a fluorescent anti-HA antibody demonstrated a major expression of ovine MT<sub>2</sub> receptors at the plasma membrane (Figure 3B). No fluorescent signal was detected from CHO-K1 cells transfected with the vector alone (Figure 3A).

**Figure 1** Complete sequence of melatonin receptor 2 (MT<sub>2</sub>) mRNA isolated from sheep retina. The sequence of ovine retinal MT<sub>2</sub> receptor (1838 bases) was obtained by RT-PCR using primer set derived from the bovine MT<sub>2</sub> receptor cDNA sequence (XM\_607095 and contig Ensembl ENSBTAG 00000001270). 5'UTR and 3'UTR regions of ovine MT<sub>2</sub>, obtained to 5' and 3' RACE experiments, correspond to 514 and 194 bases respectively. The coding region contains 1131 bases and encodes 376 amino acids. The polyadenylation signal (AATAAA) is underlined. The deduced amino acid sequence is shown using single-letter amino acid code. Nucleic and amino acid sequences are numbered on the right. The nucleic and amino acid sequences of first exon are in italic characters. The positions of the two nonsense mutations described in Siberian hamster MT<sub>2</sub> receptor cDNA are double underlined. Amino acids described to be essential for ovine breeds polymorphisms discrimination (Xiao *et al.*, 2007) are highlighted in black. This sequence has been deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases under the accession no. EU679365.



### Saturation assays and binding characteristics

To determine whether ovine MT<sub>2</sub> cDNA encodes a melatonin MT<sub>2</sub> receptor, binding and pharmacological properties were examined by stably expressing ovine MT<sub>2</sub> receptors in CHO-K1 cells. For comparison, binding and pharmacology of CHO-K1 cells expressing the human and rat MT<sub>2</sub> receptors and the ovine MT<sub>1</sub> receptor were assessed in parallel. Analysis of the saturation data using one site and two site binding hyperbola fits (*F*-test, GraphPad PRISM) revealed the presence of a single high-affinity binding site of 2-[<sup>125</sup>I]-melatonin. Scatchard plot of the saturation data gave a *K<sub>D</sub>* value of 0.041 ± 0.04 nM (*pK<sub>D</sub>* = 10.39 ± 0.10) and a number of sites, *B<sub>max</sub>* value of 599 ± 10 fmol·mg<sup>-1</sup> protein in the CHO-K1/3HA-oMT<sub>2</sub> cells (Figure 4A). This *pK<sub>D</sub>* value was similar to that of human MT<sub>2</sub> and rat MT<sub>2</sub> receptors when expressed in CHO-K1 cells (Table 1). The binding characteristics of recombinant ovine MT<sub>2</sub> receptors were determined by competition binding using 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin as a radioligand and three reference ligands of melatonin MT<sub>2</sub> receptors (melatonin, 4P-PDOT and luzindole).

Figure 4B shows typical binding curves and Table 2 reports the calculated *pK<sub>i</sub>* values for the ovine recombinant MT<sub>2</sub> receptor, as well as affinity values of these compounds for ovine MT<sub>1</sub>, rat MT<sub>2</sub> and human MT<sub>2</sub> receptors. For the three compounds, competition curves were monophasic on membranes from cell lines expressing sheep, human and rat MT<sub>2</sub> receptors, showing that all curves were better fitted by a one-site analysis than by a two-site analysis (Figure 4B). The relative affinities of the three compounds studied here were similar for ovine, human and rat MT<sub>2</sub> receptors: melatonin > 4P-PDOT > luzindole (Table 2).

**Table 1** Binding affinities (*pK<sub>D</sub>*) and levels of receptor expression (*B<sub>max</sub>*) in CHO-K1 cells expressing rat (rMT<sub>2</sub>), human (hMT<sub>2</sub>), ovine (oMT<sub>2</sub> and oMT<sub>1</sub>) melatonin receptors

Receptors	<i>pK<sub>D</sub></i> ± SEM	<i>B<sub>max</sub></i> ± SEM, fmol·mg <sup>-1</sup> protein
rMT <sub>2</sub>	9.89 ± 0.61 ( <i>n</i> = 4)	1485 ± 342 ( <i>n</i> = 4)
hMT <sub>2</sub>	9.97 ± 0.99 ( <i>n</i> = 4)	2656 ± 282 ( <i>n</i> = 4)
oMT <sub>2</sub>	10.39 ± 0.10 ( <i>n</i> = 4)	599 ± 10 ( <i>n</i> = 4)
oMT <sub>1</sub>	10.85 ± 1.15 ( <i>n</i> = 4)	670 ± 25 ( <i>n</i> = 4)

The affinity and density of binding sites were determined by saturation analysis of the binding of 2-[<sup>125</sup>I]-2-iodomelatonin to membranes prepared from stably transfected CHO-K1 cells. Non-specific binding was determined in the presence of 1 μM 2-iodomelatonin.

However, the ovine and rat MT<sub>2</sub> receptors presented 10-fold less affinity for the antagonists, 4P-PDOT and luzindole, compared with human MT<sub>2</sub> receptors. The specific MT<sub>2</sub> receptor antagonist 4P-PDOT was approximately 10-fold more selective for the ovine MT<sub>2</sub> receptor than for the ovine MT<sub>1</sub> receptor (Table 2).

### G protein coupling

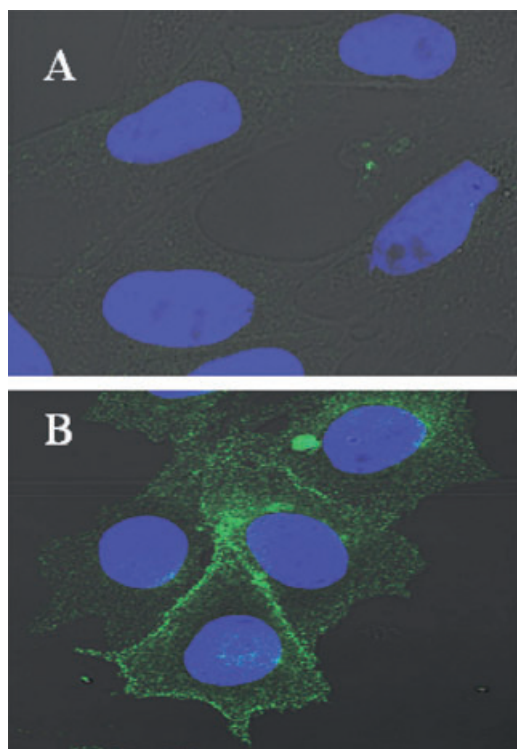
Functional activity of ovine MT<sub>2</sub> receptors was studied using the [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding assay, cAMP accumulation assay and cellular dielectric spectroscopy. The agonist or antagonist activities of three compounds (melatonin, 4P-PDOT and luzindole) at the recombinant melatonin receptors were evaluated by using [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding assay (Table 3). Melatonin showed an agonist effect on ovine recombinant MT<sub>2</sub> receptors with an affinity close to that obtained upon activation of human and rat MT<sub>2</sub> receptors (Table 3). Furthermore, 4P-PDOT and luzindole revealed no agonist activity at ovine MT<sub>2</sub> receptors. Hence, the behaviour of 4P-PDOT as partial agonist on human MT<sub>2</sub> receptors seems to be a distinguishing feature of this receptor (Table 3). The antagonist affinities of 4P-PDOT and luzindole were consistent with the observations made with the competition binding data, with a well conserved overall pharmacology (Table 1 and Figure 4B). These results demonstrated that the ovine MT<sub>2</sub> receptor expressed in CHO-K1 cells could couple to a G protein in presence of melatonin.

Incubation of CHO-K1/3HA-oMT<sub>2</sub> cells with 5 μM forskolin increased intracellular cAMP concentrations approximately 10-fold. This increase was inhibited by melatonin in a dose-dependent manner, with an IC<sub>50</sub> of 0.81 ± 0.62 nM and maximal inhibition levels of approximately 80% (Figure 5). Melatonin alone had no effect on basal cAMP levels. Similar to all other melatonin receptors, the ovine MT<sub>2</sub> receptor is coupled to G<sub>i</sub> protein in CHO-K1 cells.

To investigate if ovine MT<sub>2</sub> receptors can be coupled with other G proteins in CHO-K1 cells, we used a novel technology: cellular dielectric spectroscopy. This technology is based on the change of intercellular impedance (mainly resistance to an external electric current) of a monolayer of cells (Verdonk *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2007). Upon stimulation of a GPCR with an agonist, the signalling cascade will eventually lead to minute changes in cell adherence and/or cell shape, resulting in a change in the intercellular impedance. Interestingly, the kinetics and values of the impedance signal are

**Figure 2** Alignment comparison of primary sequence of various mammalian melatonin MT<sub>2</sub> receptors. The deduced amino acid sequence of the ovine MT<sub>2</sub> receptor was compared with cattle (XP\_001254950), rat (XP\_345900), mouse (NP\_663758), human (NP\_005959) and chimpanzee (XP\_522146) MT<sub>2</sub> receptor sequences. The bovine MT<sub>2</sub> sequence (XP\_001254950) used here are deduced from bovine *MTNR1B* gene (Loc787599 entrezgene), which presents a deletion of one adenine residue at position 1126 compared with XM\_607095 sequence and which reveals a carboxy-terminal region that better matches with other MT<sub>2</sub> of different species. The ClustalW algorithm was used to align these mammalian MT<sub>2</sub> sequences. Amino acid residues identical in the six MT<sub>2</sub> receptors are indicated by asterisks. Similar amino acids are indicated by dots or double dots. Amino acids not homologous to the ovine MT<sub>2</sub> sequence are indicated under this sequence. Deleted amino acids are indicated by a dash. The seven putative transmembrane domains (TMI to VII) designed by comparison with human rhodopsin receptor crystal are highlighted in yellow on ovine MT<sub>2</sub> sequence and numbered in roman numbers. The DRY sequence is highlighted in red. Thirteen amino acids described to be essential for 2-iodomelatonin binding to human MT<sub>2</sub> and MT<sub>1</sub> receptors (Conway *et al.*, 1997; 2000; Mseeh *et al.*, 2002; Gerdin *et al.*, 2003; Mazna *et al.*, 2005) are highlighted in green on the ovine MT<sub>2</sub> sequence. Twelve residues out of the 13 are conserved in all species; only the Phe<sup>295</sup> of human MT<sub>2</sub> receptor is replaced by a Leu in the ovine sequence. The amino acids specific to human MT<sub>2</sub> versus ovine/rat MT<sub>2</sub> receptors are presented in bold and underlined. The two cysteine residues Cys<sup>113</sup> and Cys<sup>190</sup> engaged in a disulphide bridge between TMIII and E2 loop, necessary for structural conservation of MT<sub>2</sub> receptors, are highlighted in blue.





**Figure 3** Subcellular localization of epitope-tagged ovine MT<sub>2</sub> receptor. Immunofluorescence studies were performed with transfected CHO-K1 cells grown on Labtech as described in the *Methods* section. CHO-K1 cells (A) and CHO-K1 expressing 3HA-oMT<sub>2</sub> receptor (B) were probed with mouse monoclonal Antibody HA directed against the N-terminal epitope tag present on recombinant receptor. Experiments were carried out with paraformaldehyde-fixed and non-permeabilized cells. The fluorescence images were obtained by using Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody. CHO-K1 cell nuclei were stained with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole. CHO-K1 cells transfected with the vector alone were used as a negative control (A). Magnification is 800 $\times$ . Each picture is representative of five independent experiments.

dependent on the G protein subtype involved in the cascade (see Verdonk *et al.*, 2006 for examples and theory). Typical G<sub>i</sub> coupling kinetic upon stimulation of CHO-K1/3HA-oMT<sub>2</sub> cells by melatonin were obtained, corroborating that the ovine MT<sub>2</sub> receptor is G<sub>i</sub>-coupled (not shown). The EC<sub>50</sub> value of melatonin in this system is 0.13 nM, in agreement with the high, sub-nanomolar affinity of melatonin for its receptors. In addition, after a 24 h treatment of cells with *Pertussis* toxin, a G<sub>i</sub> protein inhibitor, the melatonin response was abolished (Figure 6A). Similar results were obtained with the human (Figure 6B, melatonin EC<sub>50</sub> = 0.43 nM) and rat (Figure 6C, melatonin EC<sub>50</sub> = 0.11 nM) MT<sub>2</sub> receptors, adding to the evidence that the ovine MT<sub>2</sub> receptor is mainly coupled to G<sub>i</sub> proteins when expressed in CHO-K1 cells, because no G<sub>s</sub> nor G<sub>q</sub> signals were detected in these functional studies.

#### *Distribution of mRNA for ovine MT<sub>2</sub> receptors*

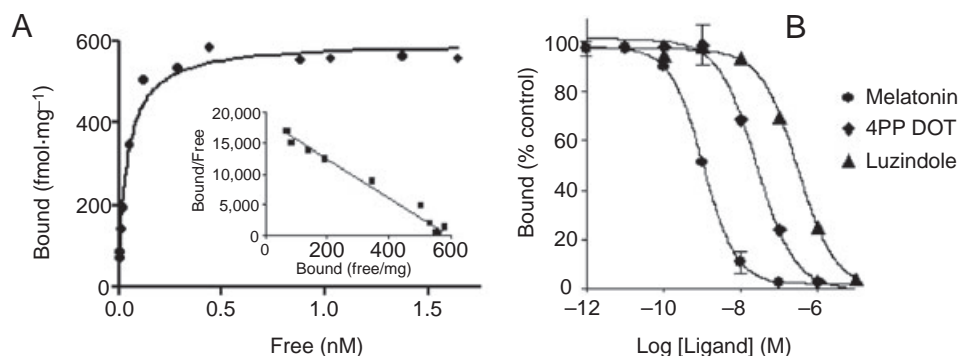
The tissue expressions of MT<sub>2</sub> and MT<sub>1</sub> mRNAs in different regions of sheep brain were studied using highly stringent RT-PCR conditions as those used for the cloning of ovine MT<sub>2</sub> receptor cDNA. The low abundance of MT<sub>2</sub> receptors in brain

tissue necessitated performing RT-PCR reaction with at least 30 cycles. The lengths of amplified DNA fragments were consistent with those expected from the structure of the MT<sub>2</sub> mRNA species. The specificity of PCR products was assessed by cloning and sequencing each amplified DNA. No signal was observed when either the mRNA or the reverse transcriptase was omitted from the first-strand cDNA conversion, which suggests that the signals observed were not due to any contaminating genomic DNA. A quantitative control (GAPDH) confirmed that each sample contained similar amounts of total cDNA (Figure 7). The ovine MT<sub>2</sub> receptor mRNA was expressed in pars tuberalis, choroid plexus and retina, moderately in mammillary bodies and poorly in hippocampus, premammillary hypothalamus, caudate nucleus and pineal gland (Figure 7). The ovine MT<sub>1</sub> receptor mRNA was strongly expressed in pars tuberalis and pineal gland and moderately in choroid plexus, premammillary hypothalamus and mammillary bodies. It is important to observe that the mRNAs for MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptor were co-expressed in all analysed brain tissues. However, this non-quantitative study suggests that the expression level ratio of the two mRNA may be not identical in all brain regions. We extended our investigations to three regions of the brain, namely *pars tuberalis*, premammillary hypothalamus and mammillary bodies, sampled at six time points during the night and day periods, by using a real-time PCR approach. The results clearly showed that the total amount of ovine MT<sub>2</sub> mRNA is extremely low, especially when compared with that for the ovine MT<sub>1</sub> receptor (Figure 8). Overall, the ratio between ovine MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> mRNAs was at least 600-fold, depending on the brain region and the time of the day. Both populations of mRNA varied with the period of the day and night, in a similar fashion in mammillary bodies, and differently in *pars tuberalis* and premammillary hypothalamus (Figure 8).

Two expression peaks of ovine MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptor mRNA were observed at ZT 6 and ZT 18 in mammillary bodies. Similarly, two expression peaks of ovine MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> mRNA were observed in premammillary hypothalamus, but the second peaks were not coincident for the two mRNAs (at ZT 14 for MT<sub>2</sub> mRNA and ZT 16 for MT<sub>1</sub> mRNA). In *pars tuberalis*, the levels of ovine MT<sub>2</sub> mRNA were stable except for a marked fall at ZT 18, whereas for the ovine MT<sub>1</sub> mRNA, levels were maximal at ZT 2 and minimal at ZT 10.

## Discussion

Because it is scarcely possible to differentiate MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors pharmacologically and no laboratory had so far isolated a full-length mRNA coding for functional ovine MT<sub>2</sub> receptors (Drew *et al.*, 1998; Migaud *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2007), it was suggested that ovine *MTNR1B* gene had evolved into a pseudogene that produced no mRNA (Barrett *et al.*, 2003). This hypothesis was also partially based on the previous identification of two stop codons in the coding region of the MT<sub>2</sub> mRNA of the Siberian hamster, impairing any expression of MT<sub>2</sub> receptors in this species (Weaver and Reppert, 1996). Recently, the presence in the sheep genome of an orthologous gene of the human *MTNR1B* gene was confirmed by Xiao *et al.* (2007). However, these authors did not amplify ovine MT<sub>2</sub>



**Figure 4** Binding characteristics of ovine MT<sub>2</sub> receptor expressed in CHO-K1 cells. Saturation binding experiments with [<sup>125</sup>I]-2-iodomelatonin (A). Specific binding is represented as a direct plot (main graph) and as a Scatchard plot of the specific binding (inset). Competition binding experiments against [<sup>125</sup>I]-2-iodomelatonin (B). Ligands evaluated are melatonin, 4-phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT) and luzindole. Points shown are from representative experiments performed in triplicates and repeated four times.

**Table 2** Binding affinities (pK<sub>i</sub>) of reference ligands to hMT<sub>2</sub>, rMT<sub>2</sub>, oMT<sub>2</sub> and oMT<sub>1</sub> receptors

	hMT <sub>2</sub>	rMT <sub>2</sub>	oMT <sub>2</sub>	oMT <sub>1</sub>
Melatonin	9.46 ± 0.05	9.11 ± 0.36	9.16 ± 0.15	9.74 ± 1.44
4-phenyl-2-propionamidotetralin	8.96 ± 0.19	7.44 ± 0.11	7.77 ± 0.20	6.85 ± 0.66
Luzindole	7.57 ± 0.02	6.47 ± 0.66	6.67 ± 0.28	6.80 ± 0.35

Binding competition studies were performed using [<sup>125</sup>I]-2-iodomelatonin and a concentration range of each compound. Values of pK<sub>i</sub> were calculated from the IC<sub>50</sub> values using the method of Cheng and Prusoff (1973). Concentration–response curves were analysed by non-linear regression. Binding affinities (nM) are expressed as mean pK<sub>i</sub> ± SEM of at least three independent experiments.

**Table 3** Compound potency and efficacy as agonist or antagonist, on [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding at human, rat and ovine (hMT<sub>2</sub>, rMT<sub>2</sub> and oMT<sub>2</sub>) melatonin receptors

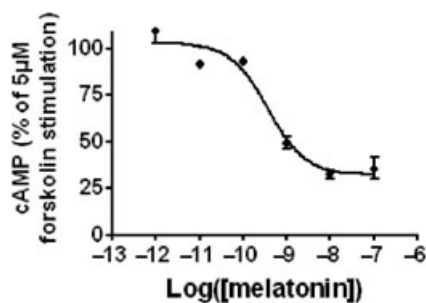
	MT <sub>2</sub> receptor agonist EC <sub>50</sub> (E <sub>max</sub> ) nM	MT <sub>2</sub> receptor antagonist K <sub>b</sub> (I <sub>max</sub> ) nM
Melatonin	(h) 0.36 ± 0.06 (100) (r) 0.9 ± 0.01 (100) (o) 1.37 ± 0.17 (100)	nd nd nd
4-phenyl-2-propionamidotetralin	(h) 1.28 ± 0.08 (28) (r) Inactive (<10) (o) Inactive (<10)	(h) 1.47 ± 0.14 (53) (r) 19.9 ± 5 (90) (o) 36.2 ± 1.7 (80)
Luzindole	(h) Inactive (<10) (r) Inactive (<10) (o) Inactive (<10)	(h) 16.4 ± 5.4 (85) (r) 284 ± 102 (99) (o) 393 ± 123 (104)

Agonist and antagonist activities of the compounds were evaluated using a [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay. Concentration–response curves were analysed by non-linear regression. Agonist potency was expressed as EC<sub>50</sub> ± SEM (nM) while the maximal efficacy, E<sub>max</sub> ± SEM, was expressed as a percentage of that observed with melatonin 1 μM (=100%). Antagonist potency to inhibit the effect of melatonin (3 nM) was expressed as K<sub>b</sub> ± SEM while the maximal inhibition I<sub>max</sub> ± SEM was expressed as a percentage of that observed with melatonin 3 nM (=100%). Data are mean of at least four independent experiments. Inactive, no dose–response effect. nd, not determined.

mRNA and did not demonstrate the existence of any MT<sub>2</sub> receptor mRNA in this species. Altogether, these observations led us to test the hypothesis that a technical difficulty had impeded the amplification of ovine MT<sub>2</sub> receptor mRNA, that is, a high percentage of GC in ovine MT<sub>2</sub> mRNA. Indeed, the published mRNA sequence for bovine MT<sub>2</sub> receptors (XM\_607095) contains 66% of GC, which is higher than MT<sub>2</sub> mRNA sequences from rat/mouse (55% GC) or human (60% GC). The search for MT<sub>2</sub> mRNA was performed in sheep retina as Reppert *et al.* (1995) had demonstrated in humans, using RT-PCR and binding assay, that the MT<sub>2</sub> receptor is highly expressed in this tissue. This observation has been confirmed in numerous species (Alarma-Estrany and Pintor, 2007). The

amplification from sheep retina of an mRNA corresponding to an MT<sub>2</sub> receptor that exhibited high percentage of GC (67%), confirmed our starting hypothesis. The cDNA isolated from sheep retina does not contain the two nonsense mutations described in the Siberian hamster MT<sub>2</sub> receptor at positions 1062 [TAC (Tyr) vs. TAA (Stop)] and 1177–1179 [CAC (His) vs. TGA (Stop)] (Weaver *et al.*, 1996). This cDNA led to the expression of a 376-amino-acid protein that has 95%, 73%, 72%, 68%, 67% and 58% identity with cattle, human, chimpanzee, mouse and rat MT<sub>2</sub> receptor mRNAs respectively. As for all the other mammalian MT<sub>2</sub> receptors (Audinot *et al.*, 2003; 2008; Mailliet *et al.*, 2004), the ovine MT<sub>2</sub> receptor presents a strong affinity for 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin (pK<sub>D</sub> = 10.39 ± 0.10).

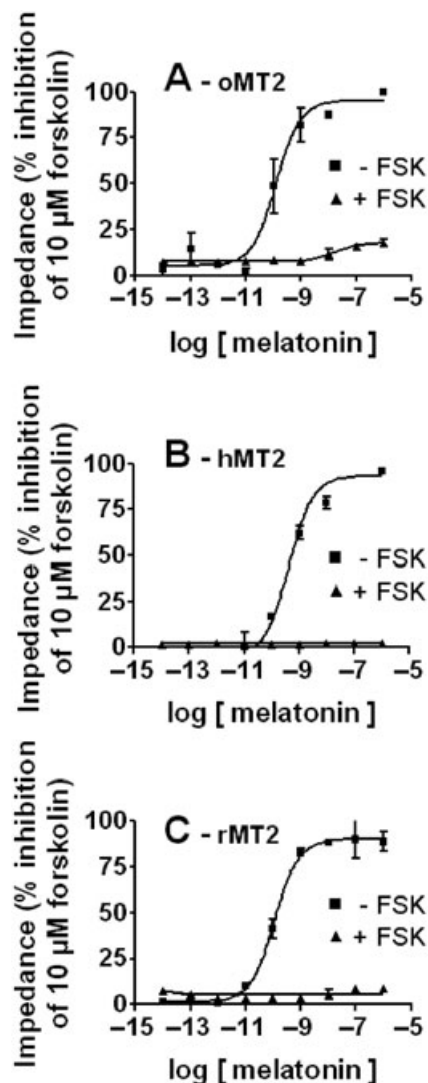




**Figure 5** Modulation of forskolin-stimulated cAMP accumulation by the 3HA-tagged ovine MT<sub>2</sub> receptor in CHO-K1 cells. CHO-K1 cells stably transfected with ovine MT<sub>2</sub> receptor cDNA were stimulated with forskolin (5 µM) in the presence of the indicated concentrations of melatonin. Intra-cellular cAMP levels were determined as described in the *Methods* section. Data represent the means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate and repeated three times. Data are expressed as per cent of mean forskolin-stimulated value (100%). The potency of melatonin in this assay was  $0.81 \pm 0.62$  nM. Control native CHO-K1 cells did not respond to melatonin in this assay (not represented).

Furthermore, the pharmacological profile of the ovine MT<sub>2</sub> receptor is similar to MT<sub>2</sub> receptors of other species: melatonin > 4P-PDOT > luzindole. The affinity of this receptor for its natural agonist, melatonin, was 24- and 300-fold stronger than for the reference antagonists 4P-PDOT and luzindole respectively. Although the primary sequence of the ovine MT<sub>2</sub> receptor exhibits a higher identity with the human receptor (73%) than for the rat receptor (58%), the pharmacology of ovine MT<sub>2</sub> receptors is closer to the rat than to the human receptors.

The two antagonists 4P-PDOT and luzindole were less selective for ovine and rat MT<sub>2</sub> receptors ( $pK_i$  values were  $7.77 \pm 0.20$  and  $6.67 \pm 0.28$  for sheep,  $7.44 \pm 0.11$  and  $6.47 \pm 0.66$  for rat) than for the human MT<sub>2</sub> receptor ( $pK_i$  values  $8.96 \pm 0.19$  and  $7.57 \pm 0.02$ ). To explain this paradox, we searched for all the common amino acids between rat and ovine MT<sub>2</sub> and different from human MT<sub>2</sub> receptors: P2S (amino-terminal end), L91F (transmembrane (TM) domain II), H103Y (external loop 1) T147A, Y152C (internal loop 2), Y160H, L169V (TMIV), A236P, K239R, R241C (internal loop 3), E278Q (external loop 3), F295L (TMVII) and R331H (carboxy-terminal end). Only the residue 295 is close to the putative antagonist binding domain of the MT<sub>2</sub> receptor (Grol and Jansen, 1996) and can interfere with 4P-PDOT and luzindole binding. This residue is also essential for the binding of 2-iodo-melatonin to human MT<sub>2</sub> receptors (Mazna *et al.*, 2005). The Leu<sup>295</sup> residue described as essential for the binding of 2-iodomelatonin in the human MT<sub>2</sub> receptor is replaced by a phenylalanine residue in all other MT<sub>2</sub> receptor sequences. It is important to note that the MT<sub>1</sub> receptor, which also binds 2-iodomelatonin, presents a tyrosine residue at the same position, 7.40 (Tyr<sup>282</sup> for human MT<sub>1</sub>), using the nomenclature of Baldwin *et al.* (1997). In this nomenclature, the residues of the TM domain, which are conserved in all GPCRs and are essential for structural conservation of GPCRs, have a specific position corresponding to the number of TM, following the number 50. The positions of other residues are determined following the position of the conserved residues (Reppert *et al.*, 1994). These results suggest that the phenyl substituent

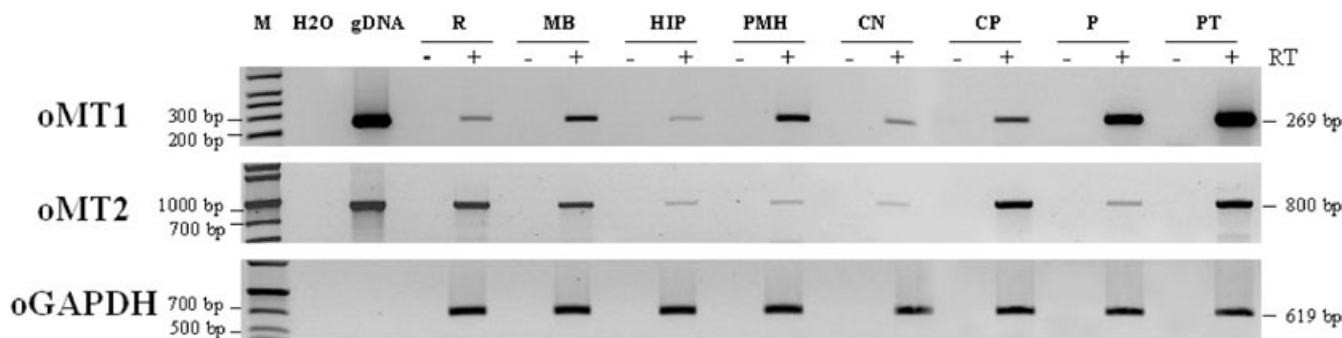


**Figure 6** Subtype of G protein coupling of ovine MT<sub>2</sub> receptor. Cellular dielectric spectroscopy of CHO-K1/3HA-oMT<sub>2</sub> cells stimulated by melatonin showed a direct increase in impedance, typical of a G<sub>i</sub> coupling [see Verdonk *et al.* (2006) for theory and examples]. Melatonin stimulation of CHO-K1 cells expressing ovine MT<sub>2</sub> receptors (A) was compared with CHO-K1 cells expressing either human MT<sub>2</sub> (B) or rat MT<sub>2</sub> (C) receptors. A dose-response of melatonin was obtained alone or after pre-treatment of cells with *Pertussis* toxin.

in the luzindole and 4P-PDOT antagonist molecules could interact with residues towards the TMVII, where the amino acid 295 is located, yielding a variation in binding between rat/ovine and human receptors.

4P-PDOT and luzindole revealed no agonist activity at ovine MT<sub>2</sub> receptors, in line with the results obtained with rat MT<sub>2</sub> receptors (Audinot *et al.*, 2008). Hence, the behaviour of 4P-PDOT as a partial agonist on human MT<sub>2</sub> receptors seems to be a particular feature of this receptor (Table 3). This result is in accordance to previous studies (Browning *et al.*, 2000).

In contrast to all other melatonin receptors, the ovine MT<sub>2</sub> receptor possesses a DRY motif, not a NRY motif as reported in other species (MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> from human, monkey, rat, mouse) (Figure 2), just downstream from the third TM domain and an arginine residue (Arg<sup>246</sup>) at position 6.30



**Figure 7** Distribution of mRNA melatonin receptors MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> in sheep brain tissues. Animals were killed between 06:00 and 12:00 h (late night and morning). Total RNA (4 µg) of sheep retina (R), mammillary bodies (MB), hippocampus (HIP), premammillary hypothalamus (PMH), caudate nucleus (CN), choroid plexus (CP), pineal gland (P) and pars tuberalis (PT) was amplified by RT-PCR as described in the experimental section. After 35 PCR cycles for ovine MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors (oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub>) and 25 cycles for ovine GAPDH (oGAPDH), PCR products were analysed using a 2%w/v agarose gel stained with ethidium bromide. Control experiments without reverse transcriptase (–) revealed no product. The lengths of amplicons were estimated by molecular mass markers (Gel Pilot 1 kb Plus Ladder; M) and indicated in base pairs (bp) on the right. Each PCR product was purified and identified by sequencing on both strands. GAPDH amplification was used as an internal standard. Each picture is representative of three independent experiments.

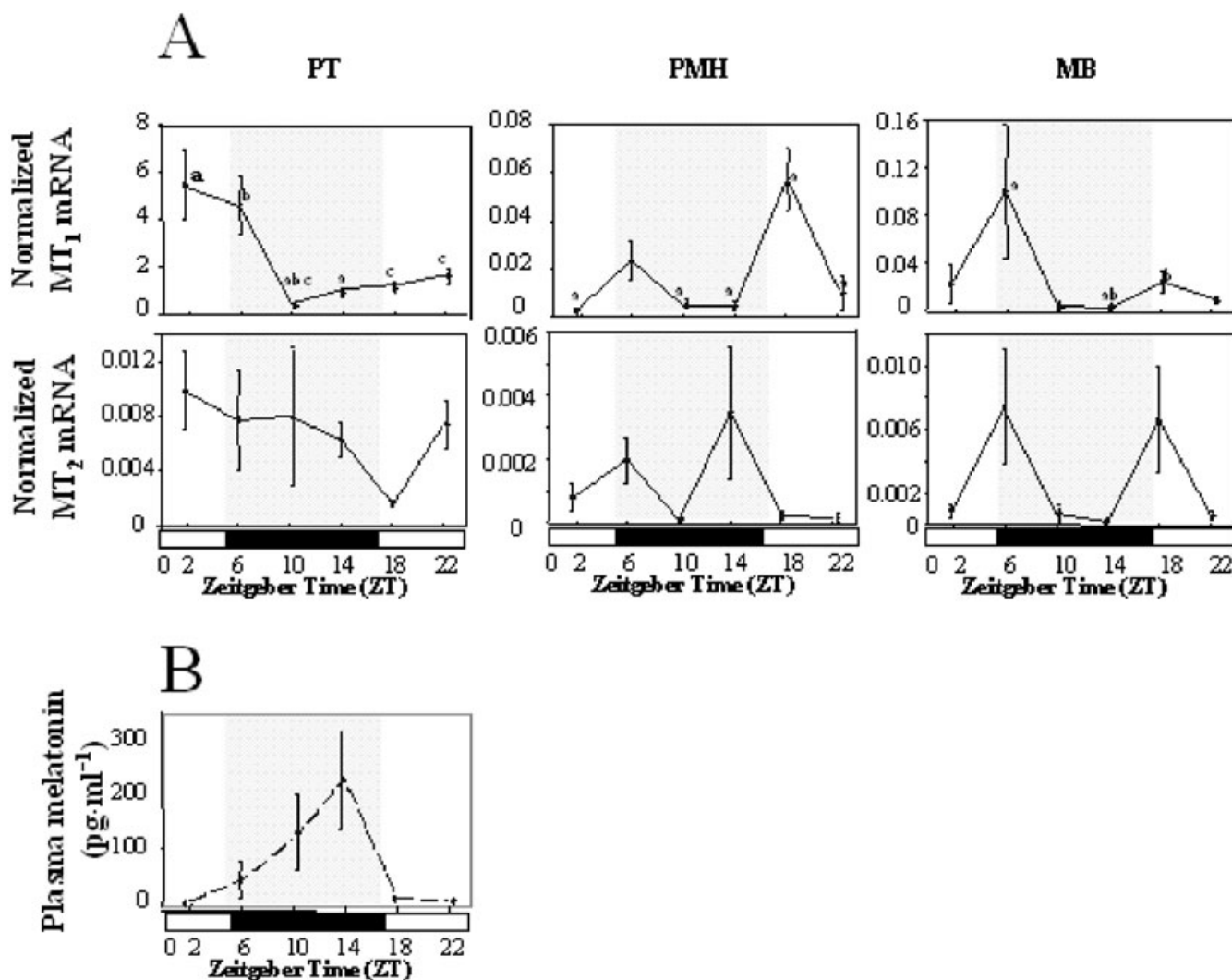
(Baldwin nomenclature). The inactive state of a GPCR receptor depends on the ionic lock between the residues R3.50 (Arg<sup>138</sup>), DRY motif of TMIII and D/E6.30 (near to the cytoplasmic end of TMVI) (Ballesteros *et al.*, 2001; Smit *et al.*, 2007). The charge-neutralizing mutation of residue 3.50 or 6.30 leads to a significant increase of constitutive activity. In ovine MT<sub>2</sub> receptors, the residues 3.50 and 6.30 are identical (Arg<sup>138</sup> and Arg<sup>246</sup> respectively) and thus present the same positive charge (Figure 2). This conflict induces a repulsion of the cytoplasmic ends of TMVI and TMIII and the destruction of the ionic lock. The repulsion of the cytoplasmic ends of TMVI and TMIII have been described in other receptors to be sufficient to cause constitutive receptor activation, consistent with an increased accessibility of the resulting open cytoplasmic face of the receptor structure to docking G proteins (Roka *et al.*, 1999; Parnot *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 2007). In human and rat MT<sub>2</sub> receptors, the residues 3.50 and 6.30 correspond to residues Arg<sup>138</sup> and Asp<sup>246</sup> respectively. Thus the ionic lock is preserved. Nelson *et al.* (2001) have demonstrated that the mutation of Asn<sup>124</sup> to an aspartic acid or glutamic acid residue significantly decreased the efficacy of melatonin for the inhibition of cAMP. N124D and E mutations in the MT<sub>1</sub> receptor also strongly compromised the efficacy and potency of melatonin for inhibition of K<sup>+</sup>-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> fluxes.

Our functional studies showed that ovine MT<sub>2</sub> receptors expressed in CHO-K1 cells were preferentially coupled to G<sub>i</sub> protein. In these cells, we have not observed the other signal transduction pathways, inhibition of guanylyl cyclase and phosphoinositide production, which have been described for MT<sub>2</sub> receptors (Boutin *et al.*, 2005). It would be important to check that the ovine MT<sub>2</sub> receptor is not coupled with other G proteins in brain tissues.

The tissue distribution of MT<sub>2</sub> receptors is poorly described, mainly due to the lack of specific radioligands and antibodies and to the low expression of the MT<sub>2</sub> mRNA (Dubocovich and Markowska, 2005; Pandi-Perumal *et al.*, 2008). So far, the various studies reported lead to the consensus observations that MT<sub>1</sub> receptors are detected in many brain areas and that MT<sub>2</sub> receptors are more restrictively expressed, confined to a few brain areas (Dubocovich and Markowska, 2005; Pandi-

Perumal *et al.*, 2008). As described in other species, our RT-PCR study in sheep brain showed that MT<sub>1</sub> receptor mRNA was expressed in all analysed brain tissues. However, strong expression of MT<sub>1</sub> mRNA was detected in pars tuberalis, pineal gland and premammillary hypothalamus. These results were in accordance with previous results obtained with various methods: *in situ* hybridization or binding on tissue slides in other species including sheep (Stankov *et al.*, 1991; Malpaux *et al.*, 1998; Musshoff *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2003; Migaud *et al.*, 2005; Savaskan *et al.*, 2005; Brunner *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). These results validate our RT-PCR protocol. Contrary to previous observation in other species, we have observed that MT<sub>2</sub> mRNA was, similarly to MT<sub>1</sub> mRNA, expressed in all analysed sheep brain tissues. These results can be explained by the use of strong stringent and specific RT-PCR protocol (high number of cycles, >35 and high temperatures, >42°C), which allowed the amplification of GC-rich mRNA. The mRNA for MT<sub>2</sub> receptors was strongly expressed in retina as observed in other species [human and rat (Reppert *et al.*, 1995; Savaskan *et al.*, 2002; Sallinen *et al.*, 2005)] and which confirmed our choice of the tissue to clone the MT<sub>2</sub> receptor cDNA. MT<sub>2</sub> mRNA was also expressed in choroid plexus, mammillary bodies and pars tuberalis. As described in human, rat and mouse hippocampus (Reppert *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005), the MT<sub>2</sub> mRNA was expressed at low level in this area of the sheep brain. This low expression level of MT<sub>2</sub> receptor mRNA cannot be associated with a low biological action of this receptor. In mouse hippocampus, where a very low expression of MT<sub>2</sub> mRNA is observed, the action of melatonin involved MT<sub>2</sub>, but not MT<sub>1</sub> receptors (Wang *et al.*, 2005).

The real-time quantitative RT-PCR demonstrated that ovine MT<sub>2</sub> mRNA expression level was much lower (15–500-fold) than ovine MT<sub>1</sub> mRNA expression in mammillary bodies, premammillary hypothalamus and pars tuberalis. Using real-time quantitative RT-PCR, Sallinen *et al.* (2005) have also observed a co-expression of rat MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> mRNA in all analysed rat brain and peripheral tissues and a higher rat MT<sub>1</sub> mRNA expression level compared with that for the receptor MT<sub>2</sub>.



**Figure 8** Circadian variation in expression of mRNA for MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors in sheep brain tissues. Light–dark variations in MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> mRNA expression in sheep brain tissues. Tissues and blood were collected at six time points of the day–night cycle (ZT 1.5, 6, 10.5, 13.5, 18 and 22.5 ( $n = 5$  structures per condition) and light–dark variations in MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> mRNA expression in the sheep pars tuberalis (PT), premammillary hypothalamus (PMH) and mammillary bodies (MB) were analysed. For each sample, the data were normalized to the median value for exogenous luciferase. The gene/luciferase values were then compared through ZT and genes within tissues. Normalized expression level of ovine MT<sub>1</sub>, ovine MT<sub>2</sub> mRNA (A) and plasma melatonin concentrations ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , B) were measured to estimate the daily changes in these parameters. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM and mean values with different letters are significantly different (ANOVA,  $P < 0.05$ ). Open bars and shaded areas as well as solid bars represent the light and the dark phases respectively.

The real-time PCR on sheep brain area confirmed the high level of expression of ovine MT<sub>1</sub> receptor transcripts in the pars tuberalis and we showed substantial levels of ovine MT<sub>2</sub> mRNA expression in this structure. We showed daily variations of ovine MT<sub>1</sub> mRNA expression under LD conditions, with significantly higher levels of expression during the daytime in the pars tuberalis and premammillary hypothalamus and during the early phase of the night-time in the mammillary bodies. Daytime increase in MT<sub>1</sub> mRNA levels was also reported in rodent ventral tegmental area, nucleus accumbens (Uz *et al.*, 2005) and hypothalamus (Sallinen *et al.*, 2005) using qPCR techniques. These data suggest a previously suspected down-regulation by melatonin of its receptor densities in these structures (Sallinen *et al.*, 2005). Our results showed that the MT<sub>2</sub> receptor mRNA is expressed in the hypothalamus in sheep, as in rodents (Sallinen *et al.*, 2005),

although at low levels. Such a low level of expression prevented any significant diurnal variations to be observed, although these levels were likely to be more elevated during the night-time. Ovine MT<sub>2</sub> mRNA was also expressed at low levels in the mammillary bodies, where no significant diurnal variations were obtained.

However, although being much less expressed than MT<sub>1</sub> receptors as demonstrated by this study, MT<sub>2</sub> receptors might also contribute to the melatonin responses in tissues in which they are expressed, as shown in mice carrying a targeted disruption of MT<sub>1</sub> receptors (Jin *et al.*, 2003).

The complexity of the mechanism regulating the melatonin receptor expression makes it almost impossible to compare different studies on tissue melatonin receptor expressions. Indeed, melatonin receptor mRNA level varies on a circadian basis with expression levels affected by light and melatonin

concentration in plasma. Moreover, melatonin down-regulates some of its receptor population (MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub>) (Sallinen *et al.*, 2005). The co-localization of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors in sheep brain tissues can perhaps favour the cross-regulation of these receptors. A cross-regulation between melatonin receptors has already been observed by Imbesi *et al.* (2008) in mouse cerebellar granule cells. In these cells, physiological concentrations (low nanomolar) of melatonin decreased the activity of extracellular signal-regulated kinase (ERK). Deficiencies of both MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors transformed the melatonin inhibition of ERK into a melatonin-induced ERK activation. Ayoub *et al.* (2004) have demonstrated that the MT<sub>2</sub> receptor was preferentially engaged in heterodimers with MT<sub>1</sub> receptors, rather than forming MT<sub>2</sub> receptor homodimers, in cells co-expressing both receptors. The same authors have observed that the pharmacological profiles of MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> receptor heterodimers were different from those of melatonin receptor homodimers.

In conclusion, our data demonstrated unambiguously the existence of a functional MT<sub>2</sub> receptor in sheep. The co-expression of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors in all analysed sheep brain tissues suggest a possible cross-regulation of both receptors. The melatonin regulation of seasonal breeding in sheep may be more complex than previously proposed, based solely on the MT<sub>1</sub> receptor. It remains to determine whether these two receptors are expressed in the same cells and whether they interact to mediate the effects of melatonin on reproduction. The biological role of the ovine MT<sub>2</sub> receptor remains also to be elucidated.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Aurélie Wiedemann for her help in confocal microscopy and the INRA UE-PAO unit for the supply of the animals. This work was fully funded by the Institut de Recherches SERVIER.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Alarma-Estrany P, Pintor J (2007). Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther* **113**: 507–522.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2008). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition (2008 revision). *Br J Pharmacol* **153**: S1–S209.
- Arendt J (2005). Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms* **20**: 291–303.
- Audinot V, Mailliet F, Lahaye C, Bonnaud A, Le Gall A, Amosse A *et al.* (2003). New selective ligands of human cloned melatonin MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**: 553–561.
- Audinot V, Bonnaud A, Grandcolas L, Rodriguez M, Nagel N, Galizzi JP *et al.* (2008). Molecular cloning and binding characteristics of rat melatonin MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. *Biochem Pharmacol* **75**: 2007–2015.
- Ayoub MA, Levoe A, Delagrangre P, Jockers R (2004). Preferential formation of MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT<sub>2</sub> homodimers. *Mol Pharmacol* **66**: 312–321.
- Baldwin JM, Schertlera GFX, Ungera VM (1997). An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol* **272**: 144–164.
- Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U *et al.* (2001). Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* **276**: 29171–29177.
- Barrett P, Conway S, Morgan PJ (2003). Digging deep-structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res* **35**: 221–230.
- Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangre P (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* **26**: 412–419.
- Browning C, Beresford I, Fraser N, Giles H (2000). Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol* **129**: 877–886.
- Brunner P, Sözer-Topcular N, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F *et al.* (2006). Pineal and cortical melatonin receptors MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> are decreased in Alzheimer's disease. *Eur J Histochem* **50**: 311–316.
- Cheng YC, Prusoff WH (1973). Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099–3108.
- Conway S, Canning SJ, Barrett P, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangre P, Morgan PJ (1997). The roles of valine 208 and histidine 211 in ligand binding and receptor function of the ovine Mel1a beta melatonin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 418–423.
- Conway S, Drew JE, Mowat ES, Barrett P, Delagrangre P, Morgan PJ (2000). Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor. *J Biol Chem* **275**: 20602–20609.
- Drew JE, Barrett P, Williams LM, Conway S, Morgan PJ (1998). The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. *J Neuroendocrinol* **10**: 651–661.
- Drew JE, Barrett P, Conway S, Delagrangre P, Morgan PJ (2002). Differential coupling of the extreme C-terminus of G protein alpha subunits to the G protein-coupled melatonin receptors. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 185–192.
- Dubocovich ML (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* **16**: 50–56.
- Dubocovich ML, Markowska M (2005). Functional MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> melatonin receptors in mammals. *Endocrine* **27**: 101–110.
- Gerdin MJ, Mseeh F, Dubocovich ML (2003). Mutagenesis studies of the human MT<sub>2</sub> melatonin receptor. *Biochem Pharmacol* **66**: 315–320.
- Grol CJ, Jansen JM (1996). The high affinity melatonin binding site probed with conformationally restricted ligands—II. Homology modeling of the receptor. *Bioorg Med Chem* **4**: 1333–1339.
- Imbesi M, Uz T, Dzitoyeva S, Giusti P, Manev H (2008). Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> melatonin receptors. *Brain Res* **1227**: 19–25.
- Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM *et al.* (2003). Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* **23**: 1054–1060.
- Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangre P (2008). Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* **154**: 1182–1195.
- Mailliet F, Audinot V, Malpoux B, Bonnaud A, Delagrangre P, Migaud M *et al.* (2004). Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. *Biochem Pharmacol* **67**: 667–677.

- Malpoux B (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Neil JD (ed.). *Knobil and Neil's Physiology of Reproduction*, 3rd edition. Academic Press Inc.: Burlington, MA, pp. 2231–2281.
- Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* **139**: 1508–1516.
- Mazna P, Berka K, Jelikova I, Balik A, Svoboda P, Obsilova V *et al.* (2005). Ligand binding to the human MT<sub>2</sub> melatonin receptor: the role of residues in transmembrane domains 3, 6, and 7. *Biochem Biophys Res Commun* **332**: 726–734.
- Migaud M, Daveau A, Malpoux B (2005). MTNR1A melatonin receptors in the ovine premammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. *Biol Reprod* **72**: 393–398.
- Morgan PJ, Davidson G, Lawson W, Barrett P (1990). Both pertussis toxin-sensitive and insensitive G proteins link melatonin receptor to inhibition of adenylyl cyclase in the ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* **2**: 773–776.
- Mseeh F, Gerdin MJ, Dubocovich ML (2002). Identification of cysteines involved in ligand binding to the human melatonin MT<sub>2</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* **449**: 29–38.
- Musshoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ (2002). Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus* **12**: 165–173.
- Nelson CS, Ikeda M, Gompf HS, Robinson ML, Fuchs NK, Yoshioka T *et al.* (2001). Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagine-124. *Mol Endocrinol* **15**: 1306–1317.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F *et al.* (2000). Identification of the melatonin-binding site MT<sub>3</sub> as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* **275**: 31311–31317.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N *et al.* (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* **85**: 335–353.
- Parnot C, Miserey-Lenkei S, Bardin S, Corvol P, Clauser E (2002). Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* **13**: 336–343.
- Pelletier J, Bodin L, Hanocq E, Malpoux B, Teyssier J, Thimonier J *et al.* (2000). Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel<sub>1a</sub> receptor in the ewe. *Biol Reprod* **62**: 1096–1101.
- Peters MF, Knappenberger KS, Wilkins D, Sygowski LA, Lazor LA, Liu J *et al.* (2007). Evaluation of cellular dielectric spectroscopy, a whole-cell, label-free technology for drug discovery on Gi-coupled GPCRs. *J Biomol Screen* **12**: 312–319.
- Poirel VJ, Cailotto C, Streicher D, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F (2003). MT<sub>1</sub> melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuro Endocrinol Lett* **24**: 33–38.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* **13**: 1177–1185.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel<sub>1b</sub> melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8734–8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF (1996). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett* **386**: 219–224.
- Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert SM (1996). Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel<sub>1a</sub> melatonin receptor. *Endocrinology* **137**: 3469–3477.
- Roka F, Brydon L, Waldhoer M, Strosberg AD, Freissmuth M, Jockers R *et al.* (1999). Tight association of the human Mel<sub>1a</sub>-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol* **56**: 1014–1024.
- Sallinen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppäluoto J (2005). The expression of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci* **76**: 1123–1134.
- Savaskan E, Wirz-Justice A, Olivieri G, Pache M, Kräuchi K, Brydon L *et al.* (2002). Distribution of melatonin MT<sub>1</sub> receptor immunoreactivity in human retina. *J Histochem Cytochem* **50**: 519–526.
- Savaskan E, Ayoub MA, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Meier F *et al.* (2005). Reduced hippocampal MT<sub>2</sub> melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res* **38**: 10–16.
- Smit MJ, Vischer HF, Bakker RA, Jongejan A, Timmerman H, Pardo L *et al.* (2007). Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 53–87.
- Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Capsoni S, Fauteck J, Fumagalli P (1991). Localization and characterization of melatonin binding sites in the brain of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) by autoradiography and in vitro ligand-receptor binding. *Neurosci Lett* **133**: 68–72.
- Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y *et al.* (2005). The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT<sub>1</sub> in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res* **136**: 45–53.
- Verdonk E, Johnson K, McGuinness R, Leung G, Chen YW, Tang HR *et al.* (2006). Cellular dielectric spectroscopy: a label-free comprehensive platform for functional evaluation of endogenous receptors. *Assay Drug Dev Technol* **4**: 609–619.
- Wan Q, Man HY, Liu F, Braunton J, Niznik HB, Pang SF *et al.* (1999). Differential modulation of GABA<sub>A</sub> receptor function by Mel<sub>1a</sub> and Mel<sub>1b</sub> receptors. *Nat Neurosci* **2**: 401–403.
- Wang LM, Suthana NA, Chaudhury D, Weaver DR, Colwell CS (2005). Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci* **22**: 2231–2237.
- Weaver DR, Reppert SM (1996). The Mel<sub>1a</sub> melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* **8**: 109–112.
- Weaver DR, Liu C, Reppert SM (1996). Nature's knockout: the Mel<sub>1b</sub> receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* **10**: 1478–1487.
- Wu YH, Zhou JN, Balesar R, Unmehopa U, Bao A, Jockers R *et al.* (2006). Distribution of MT<sub>1</sub> melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: colocalization of MT<sub>1</sub> with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *J Comp Neurol* **499**: 897–910.
- Xiao CT, Chu MX, Fu Y, Fang L, Ye SC (2007). Analysis of polymorphism, structure and function of exon 2 of ovine melatonin receptor 1b gene: a clue as to why it lacks expression in sheep. *J Pineal Res* **42**: 97–104.



# Résultats

Mon implication dans ces travaux concerne la caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur  $\text{oMT}_2$ . Mon intérêt s'est porté sur l'étude du comportement de trois molécules de référence sur le récepteur  $\text{oMT}_2$  ainsi que sur la nature du couplage impliqué dans la transduction du signal mélatoninergique.

## 1. Caractérisation pharmacologique du récepteur $\text{oMT}_2$

L'activité de trois molécules de référence des récepteurs  $\text{MT}_2$  (mélatonine, 4P-PDOT (4-phenyl-2-propionamidotétralin) et luzindole) est mesurée par un test de liaison du  $[^{35}\text{S}]$ -GTP $\gamma$ S. Ce test permet d'évaluer la capacité des molécules testées à activer les protéines G couplées au récepteur. La valeur de l' $\text{EC}_{50}$  de la mélatonine pour le récepteur  $\text{oMT}_2$  est comparable à celles des  $\text{EC}_{50}$  des récepteurs  $\text{MT}_2$  humain et de rat (Table 3). La mélatonine a un effet agoniste sur le récepteur  $\text{oMT}_2$  comme sur les récepteurs des deux autres espèces. Le 4P-PDOT et le luzindole ne se comportent pas comme des agonistes sur le récepteur  $\text{oMT}_2$ . Il faut noter que le 4P-PDOT possède une composante d'agoniste partiel uniquement pour le récepteur humain, avec une valeur d' $\text{E}_{\text{max}}$  de l'ordre de 30% (Table 3). Le 4P-PDOT et le luzindole se comportent comme des antagonistes pour les récepteurs humains, de rat et ovin. Le 4P-PDOT semble être un antagoniste partiel pour le récepteur  $\text{hMT}_2$ . Ces résultats indiquent que, suite à une stimulation mélatoninergique, un couplage fonctionnel s'effectue entre une protéine G et le récepteur  $\text{oMT}_2$  exprimé de façon stable dans la lignée CHO-K1.

## 2. Nature de la protéine G impliquée dans le couplage

Il est établi que les récepteurs  $\text{hMT}_2$  et  $\text{rMT}_2$  sont couplés à une protéine G de type inhibitrice,  $\text{Gi}$  (Masana and Dubocovich, 2001). Afin d'identifier quel(s) sous-type(s) de protéine G est (sont) couplé(s) au récepteur  $\text{oMT}_2$ , un dosage de l'AMPc a été réalisé. L'incubation des CHO- $\text{oMT}_2$  avec 5  $\mu\text{M}$  de forskoline, activateur de l'adénylate cyclase, induit une augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc. Cette augmentation est diminuée de façon dose-dépendante par la mélatonine, avec une valeur d' $\text{IC}_{50}$  de 0.81





$\pm 0.62$  nM (Figure 5). La mélatonine est capable d'induire une inhibition de la production d'AMPC de l'ordre de 80% (Figure 5). La valeur d'IC<sub>50</sub> est comparable à celle obtenue pour les récepteurs hMT<sub>2</sub> et rMT<sub>2</sub>. La mélatonine seule, c'est-à-dire sans pré-traitement avec la forskoline, n'induit pas d'inhibition de la production d'AMPC. Ces résultats montrent que comme les récepteurs MT<sub>2</sub> humains et de rat, le récepteur oMT<sub>2</sub> est couplé à une protéine Gi, capable d'inhiber l'activité de l'adénylate cyclase et par conséquent la production d'AMPC à partir d'ATP.

L'approche par spectroscopie diélectrique cellulaire permet d'identifier s'il existe un couplage avec d'autres sous-types de protéines G. Un signal spécifique du couplage avec une protéine Gi est obtenu sur les CHO-oMT<sub>2</sub> stimulées avec de la mélatonine. La puissance du signal est augmentée de façon dose-dépendante par des concentrations croissantes de mélatonine. Ces données corroborent les résultats précédents, indiquant l'existence d'un couplage avec une protéine Gi. Avec cette approche, la valeur de l'EC<sub>50</sub> de la mélatonine pour le récepteur oMT<sub>2</sub> est de 0,13 nM. Concernant les récepteurs humains et de rat, les valeurs d'EC<sub>50</sub> de la mélatonine sont de 0.43 nM et 0.11 nM, respectivement. Ces valeurs sub-nanomolaires reflètent la forte affinité des récepteurs MT pour leur agoniste de référence. De plus, les cellules ayant subi un traitement pendant une nuit (environ 12h) avec la PTX, toxine *pertussis* (inhibiteur spécifique des protéines Gi), ne présentent pas de signal spécifique de type Gi. Cette ultime expérimentation confirme que le récepteur oMT<sub>2</sub> exprimé de façon stable dans la lignée cellulaire CHO-K1 est couplé principalement avec des protéines de type Gi. En effet, aucun signal spécifique des protéines Gs ou Gq n'a été enregistré.



# Discussion

## 1. Difficulté du clonage du récepteur oMT<sub>2</sub>

Le clonage du récepteur oMT<sub>2</sub> a fait l'objet de multiples échecs dans plusieurs laboratoires aboutissant à faire douter de son existence (Drew et al., 1998; Migaud et al., 2005; Xiao et al., 2007). Il a même été imaginé que le gène MTNR1B ovin avait évolué en pseudogène au cours de l'évolution. Cette hypothèse était corroborée par l'existence de deux codons stop dans la séquence codante du récepteur MT<sub>2</sub> chez le hamster sibérien, aboutissant à une absence d'expression de ce récepteur dans cette espèce (Weaver et al., 1996). Cette hypothèse a finalement pu être rejetée par la découverte dans le génome de mouton de gène orthologue du MTNR1B (Xiao et al., 2007). L'identification du récepteur MT<sub>2</sub> est demeurée laborieuse pour deux raisons. D'une part, son niveau d'expression est très faible. Cette limite a pu être contournée par l'utilisation de la rétine qui, chez les ovins, comme dans les autres espèces, s'avère être un tissu relativement riche en récepteur MT<sub>2</sub> (Alarma-Estrany and Pintor, 2007) ainsi que des études d'autoradiographie le montrent (communication personnelle, Celine Legros). Comme chez les bovins, ce tissu a donc été utilisé pour l'extraction des ADNc. D'autre part, l'amplification des ARNm est rendue difficile à cause du fort pourcentage de liaison GC dans la séquence des ARNm codant pour le récepteur oMT<sub>2</sub>. En effet, après clonage, il s'avère que le récepteur MT<sub>2</sub> présente 67% de liaison GC chez le mouton contre 55 et 60% chez le rat et l'homme, respectivement. Ces deux caractéristiques de l'ARNm codant pour le récepteur oMT<sub>2</sub> ont poussé notre équipe à mettre au point des conditions de RT-PCR très particulières, avec notamment un nombre de cycles supérieur à 35 et une température supérieure à 42°C.

L'ADNc codant pour le récepteur oMT<sub>2</sub> aboutit à une protéine fonctionnelle ayant une forte homologie de séquence avec les autres espèces (95%, 73%, 72%, 68%, 67% et 58% d'identité avec le bovin, l'homme, le chimpanzé, la souris et le rat, respectivement). L'identification d'un récepteur MT<sub>2</sub> fonctionnel chez le mouton permet d'imaginer un nouvel impact de la mélatonine sur la physiologie de cette espèce. L'espèce ovine est en effet un excellent modèle pour les études *in vivo* des effets de la mélatonine, puisque



cette espèce est très proche de l'homme en termes de comportement vis-à-vis des transitions jour/nuit à l'opposé de la plupart des rongeurs. La découverte du récepteur oMT<sub>2</sub> est donc d'une grande importance pour la compréhension des effets physiologiques de la mélatonine.

## 2. Densité relative du récepteur oMT<sub>2</sub>

Dans la littérature, la distribution des récepteurs MT<sub>2</sub> est peu décrite à cause, d'une part, de l'absence de radioligands et d'anticorps spécifiques et, à cause, d'autre part, du faible niveau d'expression de ces récepteurs. Plusieurs approches expérimentales (hybridation in-situ, liaison sur coupes et RT-PCR en temps réel) indiquent que les récepteurs MT<sub>1</sub> sont exprimés dans l'ensemble du cerveau avec une forte expression dans la *pars tuberalis*, la glande pinéale et l'hypothalamus pré-mammillaire (Malpaux et al., 1998; Stankov et al., 1991; Wu et al., 2006). Le récepteur oMT<sub>2</sub> semble être également exprimé dans l'ensemble du cerveau de mouton, avec un niveau d'expression significatif dans la *pars tuberalis*, les corps mamillaires et les plexus choroïdes. Comme dans l'hippocampe humain, de rat ou de souris, MT<sub>2</sub> est exprimé faiblement dans cette région cérébrale chez le mouton. Dans l'hippocampe de souris, l'action de la mélatonine implique principalement les récepteurs MT<sub>2</sub> et non les récepteurs MT<sub>1</sub> (Wang et al., 2005) même si le niveau d'expression du récepteur MT<sub>2</sub> est très faible. Dans de nombreuses espèces, la densité des récepteurs MT<sub>1</sub> est plus importante que celle des récepteurs MT<sub>2</sub>. Cette observation est vraie également pour l'espèce ovine. Ce faible niveau d'expression des récepteurs oMT<sub>2</sub> ne doit pas conduire à la conclusion d'une faible activité biologique.

Ces analyses de distribution des récepteurs oMT montrent que les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> sont co-exprimés notamment dans la rétine, les corps mamillaires, les plexus choroïdes et la *pars tuberalis*. Des phénomènes d'hétérodimérisation entre les récepteurs humains MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> ont été décrits dans des systèmes cellulaires dans lesquels ceux-ci étaient sur-exprimés (Ayoub et al., 2002). Même si *in vivo* l'hétérodimérisation des récepteurs MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> n'est pas établie, l'expression des deux sous-types de récepteurs dans les mêmes structures laisse à penser que ce mécanisme peut exister. D'une part, le récepteur hMT<sub>2</sub> s'impliquerait préférentiellement dans ces phénomènes de dimérisation (Ayoub et al., 2004). D'autre part, la pharmacologie des



hétérodimères MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> serait différente de celle des récepteurs seuls. Ces deux points peuvent également expliquer la difficulté passée à identifier le récepteur oMT<sub>2</sub>.

Des variations d'expression des récepteurs oMT<sub>1</sub>, mais pas des récepteurs oMT<sub>2</sub>, au moment des transitions jour/nuit et nuit/jour sont mesurables dans la *pars tuberalis*, l'hypothalamus prémammillaire et les corps mammillaires. Le niveau d'expression de oMT<sub>1</sub> semble être significativement plus important pendant la journée dans la *pars tuberalis* et dans l'hypothalamus prémammillaire, et en début de nuit dans les corps mammillaires. Dans certaines structures cérébrales de rat, les récepteurs MT<sub>1</sub> suivent ce profil d'expression. Ceci laisse imaginer la mise en place d'une régulation négative de l'expression des récepteurs MT par la mélatonine dans ces structures. Par ailleurs, la mélatonine circulante module le niveau d'expression de ses propres récepteurs (Sallinen et al., 2005). Le récepteur oMT<sub>2</sub> ne présente pas de variations d'expression au cours de la journée. Peut-être ne sommes-nous pas capable de détecter ces éventuelles variations compte-tenu du très faible niveau d'expression de ces récepteurs. Alternativement, la mélatonine régulerait plus rigoureusement le niveau d'expression des récepteurs MT<sub>2</sub> que celui des récepteurs MT<sub>1</sub>. Ce phénomène est décrit dans une population cellulaire particulière du cervelet de souris (Imbesi et al., 2008).

### 3. Caractérisation pharmacologique du récepteur oMT<sub>2</sub>

L'affinité des récepteurs oMT<sub>2</sub> pour la 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-mélatonine est très forte, comme c'est le cas pour les autres récepteurs MT de mammifères (Audinot et al., 2008). Trois molécules servent de référence lors de l'étude des récepteurs MT : la mélatonine, le 4P-PDOT et le luzindole. Le profil pharmacologique du récepteur oMT<sub>2</sub> pour ces molécules de référence est similaire à celui des récepteurs MT<sub>2</sub> humain et de rat. La mélatonine est un agoniste alors que le 4P-PDOT et le luzindole sont des antagonistes (Boutin et al., 2005). Toutefois des différences d'affinité entre les récepteurs pour le 4P-PDOT et le luzindole existent. Celles-ci s'expliqueraient par l'interaction du 4P-PDOT et du luzindole avec les récepteurs MT<sub>2</sub> ovins et de rat rendue difficile par la nature d'un acide aminé du 7<sup>ème</sup> domaine transmembranaire (TM7). Cette phénylalanine (en position 295) n'interfère pas avec la liaison du 4P-PDOT et du luzindole dans un modèle du récepteur humain MT<sub>2</sub>.





Il a été mis en évidence que le récepteur oMT<sub>2</sub> était couplé à une protéine Gi, comme les autres récepteurs de mammifères. D'autres couplages secondaires avec des protéines Gs ou Gq n'ont pas été mis en évidence dans notre approche. Pourtant d'autres voies de signalisation aboutissant à l'inhibition de la guanylyl cyclase ou à la production d'inositol triphosphate sont décrites pour les récepteurs MT<sub>2</sub> (Boutin et al., 2005).

En résumé, nos études montrent que la pharmacologie du récepteur oMT<sub>2</sub> ressemble à celle des récepteurs MT<sub>2</sub> des autres espèces. Le récepteur oMT<sub>2</sub> présente toutefois une particularité par rapport aux autres récepteurs MT<sub>2</sub>. En effet, même à des concentrations très importantes de mélatonine (10<sup>-7</sup> M), la production d'AMPc est inhibée que partiellement dans les cellules CHO-K1-oMT<sub>2</sub> (figure 5). L'effet agoniste de la mélatonine n'est donc pas total ce qui suggère que le récepteur oMT<sub>2</sub> présenterait une activité constitutive.

#### 4. Activité constitutive du récepteur oMT<sub>2</sub>

L'hypothèse d'une activité constitutive du récepteur oMT<sub>2</sub> est étayée par un argument « structurel » du récepteur. En effet, contrairement aux autres récepteurs mélatoninergiques, le récepteur oMT<sub>2</sub> possède un motif DRY et pas un motif NRY comme dans les autres espèces (homme, singe, rat et souris) (figure 2). Ce motif DRY se situe au début du troisième domaine transmembranaire (TM 3) et l'arginine (Arg 246) est en position 6.30, selon la nomenclature de Ballesteros et al. (Ballesteros and Weinstein, 1995). La conformation inactive d'un récepteur couplé aux protéines G dépend des forces ioniques existantes entre l'arginine en position 3.50 (Arg 138), le motif DRY du TM 3 et les résidus D/E (Asp/ Glu) en position 6.30, à proximité de l'extrémité cytoplasmique du TM 6 (Ballesteros et al., 2001; Smit et al., 2007). Des mutations neutralisant la charge des résidus en position 3.50 ou 6.30 induisent une augmentation significative de l'activité constitutive du récepteur. Pour les récepteurs hMT<sub>2</sub> et rMT<sub>2</sub>, les résidus en position 3.50 et 6.30 correspondent à des acides aminés distincts (arginine et asparagine, respectivement). La conformation inactive du récepteur est alors conservée. Pour le récepteur oMT<sub>2</sub>, les résidus en position 3.50 et 6.30 sont deux arginines et possèdent donc la même charge positive (figure 2). Ces charges identiques repoussent les extrémités cytoplasmiques des domaines TM 3 et TM 6. Par conséquent, l'équilibre des forces ioniques qui garantissait l'état inactif du récepteur est perturbé. Ce phénomène de répulsion des domaines TM 3 et TM 6 a été décrit comme étant suffisant pour induire l'activité constitutive



d'un récepteur. Un argument supplémentaire en faveur de l'activité constitutive s'ajoute puisque ce changement conformationnel augmenterait l'accessibilité du récepteur aux protéines G (Parnot et al., 2002; Roka et al., 1999; Smit et al., 2007) et par conséquent l'activité constitutive de ce même récepteur.

L'ensemble de ces résultats fonctionnels et structuraux nous laisse penser que le récepteur oMT<sub>2</sub> serait constitutivement actif, contrairement aux récepteurs hMT<sub>2</sub> et rMT<sub>2</sub>. Cette observation nous a conduit à ré-évaluer l'existence d'une activité constitutive chez tous les types de récepteurs à la mélatonine. Nous avons donc mis en place deux groupes d'expérimentations pour mettre à l'épreuve cette hypothèse. Le niveau d'activité basale des protéines G liées aux récepteurs MT de différentes espèces a été mesuré dans différentes conditions expérimentales pouvant influencer sur le niveau de l'activité constitutive (nature de la lignée cellulaire, niveau d'expression des récepteurs, nature des protéines G impliquées). Nous avons également tenté d'identifier et de caractériser des agonistes inverses des récepteurs MT.

## Références

- Alarma-Estrany, P. and J. Pintor (2007). "Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology." *Pharmacol Ther* **113**(3): 507-22.
- Audinot, V., A. Bonnaud, et al. (2008). "Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors." *Biochem Pharmacol* **75**(10): 2007-19.
- Ayoub, M. A., C. Couturier, et al. (2002). "Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* **277**(24): 21522-8.
- Ayoub, M. A., A. Levoye, et al. (2004). "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers." *Mol Pharmacol* **66**(2): 312-21.
- Ballesteros, J. A., A. D. Jensen, et al. (2001). "Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6." *J Biol Chem* **276**(31): 29171-7.
- Barrett, P., S. Conway, et al. (2003). "Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family." *J Pineal Res* **35**(4): 221-30.
- Boutin, J. A., V. Audinot, et al. (2005). "Molecular tools to study melatonin pathways and actions." *Trends Pharmacol Sci* **26**(8): 412-9.
- Drew, J. E., P. Barrett, et al. (1998). "The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies." *J Neuroendocrinol* **10**(9): 651-61.
- Imbesi, M., T. Uz, et al. (2008). "Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT1 and MT2 melatonin receptors." *Brain Res* **1227**: 19-25.
- Jockers, R., P. Maurice, et al. (2008). "Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?" *Br J Pharmacol* **154**(6): 1182-95.



- Mailliet, F., V. Audinot, et al. (2004). "Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors." Biochem Pharmacol **67**(4): 667-77.
- Migaud, M., A. Daveau, et al. (2005). "MTNR1A melatonin receptors in the ovine preammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts." Biol Reprod **72**(2): 393-8.
- Parnot, C., S. Miserey-Lenkei, et al. (2002). "Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors." Trends Endocrinol Metab **13**(8): 336-43.
- Pelletier, J., L. Bodin, et al. (2000). "Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel(1a) receptor in the ewe." Biol Reprod **62**(4): 1096-101.
- Reppert, S. M., C. Godson, et al. (1995). "Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8734-8.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, et al. (1996). "Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary." FEBS Lett **386**(2-3): 219-24.
- Roka, F., L. Brydon, et al. (1999). "Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity." Mol Pharmacol **56**(5): 1014-24.
- Sallinen, P., S. Saarela, et al. (2005). "The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues." Life Sci **76**(10): 1123-34.
- Smit, M. J., H. F. Vischer, et al. (2007). "Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 53-87.
- Trecherel, E., M. Batailler, et al. "Functional characterization of polymorphic variants for ovine MT1 melatonin receptors: Possible implication for seasonal reproduction in sheep." Anim Reprod Sci.
- Wang, L. M., N. A. Suthana, et al. (2005). "Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation." Eur J Neurosci **22**(9): 2231-7.
- Weaver, D. R., C. Liu, et al. (1996). "Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters." Mol Endocrinol **10**(11): 1478-87.
- Xiao, C. T., M. X. Chu, et al. (2007). "Analysis of polymorphism, structure and function of exon 2 of ovine melatonin receptor 1b gene: a clue as to why it lacks expression in sheep." J Pineal Res **42**(1): 97-104.



## Deuxième partie:

Mise en évidence de l'activité constitutive des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> et identification d'agonistes inverses





# Introduction

L'étude du récepteur  $\text{oMT}_2$ , aussi bien d'un point de vue pharmacologique, fonctionnel et structurel, nous laisse imaginer que ces récepteurs possèdent une activité constitutive. D'une part, en absence de mélatonine, le niveau basal d'AMPc des cellules CHO- $\text{oMT}_2$  est élevé. D'autre part, le récepteur  $\text{oMT}_2$  contrairement aux autres récepteurs mélatoninergiques possède un motif DRY. Ce motif DRY situé entre le troisième domaine transmembranaire et la seconde boucle intracellulaire, est hautement conservé au cours de l'évolution. Cette séquence de trois acides aminés joue un rôle primordial dans la régulation des états d'activation des RCPG. Il est acquis que le motif DRY est impliqué dans l'activité constitutive de plusieurs récepteurs, comme les récepteurs  $\alpha_{1B}$  et  $\beta_{2B}$ -adrénergiques (Ballesteros et al., 2001; Rasmussen et al., 1999; Scheer et al., 1996), le récepteur à l'histamine  $H_2$  (Alewijse et al., 2000), la rhodopsine (Acharya and Karnik, 1996; Cohen et al., 1993; Franke et al., 1992), les récepteurs à la vasopressine de type II (Morin et al., 1998), les récepteurs  $\mu$ -opioïdes (Li et al., 2001), et les récepteurs à l'ocytocine (Favre et al., 2005) (Pour revue: Rovati et al., 2007).

L'activité constitutive des récepteurs MT est très peu décrite dans la littérature. Roka et ses collaborateurs ont montré que le récepteur  $\text{hMT}_1$  exprimé dans la lignée cellulaire HEK293 serait constitutivement actif (Roka et al., 1999). Cette équipe conclut que le luzindole, connu comme étant un antagoniste des récepteurs mélatoninergiques, se comportait comme un agoniste inverse pour ce récepteur. De plus, le récepteur  $\text{hMT}_1$  formerait de façon spontanée un complexe avec une protéine  $G_i$  et une protéine régulatrice de la signalisation des protéines G (RGS20) (Maurice et al., 2010). Ce pré-couplage avec les protéines  $G_i$  est un bon argument en faveur de la possible activité constitutive de ce récepteur. De plus, dans des cellules COS co-transfectées avec le récepteur  $\text{MT}_1$  et le récepteur à la TSH, l'expression du récepteur  $\text{MT}_1$  diminue l'activation de la voie AMPc induite par la TSH, même en absence de mélatonine dans le milieu. Ceci implique que les récepteurs  $\text{MT}_1$  non liés peuvent induire une diminution de la signalisation AMPc (Dupre et al., 2011).

Nos travaux se sont portés initialement sur l'activité constitutive des récepteurs mélatoninergiques  $\text{MT}_1$  et  $\text{MT}_2$  de trois espèces (humain, rat et ovin). L'activité constitutive a



été mise en évidence en mesurant le niveau d'activité des protéines G en absence de ligand endogène (test de liaison du GTP $\gamma$ S). Nous nous sommes alors interrogés d'une part sur la nature du(des) sous-type(s) de protéines G impliquées dans cette activité constitutive et d'autre part sur les facteurs pouvant moduler le niveau de celle-ci. Deux molécules initialement connues comme des antagonistes des récepteurs à la mélatonine, UCM 549 et UCM 724, ont été identifiées comme étant des agonistes inverses des récepteurs humains MT<sub>2</sub> (Spadoni et al., 2007). Dans la première étude, seuls les résultats concernant les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> humains exprimés de façon stable dans les lignées cellulaires CHO et Neuro2A sont présentés<sup>2</sup>. Dans la seconde étude, l'activité constitutive des récepteurs de rat et ovin seront exposés<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup> L'ensemble des résultats concernant l'identification de l'activité constitutive des récepteurs hMT<sub>1</sub> et hMT<sub>2</sub>, ainsi que l'identification d'agonistes inverses est rapporté dans l'article inclus page 79-90.

<sup>3</sup> L'ensemble des résultats concernant l'identification de l'activité constitutive des récepteurs ovins et de rat est rapporté dans le paragraphe inclus page 91-93.



# Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> and discovery of inverse agonists

Abstract: Melatonin receptors have been described to activate different G protein-dependent signaling pathways, both in laboratory, heterologous, cellular models and in physiological conditions. Furthermore, the constitutive activity of G protein-coupled receptors has been shown to be key in physiological and pathological conditions. In the case of melatonin receptors, information is rather scarce and concerns only MT<sub>1</sub> receptors. In the present report, we show that the G protein-coupled melatonin receptors do have a constitutive, nonmelatonin-induced signaling activity using two cellular models of different origins, the Chinese hamster ovary cell line and Neuro2A, a neuroblastoma cell line. Furthermore, we show that this constitutive activity involves mainly Gi proteins, which is consistent with the common knowledge on the melatonin receptors. Importantly, we also describe, for the first time, inverse agonist properties for melatonin ligands. Although it is clear than more in-depth, biochemistry-based studies will be required to better understand by which pathway(s) the constitutively active melatonin receptors transfer melatonin information into intracellular biochemical events; our data open interesting perspectives for understanding the importance of the constitutive activity of melatonin receptors in physiological conditions.

**Séverine Devavry<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Céline Legros<sup>6</sup>, Chantal Brasseur<sup>6</sup>, Philippe Delagrangé<sup>7</sup>, Gilberto Spadoni<sup>8</sup>, William Cohen<sup>6</sup>, Benoît Malpoux<sup>1,2,3,4,5</sup>, Jean A. Boutin<sup>6</sup> and Olivier Nosjean<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France; <sup>2</sup>CNRS, UMR6175, Nouzilly, France; <sup>3</sup>Université de Tours, Tours, France; <sup>4</sup>Haras Nationaux, Nouzilly, France; <sup>5</sup>IFR135 Imagerie Fonctionnelle, Tours, France; <sup>6</sup>Biotechnologies, Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine, France; <sup>7</sup>Département des Sciences Expérimentales, Institut de Recherches Servier, Suresnes, France; <sup>8</sup>Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo" Piazza Rinascimento 6, Urbino, Italy

**Key words:** binding, biochemical descriptions, constitutive activity, GTP $\gamma$ S, inverse agonists, recombinant melatonin receptors

Address reprint requests to Jean A. Boutin, BPMC, Institut de recherches SERVIER, 125, chemin de Ronde, 78290 – Croissy-sur-Seine, France.  
E-mail: jean.boutin@fr.netgrs.com

Received July 8, 2011;  
Accepted September 9, 2011.

## 1 Introduction

Melatonin is a neurohormone produced in mammals mainly during the dark period by the pineal gland. This compound, derived from tryptophan and closely related to serotonin, produces a paramount of effects that are both central and peripheral. These actions relate to many physiological functions of the body and include the control of sleep, digestion, circadian rhythm, etc. A vast literature provided evidence that melatonin can, although at high concentrations (micromolar and beyond), modulate physio-pathological situations such as inflammation, cancer progression, and immunological responses. Two melatonin agonists have reached the market: Ramelteon<sup>®</sup> for the treatment of sleep disorders and agomelatin for the treatment of depression. This later compound has the particularity to have a slight 5-HT<sub>2C</sub> component [1].

Melatonin acts through at least three targets, namely the binding site MT<sub>3</sub> that is the enzyme quinone reductase 2, and two 7-trans-membrane domain, G protein-coupled receptors (GPCR), MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> [2–4]. More and more is also reported in the large variety of signaling pathways associated with these receptors. Depending on the tissue and species, melatonin can activate different second messenger cascades acting on the same receptor subtype. MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors are primarily coupled in an inhibitory manner to the adenylate cyclase, via a pertussis toxin-sensitive Gi protein [reviewed in Ref. 5]. Activation of MT<sub>1</sub> receptor inhibits cAMP accumulation and then modulates the PKA signaling pathway [6]. Reports have also shown a coupling of MT<sub>1</sub> receptor with Gq [7]. Activated MT<sub>1</sub> receptors, in addition to inhibition of cREB phosphorylation [8–10], can also inhibit the formation of immediate early gene products, such as c-Fos and jun B [11]. Further,

stimulation of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors may activate phospholipase C (PLC), with a concomitant increase in inositol-(1,4,5)-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)/Ca<sup>2+</sup> and 1,2-diacylglycerol [reviewed in Ref. 5,12]. In COS-7 cells expressing human MT<sub>1</sub> or MT<sub>2</sub> receptors, it has been demonstrated that activation of these receptors stimulates the c-Jun N-terminal kinase activity *via* pertussis toxin-sensitive and pertussis toxin-insensitive G proteins [13]. Stimulation of the MT<sub>1</sub> receptor has also been associated with an increased phosphorylation of mitogen-activated protein kinase MEK1/2 and extracellular signal-regulated kinase ERK1/2 [13, 14]. In addition, MT<sub>1</sub> melatonin receptors increase potassium conductance by activating Kir3 (GIRK) inward rectifier potassium channels [15] and potentiate prostaglandin F<sub>2α</sub> and ATP-mediated stimulation of PLC activity [16, 17]. Both processes may involve activation of membrane-bound βγ-subunits released by Gi proteins. In rat microvascular endothelial cells, melatonin inhibits stimulated nitric oxide production. This effect was mediated by the suppression of Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular stores [18]. In human benign prostate cells, melatonin inhibits cGMP and DNA synthesis [19]. Modulation of intracellular cGMP level by cloned MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors has also been reported [20].

More recently, studies have shown that the melatonin receptor subtypes form both homo- and heterodimers [21, 22]. Moreover, the melatonin-related orphan receptor, gpr50, has been reported to antagonize MT<sub>1</sub> by heterodimerization [23]. The existence of these dimers in native tissues and their physiological significance await further detailed analyses.

Despite all the information on the signaling pathways of melatonin receptors, one observation remains poorly documented, that is, the constitutive activity of the MT<sub>1</sub> receptor. Indeed, only three publications, spanned on almost 10 yr, were published on the subject, each with various levels of details [16, 24, 25]. Incidentally, no observation concerning the MT<sub>2</sub> receptor exists in the literature. It becomes increasingly obvious that receptors are not single signaling units. Receptors should be considered as integrated in a far more complex signaling system [26–28]. Indeed, in this ‘new’ view of the receptor-as-a-signaling-unit, besides the nature itself of this unit in terms of number of proteins acting in a coordinating manner, the state of the receptor itself, without ligand, is also the subject of studies. In this case, as described by Kenakin [29], constitutive activity corresponds to the ‘spontaneous production of a receptor conformation that interacts with cellular components (i.e., G proteins) to initiate signaling in the absence of agonist’. It is clear, then, that what was often taken for inappropriate experimental conditions, during which a receptor activity was observed in the absence of its ligand, was indeed corresponding to a state of the receptor spontaneously active. Revisiting many experiments could bring, at this stage, interesting new observations, as many receptor systems have a state corresponding to this spontaneous constitutive activity.

Indeed, while doing so, it was interesting to note that in the heterologous cellular system used to express cloned receptors, some situations might correspond to constitutive activity, particularly with human melatonin receptors MT<sub>1</sub>

and MT<sub>2</sub>. Because these observations were reported in two different cellular systems (i.e., CHO-K1 and Neuro2A cell lines) used for expression of the receptors, we could deduce, upfront, that it was not an expression system-mediated artifact. Therefore, we provide in this report the molecular description of human melatonin receptor systems in which not only the constitutive state of the receptors are described and dissected but also the finding of new compounds with inverse agonist properties susceptible to help us decipher these systems, beside the two already described, but poorly documented luzindole and 4P-PDOT [24, 25].

## Materials and methods

### Materials

Guanosine 5′-[γ-<sup>35</sup>S]-triphosphate ([<sup>35</sup>S]-GTPγS; specific activity: 1000 Ci/mmol) was purchased from Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). Suramin was from Calbiochem (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). Luzindole (*N*-Acetyl-2-benzyltryptamine) and 4P-PDOT (4-Phenyl-2-propionamidotetralin) were from Tocris (Ellisville, MI, USA). GTPγS (Guanosine 5′-[γ-thio]triphosphate), Guanosine 5′-diphosphate (GDP), Melatonin, PTX (Pertussis toxin, from *Bordetella pertussis*), GDP-β-S (guanosine 5′-[β-thio]-diphosphate) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Compounds UCM 549 (*N*-(8-Methoxy-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-10-yl-methyl)acetamide) and UCM 724 ((8-Methoxy-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-10-yl-methyl) urea) were a kind gift of Spadoni group [30]. All culture media were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum was from Lonza (Levallois-Perret, France).

### CHO-K1-hMT, CHO-K1-hH3, and Neuro2A-hMT cell culture

CHO-K1 cells stably expressing hMT<sub>1</sub>, hMT<sub>2</sub> [31], rMT<sub>1</sub>, rMT<sub>2</sub> [32], oMT<sub>1</sub> [33], oMT<sub>2</sub> [34], or hH<sub>3</sub> receptors were grown in Ham F12 Glutamax medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 400 μg/mL geneticin. Neuro2A cells stably expressing hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> were grown in modified Eagle’s medium/Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, and 400 μg/mL geneticin. When mentioned, CHO-K1-hMT and Neuro2A-hMT were treated overnight with *pertussis* toxin (PTX) at 100 ng/mL. Cells were then used for the activity assays (CDS and GTPγS binding). **3**

### Membrane preparations

Melatonin receptors were used as previously cloned and described in our laboratory [31–33]. CHO-K1 and Neuro2A cell lines stably expressing human MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors were grown to confluence and harvested in phosphate buffer containing 5 mM EDTA and centrifuged at 2500 g for 20 min (12°C). The resulting pellet was suspended in 5 mM Tris/HCl, pH 7.4, containing 2 mM EDTA, and homogenized using a Kineatica Polytron (30 s, **4** in ice 13,000 rpm). The homogenate was then centrifuged **5**

(20,000 g, 30 min, 4°C), and the resulting pellet was suspended in 75 mM Tris/HCl, pH 7.4, containing 2 mM EDTA and 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Determination of protein content was performed according to Lowry using the Biorad kit (Bio-Rad SA, Ivry-sur-Seine, France). Aliquots of membrane preparations were stored in binding buffer (75 mM Tris/HCl, pH 7.4 containing 12.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 mM EDTA) at -80°C until use. The density of binding sites B<sub>max</sub> and the dissociation constant of the radioligand (K<sub>D</sub>) values were calculated according to the method of Scatchard in 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-melatonin binding assay [31]. The density of receptors was determined as follows: 454 fmol/mg in CHO-hMT<sub>1</sub>, 1560 fmol/mg in CHO-hMT<sub>2</sub>, 124 fmol/mg in CHO-rMT<sub>1</sub>, 2462 fmol/mg in CHO-rMT<sub>2</sub>, 439 fmol/mg in CHO-oMT<sub>1</sub>, 203 fmol/mg in CHO-oMT<sub>2</sub>, 186 fmol/mg in Neuro2A-hMT<sub>1</sub>, 393 fmol/mg in Neuro2A-hMT<sub>2</sub>.

### [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding assay

Membranes, drugs, GTPγS, and [<sup>35</sup>S]-GTPγS were diluted in binding buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 75 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 μM GDP). Incubation was started by the addition of 0.2 nM [<sup>35</sup>S]-GTPγS to membranes and ligands and carried on for 60 min at room temperature in a final volume of 250 μL. To test for inverse agonist activity, membranes were incubated with 5 μM melatonin and 50 μM of the tested compound. Nonspecific binding was assessed using unlabeled GTPγS (10 μM), and maximal receptor activity was assessed by the use of a saturating concentration of agonist, 5 μM melatonin for MT receptors, and 10 μM histamine for hH3 receptor. All reactions were stopped by rapid filtration through GF/B unilters presoaked with distilled water, followed by three successive washes with ice-cold buffer. Data were analyzed by using the program PRISM to yield [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding in the presence of melatonin, tested compound, or binding buffer. Data were analyzed also by using the program PRISM to yield EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> values for inverse agonists.

### Cellular dielectric spectroscopy (CellKey)

CHO-K1 cells expressing human MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors and Neuro2A cells expressing human MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> were plated at the density of 40,000 cells per well onto MDS Analytical 96-well assay plates with embedded electrodes and were incubated at 37°C, CO<sub>2</sub> 6% for 48 hr. Prior to the measurement, cells were washed three times with Hank's balanced salt solution, 0.1% BSA, 20 mM HEPES, pH 7.4, and CHO-K1 and Neuro2A were left to equilibrate at 28–37°C, respectively for 30 min. The impedance measurement was performed on a CellKey system (MDS Analytical, Concord, ON, Canada), where the signal was recorded for 5 min before online addition of melatonin or tested compound and 15 or 25 min for CHO-K1 and Neuro2A, respectively, thereafter. The cells in each well were stimulated once with a single concentration of compounds. The resulting data are expressed as the maximal signal corrected for the baseline and represented as a percentage of agonist effect. Obviously, naïve CHO-K1 cells were used as control

in these CDS experiments and do not show any signal after melatonin treatment.

## Results

### MT receptors display constitutive activity

The activity of melatonin heterotrimeric GPCR can be measured by a [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding assay without the natural agonist. In these conditions, the radioligand titrates the number of sites of active G protein, thus revealing the extent of receptor-activated form of the G protein. In the absence of melatonin, the assay shows the basal, or constitutive, activity of the receptor, while the use of melatonin allows the measurement of the maximal response of the G protein to the melatonin receptors. In these conditions, CHO-K1 cells stably expressing hMT<sub>1</sub> or hMT<sub>2</sub> showed a [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding of 265.2 ± 5.0 and 324 ± 3.3 fmol/mg of protein, respectively, while native CHO-K1 cells yielded 40.4 ± 0.4 fmol/mg of protein, suggesting that hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> receptors have a spontaneous coupling to G proteins in the absence of agonist (Fig. 1). In the presence of 5 μM melatonin, the same assay gave a value of 970.0 ± 64.5 fmol/mg of protein for CHO-K1-hMT<sub>1</sub> and 650.0 ± 68.0 fmol/mg of protein for CHO-K1-hMT<sub>2</sub>. These results show that human MT receptors display constitutive activity when expressed in CHO cells, and that, this activity covers 25% of hMT<sub>1</sub> maximal activity and 46% of hMT<sub>2</sub> maximal activity.

The level of constitutive activity of human melatonin receptors could be compared with that of the human histamine H<sub>3</sub> receptor, which has been described with a strong constitutive activity in orthologous as well as in natural systems [35, 36]. Using [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding assay and the same cellular model CHO-K1 cells, the hH<sub>3</sub> receptor constitutive activity was measured to 35 ± 1.13% of maximal, histamine-stimulated G protein activity. This value compares well with the basal activities of MT receptors mentioned earlier, 25% for hMT<sub>1</sub> and 46% for hMT<sub>2</sub>, confirming that melatonin receptors show an important constitutive activity when expressed in CHO cells.

To further document the level of constitutive activities of human MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors in alternative cellular models, to be sure that the observation was not artifactually linked to the genetic background of the cell, we used Neuro2A, a mouse cell line derived from a neuroblastoma. In Neuro2A stably expressing hMT<sub>1</sub> or hMT<sub>2</sub>, the basal activity of G proteins was 1273.0 ± 150.9 and 1267.0 ± 34.0 fmol/mg of protein, respectively, while native Neuro2A showed a [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding of 657.7 ± 15.5 fmol/mg of protein. In these cells, the maximum melatonin-mediated activation of hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> was 1459.0 ± 62.8 and 1509.0 ± 37.6 fmol/mg of protein, respectively. These results show that the constitutive activities of human MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors seem to be higher in Neuro2A cells than in CHO-K1 cells (Fig. 1), reaching between 80% and 90% for both hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub>.

Finally, we wanted to see whether this observation was restricted to the human receptors, or whether it was more generally applying to the melatonin receptors. As we

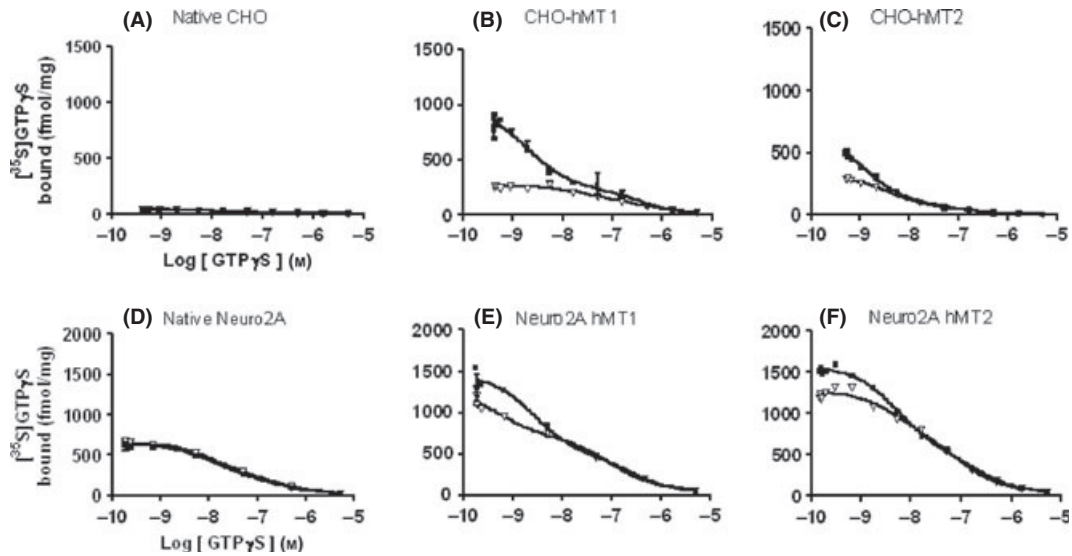


Fig. 1. Constitutive activity of human melatonin receptors expressed in CHO (A, B, C) and Neuro2A (D, E, F) cell lines. Activity of G protein, presented as guanosine 5'-[ $\gamma$ - $^{35}$ S]-triphosphate ( $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S) bound (fmol/mg), was assessed in the absence ( $\Delta$ ) or presence ( $\blacksquare$ ) of 5  $\mu$ M melatonin and varying concentrations of unlabeled GTP $\gamma$ S. (A) native CHO-K1; (B) CHO-K1-hMT1; (C) CHO-K1-hMT2; (D) Neuro2A; (E) Neuro2A-hMT1; and (F) Neuro2A-hMT2. The data on this figure are representative of two independent experiments in triplicates. The data points and error bars represent the mean of triplicate and standard error, respectively.

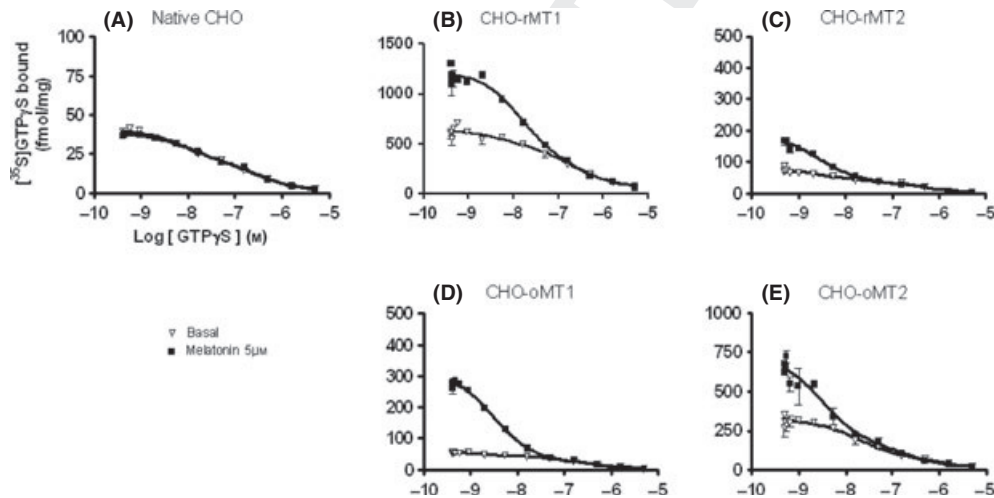


Fig. 2. Constitutive activity of melatonin receptors cloned from ovine (D and E) and rat (B and C) expressed in CHO cell lines. Activity of G protein, presented as guanosine 5'-[ $\gamma$ - $^{35}$ S]-triphosphate ( $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S) bound (fmol/mg), was assessed in the absence ( $\Delta$ ) or presence ( $\blacksquare$ ) of 5  $\mu$ M melatonin and varying concentrations of unlabeled GTP $\gamma$ S. (A) native CHO-K1; (B) CHO-K1-rMT1; (C) CHO-K1-rMT2; (D) CHO-K1-oMT1; (E) CHO-K1-oMT2. The data on this figure are representative of two independent experiments in triplicate. The data points and error bars represent mean of triplicate and standard error, respectively.

previously cloned the ovine and rat receptors, we applied the same experimental conditions and obtained the results shown in Fig. 2. It can be seen from it that all the recombinant melatonin receptors, from whatever species assessed, were constitutively active to some extent. Besides using stable cell lines, it was not possible to correlate the level of constitutive activity of melatonin receptors with their level of expression (see density values in Materials and methods). This observation suggests that when selected as a stable cell line, cells may adapt to the constitutive elevated

or lowered amount of some of their signaling metabolites, making a quantitative comparison difficult between cell lines.

#### Close coupling between G proteins and melatonin receptors

As constitutive activity mainly results from the strength of coupling between the receptor and the G protein, it would be interesting to quantify this interaction to compare the



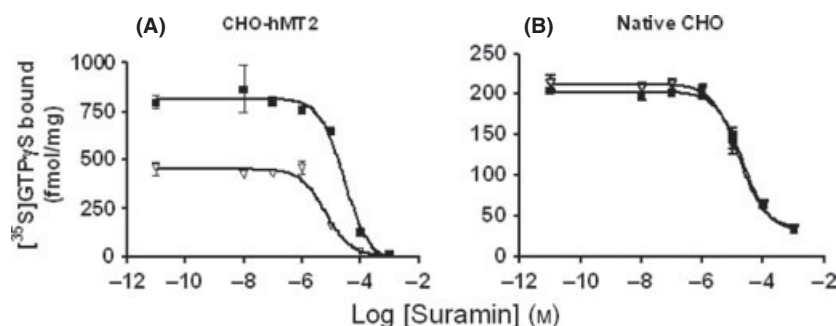


Fig. 3. Effect of suramin on GTP $\gamma$ S binding at CHO-hMT<sub>2</sub> (A) and native CHO (B). Activity of G protein, presented as guanosine 5'-[ $\gamma$ -<sup>35</sup>S]-triphosphate bound (fmol/mg), was assessed in the absence ( $\Delta$ ) or presence ( $\blacksquare$ ) of 5  $\mu\text{M}$  melatonin and increased concentrations of suramin. The data on the figure are representative of three independent experiments in triplicate. The data points and error bars represent the mean of a triplicate and standard error, respectively.

receptors and the cellular models described before. We investigated this possibility using suramin, a polysulfonated naphthylurea, which acts as an uncoupling agent of the receptors from G proteins [37]. Although it is not a selective and potent compound to this end, it is the only one at hand, and it was key in analyzing the constitutive activity of MT<sub>1</sub> in the pioneer work of Roka et al. [16]. Suramin acts by blocking the rate-limiting step of G protein activation, hence inhibiting the binding of GTP $\gamma$ S to G proteins, i.e., the dissociation of GDP prebound to the G protein  $\alpha$  subunit [38]. Fig. 3 shows the dose-response effect of suramin on the [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding of CHO-K1-hMT<sub>2</sub>. The IC<sub>50</sub> of suramin derived from these experiments was  $6.8 \pm 1.2 \mu\text{M}$  in basal conditions and  $30.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$  under melatonin-stimulated conditions. Similar experiments were conducted with CHO-K1-hMT<sub>1</sub>, CHO-K1-hH<sub>3</sub>, native CHO-K1, and Neuro2A expressing either hMT<sub>1</sub> or hMT<sub>2</sub>. Overall, the experiments consistently showed an IC<sub>50</sub> of suramin ranging from  $10 \pm 1.57 \mu\text{M}$  in Neuro2A-hMT<sub>2</sub> to  $93.5 \pm 1.21 \mu\text{M}$  in CHO-K1-hH<sub>3</sub> (see Table 1). These data are in line with the data obtained by Roka et al. [16] on the recombinant human MT<sub>1</sub> receptor, but do not show a receptor dependency that allows to quantify the strength of the coupling between MT receptors and G proteins.

Melatonin receptors are commonly designated as Gi-coupled receptors [7, 39], although MT<sub>1</sub> has also been described with a Gq signaling pathway [7, 39]. As a next step, we aimed at understanding the role of the different G proteins involved in the constitutive activity of melatonin receptors. In this respect, pertussin toxin (PTX), a specific Gi protein activity inhibitor, is an excellent tool to

demonstrate the involvement of Gi protein in the signaling of a GPCR. Consequently, CHO-K1-hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> cells as well as Neuro2A-hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> cells were treated overnight with PTX (100 ng/mL), and cellular membranes were prepared for [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding assay. Fig. 4 shows that after a treatment with PTX, the level of constitutive activity in CHO-K1-hMT<sub>1</sub> decreased by 60%, from  $862 \pm 30$  to  $353 \pm 12$  fmol/mg of protein. This is consistent with a recent report, which showed, using biochemical approaches, that hMT<sub>1</sub> was precoupled to a Gi protein in resting HEK-hMT<sub>1</sub> cells [40]. In CHO-K1-hMT<sub>2</sub>, the [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding decreased even more drastically by 95%, from  $884.8 \pm 28.7$  to  $49.2 \pm 3.8$  fmol/mg of protein. These results suggest that, indeed, Gi proteins are involved in the constitutive activity the MT receptor signaling. Interestingly and consistent with the literature, an additional signaling component, PTX insensitive, seems to be present for MT<sub>1</sub>. These results, obtained with the CHO-K1 cell line, were confirmed in the Neuro2A cell line, where Neuro2A-hMT<sub>1</sub> [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S binding decreased by 37%, from  $2804 \pm 183$  to  $1777 \pm 32$  fmol/mg of protein, while in Neuro2A-hMT<sub>2</sub> cells the difference was 73%, with a binding of  $1091 \pm 68$  moving to  $294 \pm 12$  fmol/mg after PTX treatment (Fig. 4).

### Identification of inverse agonists

Melatonin receptors display constitutive activity in heterologous systems. One of the most demonstrative ways of further documenting this property is to make use of inverse agonists as pharmacological tools. In the Monod-Wyman-Changeux model of equilibrium of a receptor between

Table 1. IC<sub>50</sub> of suramin in different receptors. The IC<sub>50</sub> of suramin, presented as guanosine 5'-[ $\gamma$ -<sup>35</sup>S]-triphosphate bound (fmol/mg), was assessed in the absence (basal conditions) or presence of melatonin and increased suramin concentrations. Values of IC<sub>50</sub> are expressed in molar with standard error. Values of IC<sub>50</sub> were representative of one experiment (in duplicate) repeated three times

IC <sub>50</sub> suramin (M)	CHO-K1				Neuro2A	
	Native	hH <sub>3</sub>	hMT <sub>1</sub>	hMT <sub>2</sub>	hMT <sub>1</sub>	hMT <sub>2</sub>
Basal	$1.56 \times 10^{-5} \pm 1.13$	$9.31 \times 10^{-6} \pm 1.21$	$2.98 \times 10^{-5} \pm 1.21$	$6.78 \times 10^{-6} \pm 1.24$	$2.51 \times 10^{-5} \pm 1.78$	$9.88 \times 10^{-6} \pm 1.57$
Natural agonist	$2.17 \times 10^{-5} \pm 1.12$ melatonin	$6.56 \times 10^{-6} \pm 1.12$ histamine	$7.60 \times 10^{-5} \pm 1.65$ melatonin	$3.06 \times 10^{-5} \pm 1.22$ melatonin	$2.44 \times 10^{-5} \pm 1.21$ melatonin	$1.18 \times 10^{-5} \pm 1.21$ melatonin

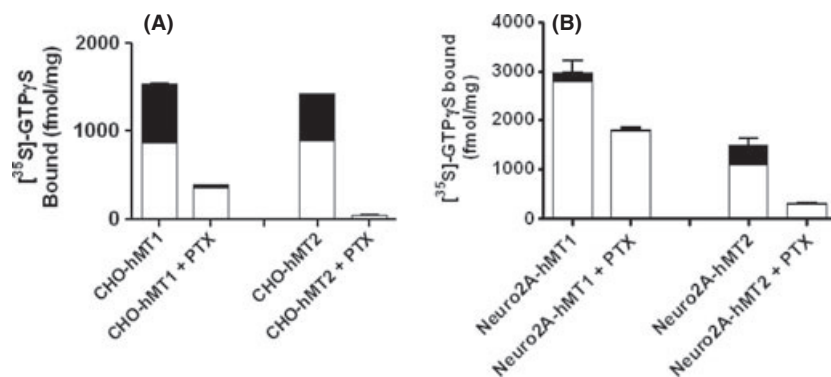


Fig. 4. Involvement of  $G_i$  proteins in the constitutive activity of human melatonin receptors expressed in CHO-K1 and Neuro2A cell lines. Cells were treated overnight with PTX (100 ng/mL). Activity of G protein, presented as guanosine 5'-[ $\gamma$ - $^{35}\text{S}$ ]-triphosphate bound (fmol/mg), was assessed in the absence (□) or presence (■) of 5  $\mu\text{M}$  melatonin in CHO-K1 cells expressing hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> receptors (A) and in Neuro2A cells expressing hMT<sub>1</sub> and hMT<sub>2</sub> receptors (B). The data on the figure are representative of three independent experiments in triplicate. The data points and error bars represent the mean of a triplicate and standard error, respectively.

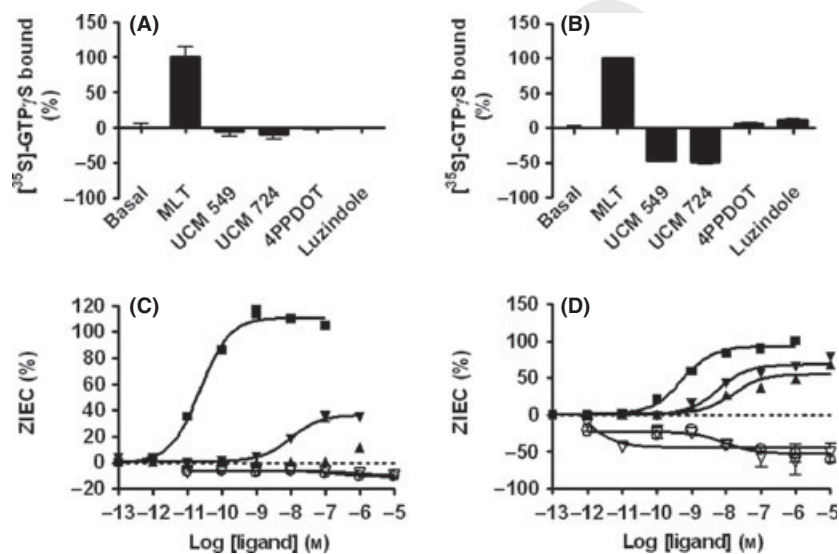


Fig. 5. Identification of inverse agonist of hMT receptors using guanosine 5'-[ $\gamma$ - $^{35}\text{S}$ ]-triphosphate ( $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ ) binding (A, B) and cellular impedance measurement (C, D). The activity of G proteins, presented as [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S bound (%), was assessed in CHO-K1-hMT<sub>1</sub> (A) and CHO-K1-hMT<sub>2</sub> (B), in the absence or presence of ligands: 5  $\mu\text{M}$  melatonin or 0.1  $\mu\text{M}$  UCM 549, UCM 724, luzindole or 4-P-PDOT. Raw data were normalized with basal level of activity of G proteins corresponding to 0% and the MLT-stimulated activity of G proteins corresponding to 100%. A and B histograms represent each of one experiment repeated three times. The data points and error bars represent mean of triplicate and standard error, respectively. The cellular impedance response (ZIEC) was measured on CHO-K1-hMT<sub>1</sub> (C) and CHO-K1-hMT<sub>2</sub> (D), in the presence of increased concentration of melatonin (■), UCM 549 (○), UCM 724 (□), luzindole (▲), or 4-P-PDOT (▼). C and D graphs represent each of one experiment repeated three times. The data points and error bars represent mean of duplicate and standard error, respectively.

several conformational states [41], related to different levels of activation of the receptor, one can consider positive agonists as ligands stabilizing the active conformation of the receptor, while inverse agonists stabilize the inactive state of the receptor. Therefore, such compounds are valuable tools for characterizing the constitutive activity of a receptor. We revisited part of our melatonin-oriented chemical library and noticed a series of intriguing results that escaped our attention without the present context. Two heterocyclic ligands recently reported with antagonistic activity, UCM 549 and UCM 724 [30], were re-investigated and revealed, indeed, an inverse agonist effect at the

melatonin receptors (Fig. 5). These compounds decreased basal [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S binding of CHO-K1-hMT<sub>2</sub> cells by 35%. To further document and consolidate this activity, the compounds were evaluated using cellular dielectric spectroscopy, a technique which has not made its place to a large number of laboratories, yet, but that allows to measure GPCR signaling [42, 43]. Using this technology, UCM 549 and UCM 724 showed a decrease in 42% of the basal signal. Hence, our data consistently show that both UCM 549 and UCM 724 behave as inverse agonists at hMT<sub>2</sub> receptor. Very interestingly, these compounds were not able to have any significant effect on hMT<sub>1</sub> constitutive

1 activity, using either [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding or CDS readouts.  
2 These results suggest that UCM 549 and UCM 724 behave  
3 as antagonists at hMT<sub>1</sub>, while they display inverse agonist  
4 properties at hMT<sub>2</sub>.

5 So far, only 4P-PDOT and luzindole were reported as  
6 inverse agonists at hMT<sub>1</sub> receptor [16, 24, 44]. They were  
7 used here as controls of our experimental conditions.  
8 Unfortunately, although, they did not show any inverse  
9 agonist behavior at either our MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> preparations,  
10 as shown in Fig. 5.

## 11 Discussion

12 The constitutive activity of MT receptors is poorly docu-  
13 mented. A close examination of the three experimental  
14 papers dealing with this subject leads to a different  
15 conclusion. Indeed, human MT<sub>1</sub> (not MT<sub>2</sub>) receptor has  
16 been described in 1999 by Roka et al. [16] in full mecha-  
17 nistic details, including some data on luzindole inverse  
18 agonism. In a second paper [24], it is reported that in  
19 isolated rat caudal arteries, in which MT<sub>1</sub> receptors are  
20 expressed, the treatment of the system with 4P-PDOT  
21 decreases the basal GTP binding by ~30%. Interestingly,  
22 the inhibition is inversely proportional to the concentration  
23 of the compound (while clearly seen at 100 nM, it is more  
24 modest at 1 μM and not significant at 10 μM). A feature that  
25 shade some concerns onto the conclusion, which stated that  
26 1/MT<sub>1</sub> is constitutively active and 2/4P-PDOT is an MT<sub>1</sub>  
27 inverse agonist, while initially described as a MT<sub>2</sub> full  
28 antagonist [4]. Finally, the third and most recent publica-  
29 tion deals with a further description of two human MT<sub>1</sub> cell  
30 lines expressing either high (158 fmol/mg prot) or low  
31 (88 fmol/mg prot) concentrations of receptors and that  
32 show MT<sub>1</sub> receptor constitutive activity or not, respectively  
33 [25]. The paper further described the internalization of the  
34 receptor that rendered the exact quantification and quali-  
35 fication of the process difficult.

36 In summary, various reports state that MT<sub>1</sub> was consti-  
37 tutively active, including, indirectly, in native tissues, but no  
38 report exists on the status of MT<sub>2</sub>. On the other hand, 4P-  
39 PDOT, a former MT<sub>2</sub> receptor antagonist, and luzindole, a  
40 MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> receptor ligand, were both reported as MT<sub>1</sub>  
41 inverse agonists. With these data available, we felt that  
42 there was some place for clarification of the constitutive  
43 activity of melatonin receptors, including a search for  
44 inverse agonists, despite a statement in the most recent  
45 reference review on the subject [4], which postulates that it  
46 is now well accepted. This view seems, therefore, a little  
47 ahead of our time, because there is still some place for  
48 experiments to further document this subject.

49 In our CHO system, but also when expressed in Neuro2A  
50 cells, we confirm that MT<sub>1</sub> is constitutively active, and, for  
51 the first time, we show that MT<sub>2</sub> receptors are also  
52 constitutively active when expressed in the same cells. The  
53 level of their constitutive activity is in line with what has  
54 been reported in the literature for MT<sub>1</sub>, and, for the sake of  
55 orthogonal comparison, for H<sub>3</sub>.

56 As discussed before in this section, the experimental data  
57 supporting an inverse agonism of 4P-PDOT and luzindole,  
58 all come from a single laboratory, were scarce and, at least,  
59 arguable, in particular because the experimental models

used were complex, and the readout not specific of  
melatonin receptors [24, 45, 46]. Besides published results  
[47], one of our own reports [34] showed that these  
compounds are in fact partial agonists at melatonin  
receptors, using either [<sup>35</sup>S]-GTPγS or the CDS technology.  
To identify new compounds with inverse agonism, we relied  
on the long-standing activity of medicinal chemistry of  
melatonergic ligands, which yielded a variety of chemical  
series, bearing either agonist or antagonist activities.  
Noteworthy, the inverse agonist property of a ligand  
appears only when dedicated experimental set-up are used,  
i.e., where the receptor does show constitutive activity, and  
when the data processing can adequately detect reverse  
effects of the compounds on the basal signal. If these  
experimental requirements are not met, a genuine inverse  
agonist will appear with simple antagonist properties.  
Indeed, a retrospective analysis of marketed drugs with  
attached antagonist properties showed that 70% of them  
did have, in fact, an inverse agonist profile, when evaluated  
in the appropriate conditions [reviewed in Ref. 48]. Our  
prospection led to the identification of two compounds that  
behave as inverse agonist to MT<sub>2</sub>, while they have a simple  
antagonist profile on MT<sub>1</sub> receptors. These compounds can  
now be considered as new tools to investigate the consti-  
tutive activity of melatonin receptors in different experi-  
mental systems.

From the perspective of pharmacological and/or physi-  
ological pertinence, constitutive activity of receptors are  
important both at the drug discovery level, which makes  
intensive use of heterologous systems for screening drug  
candidates, and at the physiological level, for understand-  
ing the fundamental function of a given receptor and its  
mechanism of action as a target in a therapeutic project  
such as the melatonin field. Therefore, the in vitro  
observation of a constitutive activity takes a broader  
meaning when it is confirmed in physiological conditions.  
The in vivo constitutive activity of receptors has been  
documented with, for instance, histamine receptor H<sub>3</sub> [35],  
the constitutive activity of which is important for the  
control of histamine functions in the brain. Other classical  
examples for constitutive GPCR activity in native systems  
are the β-adrenergic receptor in turkey erythrocyte mem-  
branes and intact cardiomyocytes [49, 50] as well as the  
muscarinic receptor M<sub>2</sub> in cardiac atrial membranes [51]. In  
this context, reports on GPCR constitutive activity in intact  
organs are of particular importance. For example, consti-  
tutive activity has been observed for β-adrenergic receptor  
expressed in normal heart tissues [52], α<sub>1A</sub> and α<sub>1B</sub>-  
adrenergic receptor in intact rat aorta [53], and the  
histaminic receptor H<sub>3</sub> in rat hypothalamus [54]. Many of  
the constitutively active GPCRs are receptors for neuro-  
transmitters. These findings suggest that constitutive activi-  
ty of neurotransmitter GPCRs provides a tonic support for  
basal neuronal activity [26].

In the cases of melatonin receptors, one intriguing  
question is whether constitutive activity could have a  
physiological role in reading the rhythm of melatonin  
secretion. One critical parameter of melatonin secretion is  
the duration of its daily presence. Could the level of  
constitutive activity be modulated in vivo by the duration  
of exposition of receptors to melatonin? If it is the case,

could this regulation be involved in the effects of melatonin? The identification of inverse agonists (which suppress constitutive activity) described in the present work provides valuable tools to address these questions and to determine whether constitutive activity is implicated in the way animals read day/night transition of melatonin secretion.

## References

- DE BODINAT C, GUARDIOLA-LEMAITRE B, MOCAER E et al. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat Rev Drug Discov* 2010; **9**:628–642.
- BOUTIN JA, AUDINOT V, FERRY G et al. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* 2005; **26**:412–419.
- JOCKERS R, MAURICE P, BOUTIN JA et al. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 2008; **154**:1182–1195.
- DUBOCOVICH ML, DELAGRANGE P, KRAUSE DN et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 2010; **62**:343–380.
- DUBOCOVICH ML, RIVERA-BERMEDEZ MA, GERDIN MJ et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003; **8**:d1093–d1108.
- WITT-ENDERBY PA, DUBOCOVICH ML. Characterization and regulation of the human ML1A melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 1996; **50**:166–174.
- MACKENZIE RS, MELAN MA, PASSEY DK et al. Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 2002; **63**:587–595.
- MCNULTY S, ROSS AW, SHIU KY et al. Phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis is regulated both by cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms. *J Neuroendocrinol* 1996; **8**:635–645.
- VON GALL C, GARABETTE ML, KELL CA et al. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci* 2002; **5**:234–238.
- WITT-ENDERBY PA, MASANA MI, DUBOCOVICH ML. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 1998; **139**:3064–3071.
- ROSS AW, BARRETT P, MORGAN PJ. Melatonin regulated gene expression in pars tuberalis cells of the ovine pituitary investigated by differential display. *Biochem Soc Trans* 1996; **24**:227S.
- ALARMA-ESTRANY P, PINTOR J. Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther* 2007; **113**:507–522.
- CHAN AS, LAI FP, LO RK et al. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 2002; **14**:249–257.
- WITT-ENDERBY PA, MACKENZIE RS, MCKEON RM et al. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; **46**:28–42.
- NELSON CS, MARINO JL, ALLEN CN. Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 1996; **7**:717–720.
- ROKA F, BRYDON L, WALDHOER M et al. Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol* 1999; **56**:1014–1024.
- GODSON C, REPERT SM. The Mella melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1997; **138**:397–404.
- SILVA CL, TAMURA EK, MACEDO SM et al. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 2007; **151**:195–205.
- GILAD E, PICK E, MATZKIN H et al. Melatonin receptors in benign prostate epithelial cells: evidence for the involvement of cholera and pertussis toxins-sensitive G proteins in their signal transduction pathways. *Prostate* 1998; **35**:27–34.
- JOCKERS R, PETIT L, LACROIX I et al. Novel isoforms of Mel1c melatonin receptors modulating intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels. *Mol Endocrinol* 1997; **11**:1070–1081.
- AYOUB MA, COUTURIER C, LUCAS-MEUNIER E et al. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2002; **277**:21522–21528.
- AYOUB MA, LEVOYE A, DELAGRANGE P et al. Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol* 2004; **66**:312–321.
- LEVOYE A, JOCKERS R, AYOUB MA et al. Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?—Focus on melatonin receptors. *Chronobiol Int* 2006; **23**:419–426.
- ERSAHIN C, MASANA MI, DUBOCOVICH ML. Constitutively active melatonin MT(1) receptors in male rat caudal arteries. *Eur J Pharmacol* 2002; **439**:171–172.
- KOKKOLA T, VAITTINEN M, LAITINEN JT. Inverse agonist exposure enhances ligand binding and G protein activation of the human MT1 melatonin receptor, but leads to receptor down-regulation. *J Pineal Res* 2007; **43**:255–262.
- SEIFERT R, WENZEL-SEIFERT K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; **366**:381–416.
- LEACH K, SEXTON PM, CHRISTOPOULOS A. Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2007; **28**:382–389.
- KENAKIN T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* 2007; **72**:1393–1401.
- KENAKIN T. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007; **28**:407–415.
- SPADONI G, BEDINI A, DIAMANTINI G et al. Synthesis, enantiomeric resolution, and structure-activity relationship study of a series of 10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cycloheptene MT2 receptor antagonists. *ChemMedChem* 2007; **2**:1741–1749.
- AUDINOT V, MAILLIET F, LAHAYE-BRASSEUR C et al. New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; **367**:553–561.

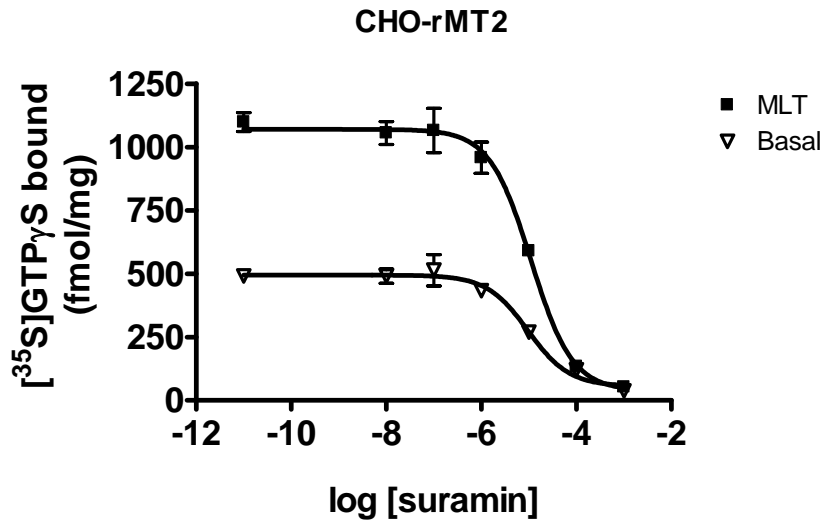
- 1 32. AUDINOT V, BONNAUD A, GRANDCOLAS L et al. Molecular  
2 cloning and pharmacological characterization of rat melatonin  
3 MT1 and MT2 receptors. *Biochem Pharmacol* 2008; **75**:2007–  
4 2019.
- 5 33. MAILLIET F, AUDINOT V, MALPAUX B et al. Molecular phar-  
6 macology of the ovine melatonin receptor: comparison with  
7 recombinant human MT1 and MT2 receptors. *Biochem*  
8 *Pharmacol* 2004; **67**:667–677.
- 9 34. COGE F, GUENIN SP, FERY I et al. The end of a myth: cloning  
10 and characterization of the ovine melatonin MT(2) receptor.  
11 *Br J Pharmacol* 2009; **158**:1248–1262.
- 12 35. MORISSET S, ROULEAU A, LIGNEAU X et al. High constitutive  
13 activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in  
14 brain. *Nature* 2000; **408**:860–864.
- 15 36. ARRANG JM, MORISSET S, GBAHOU F. Constitutive activity of  
16 the histamine H3 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 2007;  
17 **28**:350–357.
- 18 37. WALDHOER M, BOFILL-CARDONA E, MILLIGAN G et al. Dif-  
19 ferential uncoupling of A1 adenosine and D2 dopamine  
20 receptors by suramin and didemethylated suramin (NF037).  
21 *Mol Pharmacol* 1998; **53**:808–818.
- 22 38. BEINDL W, MITTERAUER T, HOHENEGER M et al. Inhibition  
23 of receptor/G protein coupling by suramin analogues. *Mol*  
24 *Pharmacol* 1996; **50**:415–423.
- 25 39. MASANA MI, DUBOCOVICH ML. Melatonin receptor signal-  
26 ing: finding the path through the dark. *Sci STKE* 2001;  
27 **2001**:pe39.
- 28 40. MAURICE P, DAULAT AM, TURECEK R et al. Molecular  
29 organization and dynamics of the melatonin MT receptor/  
30 RGS20/G(i) protein complex reveal asymmetry of receptor  
31 dimers for RGS and G(i) coupling. *EMBO J* 2010; **29**:3646–  
32 3659.
- 33 41. MONOD J, WYMAN J, CHANGEUX JP. On the Nature of Allo-  
34 steric Transitions: a Plausible Model. *J Mol Biol* 1965; **12**:88–  
35 118.
- 36 42. PETERS MF, KNAPPENBERGER KS, WILKINS D et al. Evalua-  
37 tion of cellular dielectric spectroscopy, a whole-cell, label-free  
38 technology for drug discovery on Gi-coupled GPCRs. *J Bio-*  
39 *mol Screen* 2007; **12**:312–319.
- 40 43. VERDONK E, JOHNSON K, MCGUINNESS R et al. Cellular  
41 dielectric spectroscopy: a label-free comprehensive platform  
42 for functional evaluation of endogenous receptors. *Assay Drug*  
43 *Dev Technol* 2006; **4**:609–619.
- 44 44. KOKKOLA T, SALO OM, POSO A et al. The functional role of  
45 cysteines adjacent to the NRY motif of the human MT1  
46 melatonin receptor. *J Pineal Res* 2005; **39**:1–11.
- 47 45. DUBOCOVICH ML, MASANA MI, IACOB S et al. Melatonin  
48 receptor antagonists that differentiate between the human  
49 Mella and Mellb recombinant subtypes are used to assess the  
50 pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic  
51 heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997;  
52 **355**:365–375.
- 53 46. SOARES JM JR, MASANA MI, ERSAHIN C et al. Functional  
54 melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the es-  
55 trous cycle. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **306**:694–702.
- 56 47. NONNO R, PANNACCI M, LUCINI V et al. Ligand efficacy and  
57 potency at recombinant human MT2 melatonin receptors:  
58 evidence for agonist activity of some mtl-antagonists. *Br J*  
59 *Pharmacol* 1999; **127**:1288–1294.
- 60 48. KENAKIN T. Functional selectivity in GPCR modulator  
61 screening. *Comb Chem High Throughput Screen* 2008; **11**:337–  
343.
- 49 49. MEWES T, DUTZ S, RAVENS U et al. Activation of calcium  
currents in cardiac myocytes by empty beta-adrenoceptors.  
*Circulation* 1993; **88**:2916–2922.
- 50 50. GÖTZE K, JAKOBS KH. Unoccupied beta-adrenoceptor-in-  
duced adenylyl cyclase stimulation in turkey erythrocyte  
membranes. *Eur J Pharmacol* 1994; **268**:151–158.
- 51 51. HILF G, JAKOBS KH. Agonist-independent inhibition of G  
protein activation by muscarinic acetylcholine receptor  
antagonists in cardiac membranes. *Eur J Pharmacol* 1992;  
**225**:245–252.
- 52 52. VARMA DR, SHEN H, DENG XF et al. Inverse agonist activities  
of beta-adrenoceptor antagonists in rat myocardium. *Br J*  
*Pharmacol* 1999; **127**:895–902.
- 53 53. NOGUERA MA, IVORRA MD, D'OCÓN P. Functional evidence  
of inverse agonism in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*  
1996; **119**:158–164.
- 54 54. WIELAND K, BONGERS G, YAMAMOTO Y et al. Constitutive  
activity of histamine h(3) receptors stably expressed in SK-N-  
MC cells: display of agonism and inverse agonism by H(3)  
antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **299**:908–914.



L'article était centré sur les récepteurs humains et seule une partie des résultats obtenus chez le rat et l'ovin ont été inclus. L'objectif général est de déterminer si l'activité constitutive est un phénomène général des récepteurs MT. Cette partie a donc pour objet de compléter cet article d'une part en décrivant l'activité constitutive des récepteurs MT de rat et ovin et, d'autre part, en identifiant des agonistes inverses.

Le niveau d'activité constitutive des récepteurs couplés aux protéines G est mesuré par le test de liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS. En absence de mélatonine, ce test montre l'activité basale, ou constitutive du récepteur, alors que l'utilisation de la mélatonine permet de mesurer la réponse maximale des protéines G couplés aux récepteurs MT. Dans ces conditions, les cellules CHO-K1 exprimant de façon stable les récepteurs rMT<sub>1</sub> et rMT<sub>2</sub> montrent une liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS de 637.1 ± 23.47 et 79.74 ± 4.24 fmol.mg<sup>-1</sup> de protéines, respectivement, alors que les cellules CHO-K1 natives montrent une liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS de 40.41 ± 0.62 fmol.mg<sup>-1</sup> de protéines. Ceci suggère que les récepteurs rMT<sub>1</sub> et rMT<sub>2</sub> possèdent une activité spontanée en absence de mélatonine. Pour les récepteurs oMT<sub>1</sub> et oMT<sub>2</sub> exprimés stablement dans la lignée CHO-K1, la liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS s'élève à 59.08 ± 2.97 et 319.6 ± 9.63 fmol.mg<sup>-1</sup> de protéines, respectivement. Ces valeurs suggèrent que les récepteurs oMT<sub>1</sub> et oMT<sub>2</sub> comme les récepteurs de rat possèdent une activité constitutive. En présence de 5μM de mélatonine, la liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS s'élève à 1218 ± 29.97 et 189.4 ± 7.095 fmol.mg<sup>-1</sup> de protéines pour les récepteurs rMT<sub>1</sub> et rMT<sub>2</sub> et à 316.3 ± 6.64 et 728.1 ± 41.77 fmol.mg<sup>-1</sup> de protéines pour les récepteurs oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> (Figure 2 de l'article). L'ensemble de ces résultats montrent que les récepteurs MT de rat et ovin possèdent une activité constitutivement et que celle-ci recouvre 52%, 42%, 18% et 44% de l'activité maximale des récepteurs rMT<sub>1</sub>, rMT<sub>2</sub>, oMT<sub>1</sub> et oMT<sub>2</sub>, respectivement.

Il est clairement établi que l'activité constitutive des récepteurs couplés aux protéines G est portée par le couplage puissant entre les protéines G et les récepteurs. La force de ce couplage est mesurée par l'IC<sub>50</sub> de la suramine, agent découplant les récepteurs des protéines G (Roka, 1999). La figure 6 montre l'effet dose-dépendant de la suramine sur la liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS sur les cellules CHO-K1 exprimant le récepteur rMT<sub>2</sub>. L'IC<sub>50</sub> de la suramine pour ces expériences est de 10.2 ± 3.24 μM en conditions basales et de 13.0 ± 2.01 μM en conditions de stimulation par la mélatonine. Des expériences similaires ont été conduites sur les CHO-K1-rMT<sub>1</sub>, CHO-K1-oMT<sub>1</sub>, CHO-K1-oMT<sub>2</sub> et CHO-K1 natives. Ces expériences montrent des valeurs d'IC<sub>50</sub> allant de 80.7 ± 5.47 μM pour CHO-K1-oMT<sub>1</sub> à 10.2 ± 3.24 μM



**Figure 6 :** Effet dose-dépendant de la suramine sur la liaison du [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S sur CHO-K1-rMT<sub>2</sub>. L'activité des protéines G, représentée par la liaison du [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S (fmol/mg), est évaluée en absence (symbole ▽ ) ou en présence (symbole ■) de 5 μM de mélatonine.

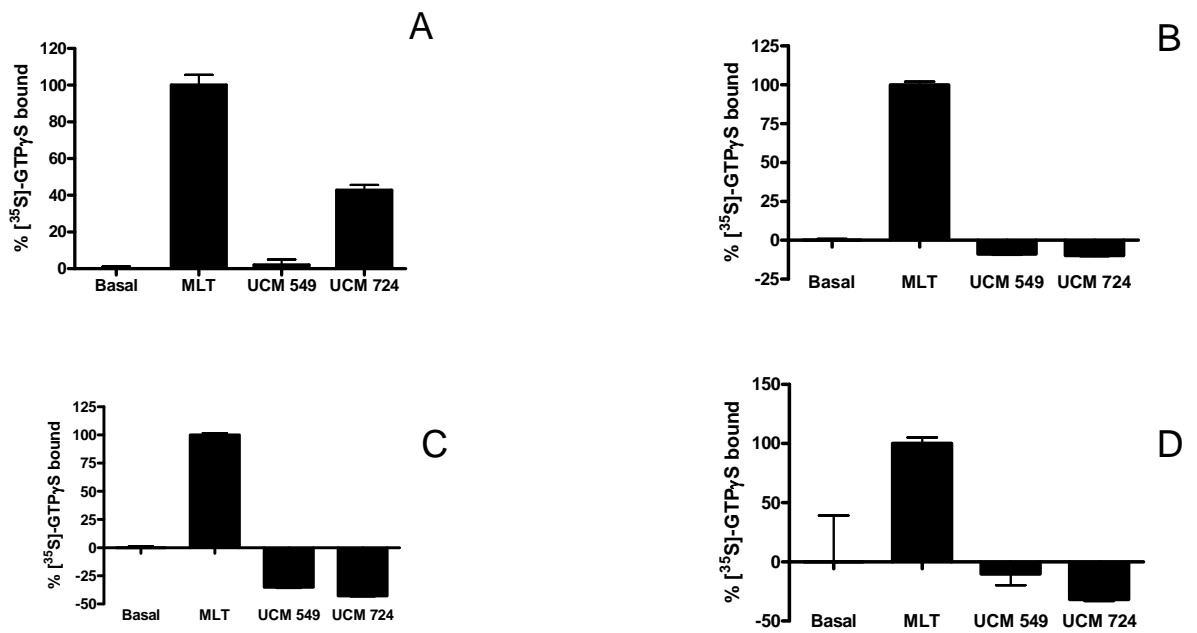
IC <sub>50</sub> de la suramine (M)	Native	hH <sub>3</sub>	rMT <sub>1</sub>	rMT <sub>2</sub>	oMT <sub>1</sub>	oMT <sub>2</sub>
<b>Basal</b>	1.56.10 <sup>-5</sup> ± 1.13	1.04.10 <sup>-5</sup> ± 4.87	7.46.10 <sup>-5</sup> ± 2.81	1.02.10 <sup>-5</sup> ± 3.24	8.07.10 <sup>-5</sup> ± 5.47	4.76.10 <sup>-5</sup> ± 1.60
<b>Agoniste naturel</b>	2.17.10 <sup>-5</sup> ± 1.12	6.57.10 <sup>-6</sup> ± 3.71 (histamine)	1.22.10 <sup>-4</sup> ± 1.76 (mélatonine)	1.30.10 <sup>-5</sup> ± 2.01 (mélatonine)	1.90.10 <sup>-4</sup> ± 3.19 (mélatonine)	5.02.10 <sup>-5</sup> ± 1.34 (mélatonine)

**Table 2: Valeurs des IC<sub>50</sub> de la suramine pour différents récepteurs.** Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de la suramine, représentées par la liaison du [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S, sont évaluées en absence (conditions basales) et en présence de mélatonine et avec des concentrations croissantes de suramine. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont exprimées en molaire avec l'erreur standard. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont représentatives d'une expérience (en duplicat) répétée trois fois.

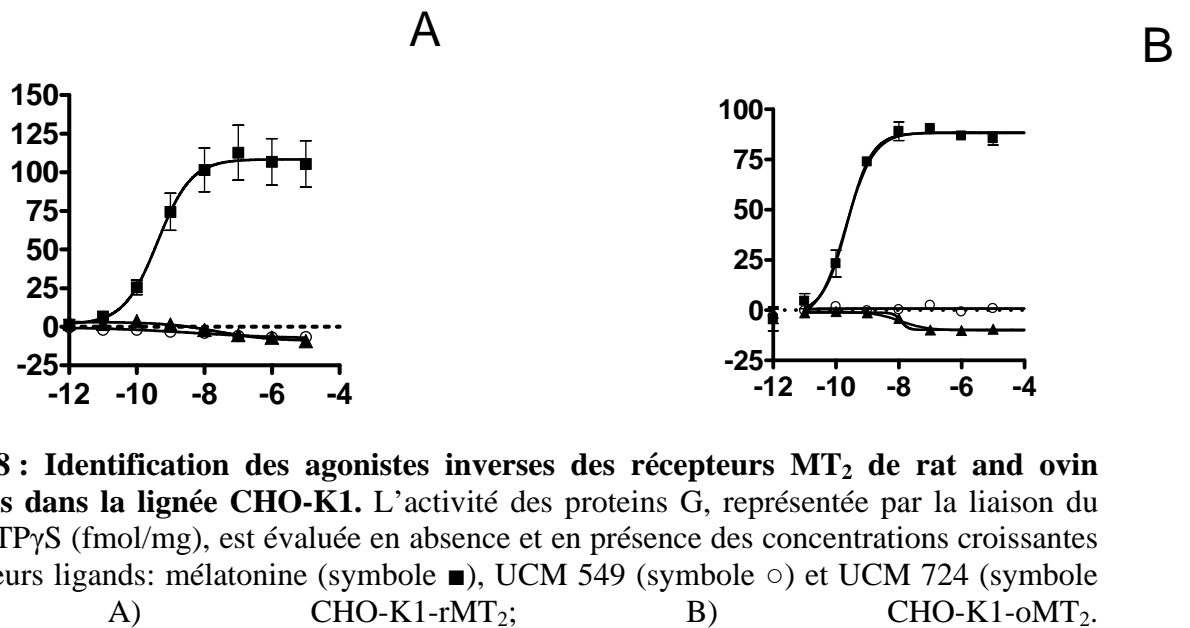


pour CHO-K1-rMT<sub>2</sub>. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de la suramine pour le récepteur à l'histamine H3 est de 10.4 ± 4.87 μM en conditions basales et de 6.57 ± 3.71 μM en conditions de stimulation par l'histamine (Table 2). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de la suramine obtenues pour les récepteurs MT de rat et ovin sont du même ordre de grandeur d'une part, que les valeurs des récepteurs MT humaines et d'autre part, que les valeurs obtenues pour le récepteur H3, qui est connu pour être constitutivement actif. Cette approche nous permet d'établir l'existence d'un couplage puissant des récepteurs MT avec les protéines G associées. Ceci est un argument supplémentaire dans l'existence d'une activité constitutive des récepteurs oMT et rMT.

Deux molécules UCM 549 et UCM 724, initialement connues pour être des antagonistes du récepteurs hMT<sub>1</sub> (Spadoni et al., 2007), ont été identifiées comme des agonistes inverses du récepteur hMT<sub>2</sub> (Figure 5 de l'article). UCM 549 et UCM 724 diminue la liaison basale du [<sup>35</sup>S]-GTPγS des cellules CHO-K1-rMT<sub>2</sub> de 9% et de 10%, respectivement. Ces composés diminuent également la liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS des cellules CHO-K1-oMT<sub>2</sub> de 10% et de 32%, respectivement. Ces molécules ne semblent pas être des agonistes inverses du récepteur rMT<sub>1</sub>. En revanche, elles se comportent comme des agonistes inverses sur le récepteur oMT<sub>1</sub>, en diminuant la liaison basale du [<sup>35</sup>S]-GTPγS de 35% et de 43%, respectivement (Figure 7). Avec la figure 8, nous confirmons par spectroscopie diélectrique cellulaire que les molécules UCM 549 et UCM 724 présentent des propriétés agonistes inverses sur les récepteurs oMT<sub>2</sub> et rMT<sub>2</sub>.



**Figure 7: Identification des agonistes inverses des récepteurs MT de rat et ovin exprimés dans la lignée CHO-K1.** L'activité des protéines G, représentée par le pourcentage de  $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$  lié, est évaluée en absence ou en présence de plusieurs ligands : 5  $\mu\text{M}$  de mélatonine, 0.1  $\mu\text{M}$  de UCM 549 et 0.1  $\mu\text{M}$  de UCM 724. Les données brutes sont normalisées avec le niveau basal de l'activité des protéines G comme 0% et l'activité des protéines G stimulées par la mélatonine comme 100%. Les histogrammes représentent chacun une expérience répétée trois fois. Les points de données et les barres d'erreur représentent la moyenne des triplicats et l'erreur standard, respectivement. A) CHO-K1-rMT<sub>1</sub>; B) CHO-K1-rMT<sub>2</sub>; C) CHO-K1-oMT<sub>1</sub>; D) CHO-K1-oMT<sub>2</sub>.



**Figure 8: Identification des agonistes inverses des récepteurs MT<sub>2</sub> de rat and ovin exprimés dans la lignée CHO-K1.** L'activité des protéines G, représentée par la liaison du  $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$  (fmol/mg), est évaluée en absence et en présence des concentrations croissantes de plusieurs ligands: mélatonine (symbole ■), UCM 549 (symbole ○) et UCM 724 (symbole ▲).

## Conclusion

Dans nos conditions expérimentales, nous avons réussi à mettre en évidence l'existence d'une activité constitutive des récepteurs hMT<sub>1</sub> et hMT<sub>2</sub> exprimés de façon stable dans les lignées cellulaires CHO-K1 et Neuro2A. Les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> de rat et ovin exprimés de façon stable dans la lignée CHO-K1 présentent également la capacité à s'activer spontanément en absence de mélatonine. D'une façon générale, l'activité constitutive des récepteurs mélatoninergiques serait portée essentiellement par un couplage des récepteurs avec les protéines Gi. Nous avons montré que plusieurs facteurs pouvaient moduler le niveau d'activité constitutive. D'une part, le niveau de cette activité constitutive est influencé par la nature de la lignée cellulaire, puisqu'il est plus important pour les récepteurs hMT exprimés dans la lignée Neuro2A que dans la lignée CHO-K1. D'autre part, le niveau d'expression du récepteur influence le degré d'activité constitutive. Ainsi, l'environnement cellulaire est essentiel pour l'établissement de l'activité constitutive des récepteurs de la mélatonine.

L'identification d'agonistes inverses permet de corroborer l'existence d'une activité constitutive pour les récepteurs MT<sub>2</sub> humain, ovin et de rat. Deux molécules, UCM 549 et UCM 724, se comportent comme des agonistes inverses pour ces récepteurs.



Troisième partie:  
Inhibition spécifique des récepteurs de la  
mélatonine par une approche d'ARN  
interférent



# Introduction

Les récepteurs de la mélatonine sont largement décrits dans la littérature, ainsi que leurs voies de signalisation. Néanmoins, aucun anticorps spécifique ni même de ligand sélectif ne sont disponibles. Afin d'étudier les voies de signalisation et le(s) rôle(s) respectif(s) des récepteurs mélatoninergiques, nous avons mis au point une approche originale basée sur le principe d'ARN interférence. L'objectif est d'inhiber spécifiquement les récepteurs de la mélatonine exprimés de façon stable dans la lignée cellulaire CHO-K1 et dans des cultures primaires de *pars tuberalis*, structure cérébrale très riche en récepteurs MT. Cette approche technique permet même d'envisager son utilisation ultérieure *in vivo*.

Notre approche pour cette étude a été de valider l'efficacité des siRNA aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau fonctionnel. La quantité relative d'ARNm codant pour les récepteurs ovins MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> a été mesurée dans la lignée CHO exprimant de façon stable ces récepteurs ainsi que dans des cultures primaires de *pars tuberalis* ovine ayant subi ou non un traitement avec les siRNA par RT-PCR en temps réel. La fonctionnalité des récepteurs suite à un traitement avec des siRNA a été évaluée à l'aide d'un test de saturation avec la 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-mélatonine, en mesurant la capacité de liaison de ces récepteurs. L'effet des siRNA dirigés contre les récepteurs mélatoninergiques sur la signalisation AMPc a également été évalué, par un dosage ELISA et par Western-Blot.





**Targeting knock-down of ovine melatonin receptors using RNA interference in CHO  
cells**

Séverine Devavry<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Catherine Taragnat<sup>1,2,3,4,5</sup>, Martine Migaud<sup>1,2,3,4,5</sup>, Philippe Delagrangé<sup>7</sup>, Olivier Nosjean<sup>6</sup>, Jean Boutin<sup>6</sup>, Benoît Malpoux<sup>1,2,3,4,5</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup> CNRS, UMR6175, F-37380 Nouzilly, France

<sup>3</sup> Université de Tours, F-37041 Tours, France

<sup>4</sup> Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

<sup>5</sup> IFR135 Imagerie Fonctionnelle, F-37044 Tours, France

<sup>6</sup> Biotechnologies, Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Institut de Recherches Servier, F-78290 Croissy-sur-Seine, France

<sup>7</sup> Unité de Recherches et Découvertes en Neurosciences, Institut de Recherches Servier F-78290 Croissy-sur-Seine, France



## *Abstract*

The ovine species is an animal model for study of seasonality of reproduction. It is well established that ovine melatonin receptors, oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub>, are expressed in several brain areas, particularly in *pars tuberalis* and in premamillary hypothalamus, both target of melatonin for the control of reproduction. The question of respective involvement of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> in the control of reproductive seasonality has yet to be resolved. In the absence of specific and selective ligands for MT receptors, we choosed to develop an approach using RNA interference to discriminate the respective roles of MT receptors. First, siRNAs designed to target MT<sub>1</sub> or MT<sub>2</sub> were assessed in CHO-K1 cell lines stably expressing oMT<sub>1</sub> or oMT<sub>2</sub> receptors. After siRNA treatment, binding capacity ( $B_{max}$ ), but not affinity (Kd), of oMT<sub>1</sub> as well as oMT<sub>2</sub> receptors for melatonin was significantly decreased. Similarly, relative quantity of mRNA encoding for ovine MT receptors decreased after treatment with siRNA. However, no effect of siRNA treatment was observed on cAMP signalling and on phosphorylation of ERK proteins. Possible reasons of this absence of effect are discussed in this article.



## *Introduction*

Melatonin is a neurohormone synthesized and secreted by the pineal gland only during the night. The most definitive physiological role of melatonin is to convey information about day length (photoperiod) to body physiology for the organization of functions that vary with season, such as reproduction, pelage, appetite, body weight, and sleep (reviewed in Dubocovich et al., 2010). Other roles were admitted to melatonin at high concentrations (micromolar and beyond), like anti-oxidative, anti-mitotic or immunological properties (Drazen and Nelson, 2001; Mao et al., 2010; Sliwinski et al., 2007).

Melatonin acts through three main targets: two G protein-coupled, seven-transmembrane receptors (MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub>) and one atypical binding site called MT<sub>3</sub>. This last binding site has been purified in our laboratory and is designated as quinone reductase 2 (QR2) (Nosjean et al., 2000). Collectively, the repertoire of G protein-dependent signalling pathways activated by MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors is very similar. Signal-transduction pathways triggered by MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors were characterized and involve the activation of both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. Indeed, both receptors preferentially couple to Gi proteins. MT<sub>1</sub>, and most likely MT<sub>2</sub>, couple also to Gq/11 proteins, although to a lesser extent (Brydon et al., 1999b; Jarzynka et al., 2006). G protein activation of the MT<sub>1</sub> receptor modulates several signal-transduction pathways. Melatonin typically inhibits forskolin-stimulated cAMP formation (Brydon et al., 1999a; Brydon et al., 1999b), protein kinase A activity (Morgan et al., 1994; Witt-Enderby et al., 1998) and phosphorylation of the cAMP-responsive element binding (CREB) (McNulty et al., 1994; McNulty et al., 1996; Witt-Enderby et al., 1998). Activation of the MT<sub>1</sub> receptor also increases the phosphorylation of the mitogen activated protein kinase kinases 1 and 2 (MEK1 and MEK2), the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) (Witt-Enderby et al., 2000) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins (Chan et al.,



2002). Similarly, activation of the MT<sub>2</sub> receptor inhibits forskolin-stimulated cAMP production (MacKenzie et al., 2002; Reppert and Weaver, 1995) and stimulates JNK (Chan et al., 2002) and phosphoinositide turnover (MacKenzie et al., 2002).

In seasonally breeding animals, there is unequivocal evidence that melatonin, through its daily duration of secretion, is the primary transducer of photoperiodic information to the neuroendocrine axis (Malpaux, 2006). Sheep is a relevant and widely used species for *in vivo* studies on melatonin as it is less distantly related to human than rodents in terms of diurnal/nocturnal behaviour. Recent cloning of oMT<sub>2</sub> receptor (Coge et al., 2009) from ovine retina allows to study the pharmacology of two sub-types of ovine melatonin receptors. Unfortunately, specific and selective ligands were not available to study respective role of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. An alternative approach consists in using siRNA methodology to inhibit specifically one subtype of melatonin receptor. Known since 1998 as small interfering RNA (siRNA), this physiological tool allows a transient but potent inhibition of specific gene expression. This phenomenon is based on the delivery of double-stranded RNA (dsRNA) into cells that causes degradation of the complementary mRNA (Hammond et al., 2000). In cells, the siRNA further assembles with protein components into a RNA-induced silencing complex (RISC), that will ultimately cause the degradation of the corresponding target mRNA. RNAi approach enables to perform a cellular knock-down of MT<sub>1</sub> and/or MT<sub>2</sub> receptors. RNAi is therefore a valuable tool for gene function discovery both *in vitro* and *in vivo* or for future potential therapy. The aim of the study was to determine whether siRNA molecules could specifically target MT<sub>1</sub> or MT<sub>2</sub> mRNA for knock-down in Chinese human ovary cells expressing MT<sub>1</sub> or MT<sub>2</sub>. This would be of benefit to decipher functions of MT<sub>1</sub> and/or MT<sub>2</sub> receptors and more particularly implication of each MT receptors in signalling pathway.





## *Materiels and methods*

### **Reagents**

Ham F12 Glutamax, foetal bovine serum, geneticin. All culture media were from Invitrogen (Carlsbad, CA).

### **CHO-K1-oMT culture**

CHO-K1 cells stably expressing oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> receptors were grown in Ham F12 Glutamax medium supplemented with 10% foetal bovine serum and 400 µg/mL geneticin (Audinot et al., 2008). CHO-K1-oMT cells were transfected with siRNAs directed against oMT receptors or control siRNA as described below.

### **siRNA design**

All siRNAs were chemically synthesized by Invitrogen. Three siRNA sequences designed to target oMT<sub>1</sub> receptor mRNA were used: 5'AAUUCGUGCCGCUAUACAGCUUGCC3' (named siRNA 502), 5'CCGAUGCUCGUAGUCGUCUUCUGUU3' (named siRNA 691) and 5'UGGCUGUUUGUGGCUAGUUACUAUA3' (named siRNA 919). Each siRNA possessed its own control siRNA, described as follows: 5'GGCUCGAUGGAUGGCCACAGAAAUU3' (named control siRNA 502), 5'CCGGCUCGUAGUCGUCUUCUAUGUU3' (named control siRNA 691) and 5'UGGUUGUGUCGGGAUAAUUCUAUA3' (named control siRNA 919). Three siRNA sequences designed to target oMT<sub>2</sub> receptor mRNA were used: 5'CAGGUAACCUGUUCUUGGUGAGUCU3' (named siRNA 735), 5'UGAGCAUGUUCGUGGUCUUUGUGAU3' (named siRNA 1266) and 5'ACGCCAUCUAUCUAUGGGCUCCUGAA3' (named siRNA 1425). Each siRNA possessed its own control siRNA, described as follows: 5'CAGCAAGUCCUUGUUGUGGAGUUCU3' (named control siRNA 735),



5'AUCCGAACAAAGCCCAAGCAUAUCA3' (named control siRNA 1266) and 5'ACGACUAAUCUGGGUCCUCUCCGAA3' (named control siRNA 1425).

### **siRNA knockdown of oMT receptors level**

For transfection, CHO-K1-oMT<sub>1</sub> and CHO-K1-oMT<sub>2</sub> cells grown at 30% confluence in Ham F12 Glutamax medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (400 µg/mL geneticin) in 24-well plates (for qRT-PCR) and in Petri dish 100mm (for binding assay) were transfected with 20 nM siRNA using GeneSilencer (Gene Therapy Systems, Inc) according to the manufacturer's instructions. Fluorescent nonspecific siRNA (BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo, Invitrogen, Carlsbad, CA) was used to evaluate the transfection efficiency.

Forty-eight hours after transfection, cells were used either for 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-melatonin binding assay or for total RNA extraction procedure, as described as follows.

### **2-[<sup>125</sup>I]-iodo-melatonin binding assay**

Cells were removed with trypsin and centrifuged at 900 rpm for 10 min. The resulting cell pellet was suspended in binding buffer (Tris/HCl 50mM, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA) in order to obtain a solution with 13 000 cells/ml. Cells were incubated for 2 h at 37°C in binding buffer in a final volume of 250 µl containing 2-[<sup>125</sup>I]-melatonin (specific activity: 2500 Ci/mmol, PerkinElmer, Massachusetts, USA). Non-specific binding was defined with 1 µM melatonin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Falalvier, France). Reaction was stopped by rapid filtration through GF/B unifilters, (PerkinElmer, Massachusetts, USA), followed by three successive washes with ice-cold buffer. Data were analysed by using the program PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The density of binding sites



( $B_{\max}$ ) and the dissociation constant of the radioligand ( $K_D$ ) values were calculated using non-linear regression model.

### **Quantitative RT-PCR from CHO-K1-oMT**

Levels of mRNA for oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> receptors were measured using SYBR Green RT-PCR (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad). Total RNA from 10 cm<sup>2</sup> well (plated at 3×10<sup>6</sup> cells/well) was extracted using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 2 µg RNA in a volume of 20 µl containing 250 ng oligodT (Promega), 1 mM dNTPs, 40 U/µl of RNasin, 1x RT PCR buffer, and 200 U/µl M-MLV reverse transcriptase (Promega). For the negative control, the reverse transcriptase was omitted. The RNA denaturation was performed at 70 °C for 10 min, and the RT was performed at 37 °C for 1 h.

For PCR, each reaction consists of a final reaction volume of 20 µl containing iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) (1x), 3 µM of each gene-specific primer, and cDNA. Primers were designed using Beacon Designer Software (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA), and sequences are described in Table 1. The equivalent of 5–50 ng of starting RNA was used in each reaction. Each sample was assayed in duplicate. Quantitative real-time PCR was run on an iCycler from Bio-Rad. The amplification program consisted of 95 °C for 3 min followed by up to 34 cycles of 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 20 s. Annealing temperatures are given in Table 1.

Prior to analysis, amplification efficiency was determined for each gene by generating a standard curve using serial dilutions of the cDNA, obtained after reverse transcriptase of the RNA, in abscissa and the corresponding cycle threshold ( $C_t$ ) in ordinate. The slope of the log-linear phase reflects the amplification efficiency derived from the formula  $E=(10^{-\text{slope}}-1)\times 100$ .



Amplification efficiency was around of 80%, and was equivalent for test gene and the reference gene. Amplification was followed by melting curve analysis for each primer pair to verify the presence of one gene-specific peak and the absence of primer dimers. PCR products obtained with each set of primers were run on an agarose gel, and visualized using ethidium bromide and u.v. illumination to confirm amplification of a single product of the correct size. This was followed by sequencing each amplicon to confirm the identity of amplified product, and the results were matched with the National Center for Bioinformatics Computing (NCBI-BLAST) database. Quantification of specific mRNA levels was performed by the  $\Delta\Delta C_t$  method with the internal reference gene *18S* (Bulletin #2; PE Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### **cAMP assay ELISA**

CHO-K1 cells stably expressing either the  $\text{oMT}_1$  or  $\text{oMT}_2$  receptors grown to 50% confluence in 24-well plates were transfected with siRNA as previously described. Cells were incubated for 1 h with increasing concentrations of melatonin in the presence of 100  $\mu\text{M}$  IBMX with or without 10 nM forskoline at 37 °C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  incubator. After removing supernatant, cells were washed with phosphate buffer saline and lysed with 0,1M HCl. Intracellular cAMP was measured using a commercially available cAMP ELISA kit (Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. This assay is based on the competition between the cAMP from our sample and a cAMP tracer for a cAMP-specific rabbit antibody. The tracer is conjugated to acetylcholinesterase (AChE). The antibody –cAMP complex binds to a mouse anti-rabbit antibody and the resulting complex is revealed by a colorimetric reaction using a substrate to AChE. The intensity of the colour, determined spectrophotometrically is inversely proportional to the amount of free cAMP present in the sample.





### **Western-Blot analysis**

CHO-K1 cells stably expressing either the oMT<sub>1</sub> or oMT<sub>2</sub> receptors grown to 50% confluence in 24-well plates were transfected with siRNA as previously described. Cells were serum-starved during 4 hours and were stimulated during 15 min with concentrations of melatonin (10<sup>-8</sup> or 10<sup>-10</sup>M) in absence or presence of 10<sup>-8</sup>M forskolin. Cells were then lysed in lysis buffer and equivalent amounts of protein were electrophoresed on 10% SDS polyacrylamide gel, transferred to immobilon P membranes. The membranes were incubated overnight at 4 °C with anti-phospho-ERK 1/2 (1:3000) and then with secondary anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Biosource International, Armadillo, CA, USA). Signal was developed using the Pierce ECL Western Blotting detection kit (Rockford, IL, USA). To confirm that equal protein amount was loaded, the membranes were stripped and reprobed using a primary polyclonal antibody against total ERK2 (1:10,000).

### **Statistical analysis**

Statistical analysis of the data was performed with one-way ANOVA. When significant differences were found, means were compared by Bonferroni's multiple-comparison tests).



## *Results*

### **Efficacy of siRNA transfection in CHO-K1-oMT cells**

The efficiency of siRNA transfection in CHO-K1-oMT<sub>1</sub> and CHO-K1-oMT<sub>2</sub> cells was evaluated using Alexa Fluor red-labeled nonspecific siRNA. As observed in figure 1, fluorescence was found in cytoplasm of CHO-K1-oMT cells and around 50% of cells appeared fluorescent.

### **Inhibition of binding capacity of melatonin receptors expressed in CHO-K1**

While  $B_{\max}$  of CHO-oMT<sub>1</sub> untreated or treated with control siRNA 502 or control siRNA 691 were  $56.18 \pm 8.93$ ,  $61.70 \pm 21.27$  and  $51.16 \pm 21.48$  fmol.mg<sup>-1</sup> of membrane protein, respectively,  $B_{\max}$  of CHO-oMT<sub>1</sub> treated with siRNA 502 or 691 fall to  $31.07 \pm 6.04$  and  $24.90 \pm 4.01$  fmol.mg<sup>-1</sup> of membrane protein ( $p < 0.001$ , figure 2A). These values represented an inhibition of 50% and 51%, respectively, in the binding capacity of oMT<sub>1</sub> after cell treatment with siRNA compared to control siRNA. Treatment with siRNA 919 did not modify the  $B_{\max}$  of CHO-oMT<sub>1</sub> cells compared to control. Treatment of CHO-oMT<sub>2</sub> with siRNA 1425 decreased the binding capacity of oMT<sub>2</sub> ( $p = 0.01$ ) (figure 2B). The  $B_{\max}$  values of CHO-oMT<sub>2</sub> untreated or treated with control siRNA 1425 were  $69.65 \pm 11.36$  and  $98.67 \pm 0.62$  fmol.mg<sup>-1</sup> of membrane protein and fell to  $29.16 \pm 1.13$  fmol.mg<sup>-1</sup> of membrane protein after treatment of CHO-oMT<sub>2</sub> siRNA 1425. These values corresponded to a reduction of around 70% in the binding capacity of oMT<sub>2</sub> after a treatment with siRNA compared to corresponding control siRNA. Concerning the siRNA 736, it decreased the binding capacity of oMT<sub>2</sub> receptor of around 60%. Treatment with siRNA 1266 appeared to decrease the  $B_{\max}$  of CHO-oMT<sub>2</sub> of around 70% compared to non transfected cells. However, the  $B_{\max}$  obtained with the control siRNA 1266 was very variable from one experiment to another.



The affinity of melatonin receptors for 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-melatonin was not modified by siRNA treatment. Values of K<sub>d</sub> were comparable between control and siRNA treated cells (figure 2C and 2D). K<sub>d</sub> values for oMT<sub>1</sub> were comprised between 30.92 and 91.36 pM (p=0.13) (figure 2C) For oMT<sub>2</sub>, K<sub>d</sub> values were comprised between 4.83 and 14.34 pM (figure 2D). No significant difference was observed.

Considering these results, siRNA 502 and siRNA 1425 were selected to perform the following experiments.

### **Decrease of relative quantity of mRNA coding for ovine melatonin receptors**

Total RNA of cells transfected with siRNA was analyzed by real-time RT-PCR and standardized by the level of 18S mRNA in each sample. In CHO-K1-oMT<sub>1</sub> cells, the relative concentration of oMT<sub>1</sub> mRNA decreased in a significant manner after treatment with siRNA 502 (p=0.007) (Figure 3A). A 60% inhibition was observed. Control siRNA did not modify the levels of oMT<sub>1</sub> mRNA compared to non transfected conditions. In CHO-K1-oMT<sub>2</sub> cells, the levels of oMT<sub>2</sub> mRNA tended to decrease of 70% after treatment with siRNA 1425 (p=0.059) (Figure 3B). Control siRNA did not modify the levels of oMT<sub>2</sub> mRNA compared to control conditions.

### **Inhibition of functionality of melatonin receptors**

#### *Effect on cAMP signalling*

Melatonin receptors are coupled to Gi protein. Once activated by binding of melatonin, Gi protein inhibits activation of adenylate cyclase (AC), and consequently inhibits the production of cAMP from ATP. Visualization of activity of Gi protein is possible only after a treatment with forskolin (FSK), an activator of adenylate cyclase. CHO-K1 cells expressing oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> receptors were treated with corresponding siRNA. Intracellular cAMP production was



measured in 4 conditions: basal, MLT-stimulated, FSK-stimulated and FSK-MLT-stimulated. Figure 4 represents the ratio of the binding value of a sample to that of the maximum binding obtained in the absence of sample. This ratio is inversely proportional to the amount of cAMP present in the sample. As expected, MLT only had not effect on cAMP production whereas FSK reduced the ratio  $B/B_0$  indicating an increase in the production of cAMP. Values of percentage of  $B/B_0$  decreased to  $25.34 \pm 6.68 \%$  and  $36.17 \pm 23.96 \%$ , oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub>, respectively. In FSK-MLT-stimulated condition, MLT suppressed the effect of FSK on the level of cAMP ( $117.28 \pm 52.53 \%$  and  $100.69 \pm 20.28$ , for oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub>, respectively). Surprisingly, the treatment with oMT<sub>1</sub> or oMT<sub>2</sub> siRNAs did not affect the level of cAMP production (Figure 4).

#### *Effect on phosphorylation of ERK proteins*

G-protein activation of the MT receptors modulates several signal-transduction pathways. It was reported in CHO cells expressing human melatonin receptors that whether MLT typically inhibits FSK-stimulated cAMP production, PKA activity and phosphorylation of the cAMP-response element binding, it also increases the phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1 and ERK2). (Reviewed in: Jockers et al., 2008; Witt-Enderby et al., 2000). We chose this output to study the effect of siRNA designed to target oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> mRNA (Figure 5). The activation of the phosphorylation of ERK1/2 was followed by western blot analysis using an antibody which recognized the phosphorylated ERK1/2 with an apparent molecular weight of 42/44 kDa. Figure 5A and 5C shows that MLT induced the apparition of 42/44 kDa band in control cells or in cells treated with control siRNA. When cells were exposed to oMT<sub>1</sub> or oMT<sub>2</sub> siRNA and treated with MLT, the intensity of the band did not change suggesting that the level of phosphorylation of ERK





proteins was not modified in presence of siRNA designed to target oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> mRNA (Figure 5B and 5D).



## Discussion

In this present report, several siRNA molecules were assessed that were designed to target ovine MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptor mRNAs. Molecular mechanism of siRNA lies on degradation of the corresponding target mRNA, leading to inhibition of target protein production (Hammond et al., 2000). Firstly, the efficiency of siRNA transfection in CHO-K1-oMT<sub>1</sub> and CHO-K1-oMT<sub>2</sub> cells was evaluated using fluorescent nonspecific siRNA. Around 50% of cells appeared fluorescent suggesting that the transfection protocol allows the siRNAs to penetrate into cells. When siRNAs designed to target oMT receptors were used, the relative quantities of oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> mRNAs were studied. After cell treatment with siRNA 502 and siRNA 1425, inhibitions of around 60% and 70% respectively were observed. To study the impact of siRNA on binding capacity of MT receptors, a binding assay with 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin was performed. Assay of binding ensured that ovine melatonin receptors had partially lost the capacity of binding the 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin around of 50% and 70%, respectively for oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub>, after a siRNA treatment without modification of receptor affinity.

Despite the decrease in the levels of mRNA and in the binding capacity of oMT receptors, no effect of siRNA treatment was observed on signalling pathways of melatonin receptors. More specifically, cAMP production and phosphorylation of ERK proteins did not appear to be modified after treatment with siRNA against oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> receptors. Two explanations can be provided. First, siRNA against ovine MT receptors induced a cellular knock-down and not a knock-out. Population of persistent receptors can transmit the melatonin signal. In CHO-K1 cell line, the level of ovine melatonin receptors is supra-physiological with B<sub>max</sub> around 600 fmol/mg of proteins (Coge et al., 2009). In our experiment, the B<sub>max</sub> fell from around 80 to 20-50 fmol/mg proteins after siRNA induced knock-down. Other cell lines like Neuro2A or primary culture of *pars tuberalis* (PT) express a low level of melatonin receptors, with



respectively  $B_{max}$  of around 100 fmol/mg of proteins for human melatonin receptors (personal communication) and 50 fmol/mg of proteins for ovine melatonin receptors (Piketty and Pelletier, 1993). Behaviour of ovine melatonin receptors, in terms of affinity for melatonin, is similar in these cells and in CHO-K1 over-expressing melatonin receptors, with  $K_d$  found in the range of 10-25 pM in both cells (Coge et al., 2009; Piketty and Pelletier, 1993). These results indicate that the same “MLT” message can be transmitted both by a low or a high expression level of melatonin receptors. Secondly, one can argue that the signalling targets we studied were not specific of the melatonin even if they are involved in signalling pathway of melatonin receptors. Functionality of melatonin receptors was measured at level of cAMP production since the best-established effect of melatonin in mammalian cells is the inhibition of forskolin-induced cAMP synthesis (Morgan et al., 1995; Vanecek and Watanabe, 1998). However, cAMP is involved in several cellular mechanisms, for example cellular energetic pathway and plays a role in the signalling of other receptors constitutively expressed in CHO-K1 cell line, as PGE2 and ATP receptors coupled Gs and Gq proteins respectively (Verdonk et al., 2006). Another output of melatonin receptors signalling, phosphorylation of ERK1/2 was studied. Similarly to cAMP, these members of the family of mitogen-activated protein (MAP) kinases are activated by a number of different extracellular stimuli (Reviewed in: Cargnello and Roux, 2011). Another output of signalling pathway could be studied such as cAMP response element binding protein (CREB). Melatonin is known to downregulate the phosphorylation of CREB in ovine PT cells and in CHO-K1-hMT<sub>1</sub> cells (McNulty et al., 1994; Witt-Enderby et al., 1998). The phosphorylation of CREB in ovine PT cells is regulated through both cAMP-dependent and cAMP-independent mechanisms (McNulty et al., 1996). Further studies are necessary to improve the ability of siRNA to inhibit the MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> mRNAs and the binding capacity of the receptors in order to decipher the functional impact of these inhibitions.



Final aim of siRNA against oMT<sub>1</sub> and oMT<sub>2</sub> melatonin receptors is their use *in vitro* and *in vivo*. In our laboratory, we tried to apply the siRNA approach in primary culture of ovine *pars tuberalis* (PT). Because of its embryonic origin and its tissue composition, it is established that primary culture of PT is very difficult to transfect. However, according to the immunofluorescent cells detected after transfection of a fluorescent nonspecific siRNA, transfection protocol was successful. Nevertheless, results did not show any decrease in the relative quantity of MT<sub>1</sub> mRNA. Despite the fact that PT corresponds to the cerebral region the most abundant in melatonin receptors, the *in vitro* expression level of melatonin receptors was relatively low when observed by quantitative RT-PCR. Consequently, it was difficult to observe a decrease of mRNA encoding oMT receptors induced by siRNA treatment.

The use of siRNA *in vivo* should allow to distinguish the respective roles of MT receptors in reading of photoperiodic message. A technique of gene knockdown involving siRNA in the ovine brain was developed. With this method, one gene can be targeted in a well-defined area thanks to the size of the brain in this species. This corresponds to a gene therapy technique allowing a local brain effect lasting for several months. To achieve this, adeno-associated viruses (AAV) were chosen, which are non-pathogenic and tested in several species including rodents (Hommel et al., 2003), monkeys (Forsayeth et al., 2006) and humans (Manno et al., 2003). One successful attempt was performed in sheep (Dufourny et al., 2008). AAV have several advantages including a small genome, generation of highly stable proteins, and most importantly, different cell tropisms depending on their serotypes: AAV serotypes 1 and 2 infect only neurons while AAV serotype 5 infects both neurons and glial cells (Buning et al., 2003; Davidson et al., 2000). Such viruses represent adapted tools to transfer siRNA in the brain.





Figures

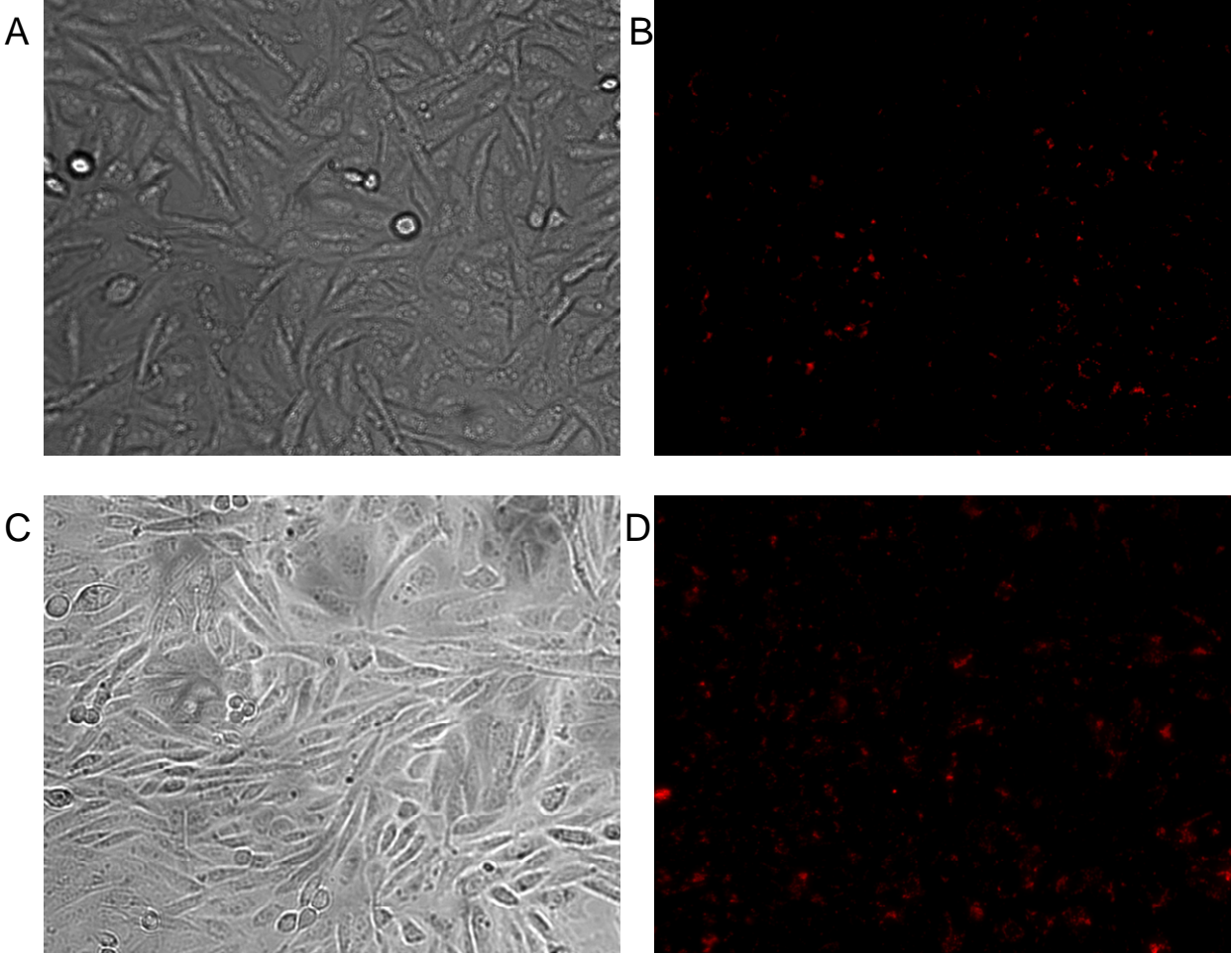


Figure 1



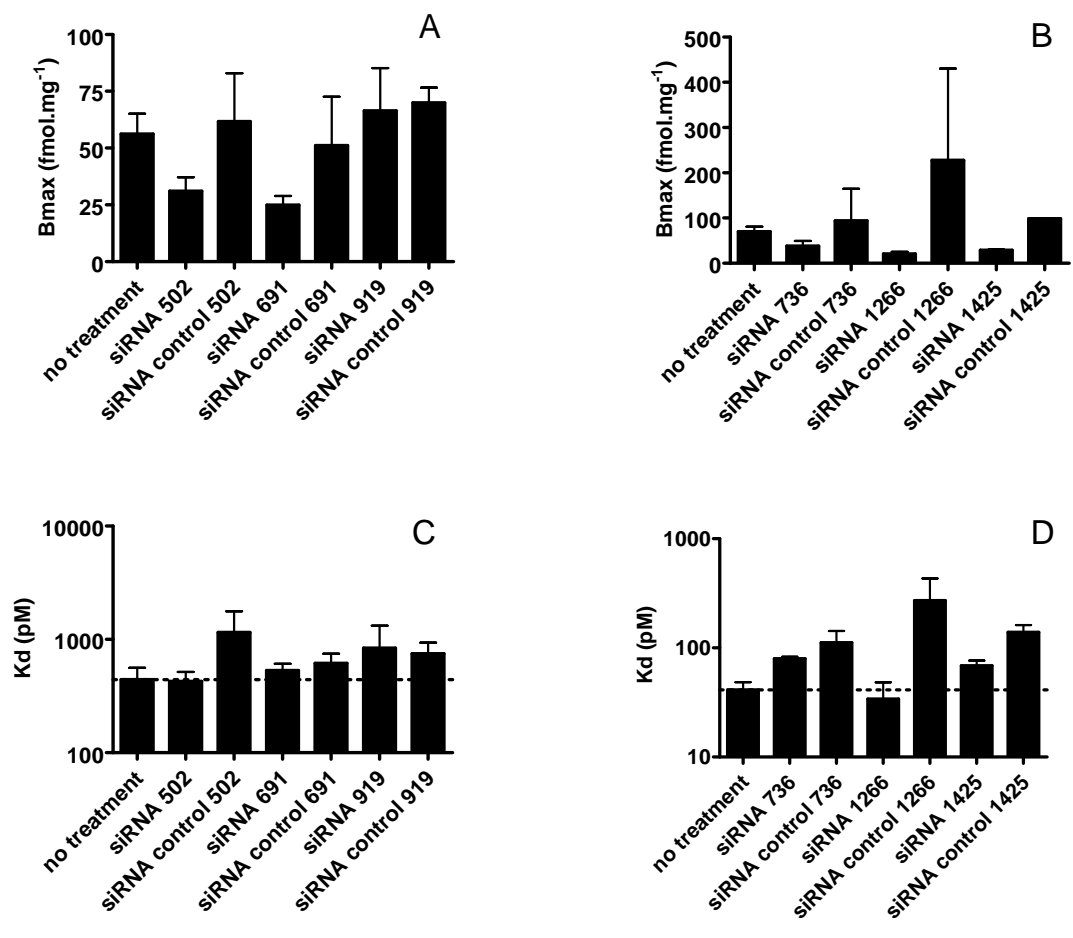


Figure 2



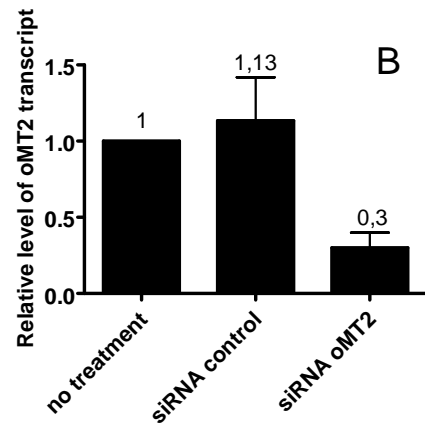
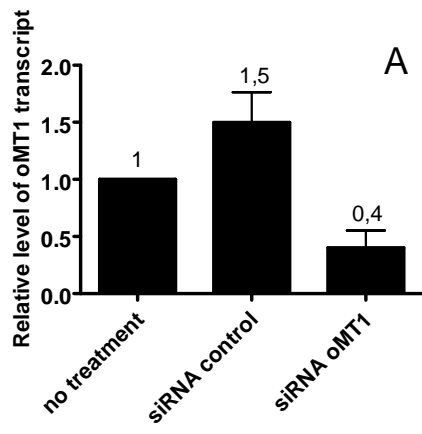


Figure 3



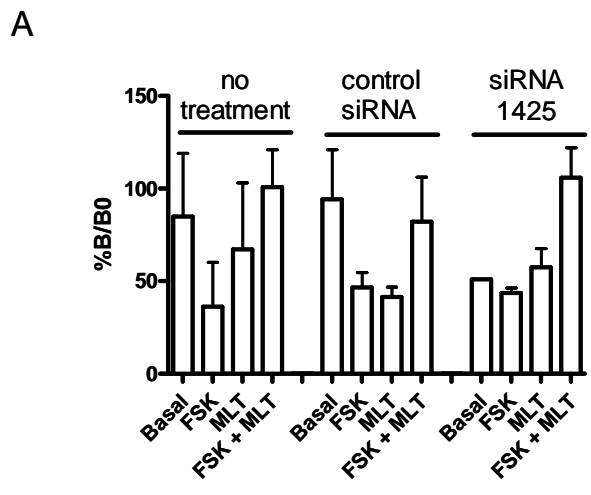
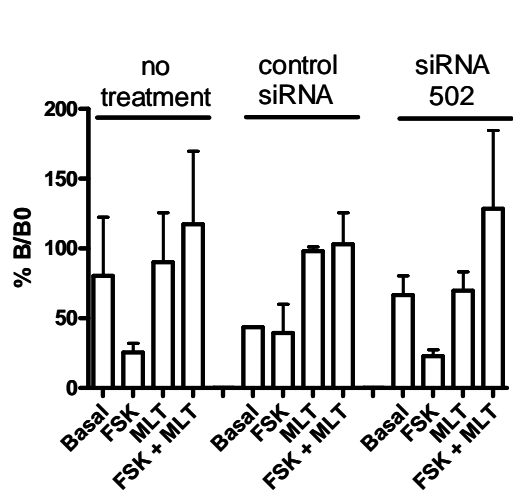


Figure 4





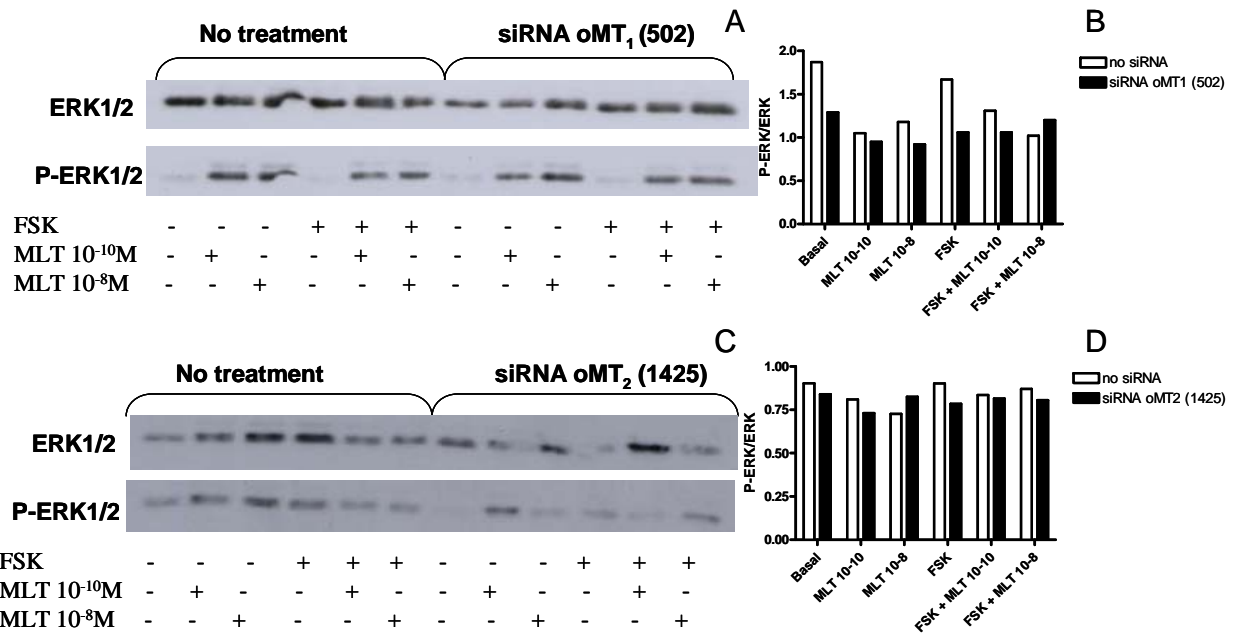


Figure 5



Primers	Sequence	Annealing temperatures
oMT <sub>1</sub> Rev	5'-GGCTCACCACAAACACATTTCG-3'	62,6°C
oMT <sub>1</sub> For	5'-CCTCCATCCTCATCTTCACCATC-3'	64,6°C
oMT <sub>2</sub> Rev	5'-GCTTGCTCTCCGCCTTGAC-3'	64,5°C
oMT <sub>2</sub> For	5'-CGCTCGTGTGCTTCTGCTACC-3'	64,5°C
m18S Rev	5'-GTA CTGAGCAGGATTACCATGGC-3'	51,9°C
m18S For	5'-GTGAAAGCGGGGCCTCACGATCC-3'	57,3°C

Table 1



### *Legends of figures*

**Figure 1: Incorporation of fluo-siRNA in CHO-K1-oMT1 (A and B) and CHO-K1-oMT2 (C and D) cells (20x)** CHO-K1-oMT1 cells transfected with 20nM fluorescent siRNA were observed with transmitted light (A) and with red light (B). CHO-K1-oMT2 cells transfected with 20nM fluorescent siRNA were observed with transmitted light (C) and red light (D).

**Figure 2: Binding characteristics of CHO-K1-oMT1 (A and C) and CHO-K1-oMT2 (B and D) treated or not with siRNA against oMT receptors.** B<sub>max</sub> was measured in absence and in presence of siRNA at CHO-K1-oMT1 (A) and CHO-K1-oMT2 (B). K<sub>d</sub> values were calculated in absence or in presence of siRNA at CHO-K1-oMT1 (C) and CHO-K1-oMT2 (D). Histograms represent each of three independent experiments. The data points and error bars represent mean of triplicate and standard error, respectively.

**Figure 3: Relative levels of oMT1 (A) and oMT2 (B) transcript after treatment with or without siRNA.** A) and B) histograms represent one of three independent experiments. The data points and error bars represent mean of triplicate and standard error, respectively.

**Figure 4: Effect of siRNA treatment on cAMP signalling on CHO-oMT1 (A) and CHO-oMT2 (B).** cAMP was measured using a competitive ELISA. cAMP concentration was expressed in % of B/B<sub>0</sub>. B<sub>0</sub> is the maximum amount of tracer that antibody can bind in the absence of free cAMP. % B/B<sub>0</sub> represents the ratio of the absorbance of a sample to that of the maximum binding (B<sub>0</sub>) well. Four experimental conditions were tested: basal, forskolin, melatonin and forskolin with melatonin. FSK: forskolin; MLT: melatonin. Histograms represent each of three independent experiments. The data points and error bars represent mean of duplicate and standard error, respectively.

**Figure 5: Effect of siRNA treatment on phosphorylation of ERK proteins.** CHO-K1 cells stably expressing oMT1 receptor (A and B) or oMT2 receptor (C and D) were stimulated with increasing concentrations of melatonin, in presence or absence of forskolin. ERK1/2 phosphorylation level was assessed by Western blotting using specific antibodies. All the blots were probed with an ERK1/2 antibody to normalize for total protein content. A) Representative Western blot for ERK phosphorylation levels are show for oMT1 (A) and oMT2 (C). ERK signals were quantified by densitometry and expressed as a ratio of phosphorylated ERK over ERK1/2, for oMT1 (B) and oMT2 (D).FSK: forskolin; MLT: melatonin.

**Table 1: List of all primers used.**



## References

- Brydon, L., Petit, L., de Coppet, P., Barrett, P., Morgan, P.J., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999a. Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev* 39, 315-324.
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999b. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 13, 2025-2038.
- Buning, H., Nicklin, S.A., Perabo, L., Hallek, M., Baker, A.H., 2003. AAV-based gene transfer. *Curr Opin Mol Ther* 5, 367-375.
- Cargnello, M., Roux, P.P., 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.
- Chan, A.S., Lai, F.P., Lo, R.K., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Stanbridge, E.J., Wong, Y.H., 2002. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 14, 249-257.
- Coge, F., Guenin, S.P., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., Legros, C., Ouvry, C., Cohen, W., Renault, N., Nosjean, O., Malpoux, B., Delagrangue, P., Boutin, J.A., 2009. The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT(2) receptor. *Br J Pharmacol* 158, 1248-1262.
- Davidson, B.L., Stein, C.S., Heth, J.A., Martins, I., Kotin, R.M., Derksen, T.A., Zabner, J., Ghodsi, A., Chiorini, J.A., 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3428-3432.
- Drazen, D.L., Nelson, R.J., 2001. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 74, 178-184.
- Dubocovich, M.L., Delagrangue, P., Krause, D.N., Sugden, D., Cardinali, D.P., Olcese, J., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62, 343-380.
- Dufourny, L., Migaud, M., Thiery, J.C., Malpoux, B., 2008. Development of an in vivo adeno-associated virus-mediated siRNA approach to knockdown tyrosine hydroxylase in the lateral retrochiasmatic area of the ovine brain. *J Neurosci Methods* 170, 56-66.
- Forsayeth, J.R., Eberling, J.L., Sanftner, L.M., Zhen, Z., Pivrotto, P., Bringas, J., Cunningham, J., Bankiewicz, K.S., 2006. A dose-ranging study of AAV-hAADC therapy in Parkinsonian monkeys. *Mol Ther* 14, 571-577.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hommel, J.D., Sears, R.M., Georgescu, D., Simmons, D.L., DiLeone, R.J., 2003. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9, 1539-1544.
- Jarzyńska, M.J., Passey, D.K., Ignatius, P.F., Melan, M.A., Radio, N.M., Jockers, R., Rasenick, M.M., Brydon, L., Witt-Enderby, P.A., 2006. Modulation of melatonin receptors and G-protein function by microtubules. *J Pineal Res* 41, 324-336.
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J.A., Delagrangue, P., 2008. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 154, 1182-1195.
- MacKenzie, R.S., Melan, M.A., Passey, D.K., Witt-Enderby, P.A., 2002. Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal





transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 63, 587-595.

Malpoux, B., 2006. Seasonal regulation of reproduction in mammals. *JD Neill*.

Manno, C.S., Chew, A.J., Hutchison, S., Larson, P.J., Herzog, R.W., Arruda, V.R., Tai, S.J., Ragni, M.V., Thompson, A., Ozelo, M., Couto, L.B., Leonard, D.G., Johnson, F.A., McClelland, A., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A.W., Kay, M.A., High, K.A., Glader, B., 2003. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101, 2963-2972.

Mao, L., Cheng, Q., Guardiola-Lemaitre, B., Schuster-Klein, C., Dong, C., Lai, L., Hill, S.M., 2010. In vitro and in vivo antitumor activity of melatonin receptor agonists. *J Pineal Res* 49, 210-221.

McNulty, S., Ross, A.W., Barrett, P., Hastings, M.H., Morgan, P.J., 1994. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 6, 523-532.

McNulty, S., Ross, A.W., Shiu, K.Y., Morgan, P.J., Hastings, M.H., 1996. Phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis is regulated both by cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms. *J Neuroendocrinol* 8, 635-645.

Morgan, P.J., Barrett, P., Hazlerigg, D., Milligan, G., Lawson, W., MacLean, A., Davidson, G., 1995. Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. *J Neuroendocrinol* 7, 361-369.

Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E., Helliwell, R., 1994. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24, 101-146.

Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrang, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275, 31311-31317.

Piketty, V., Pelletier, J., 1993. Melatonin receptors in the lamb pars tuberalis/median eminence throughout the day. *Neuroendocrinology* 58, 359-365.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., 1995. Melatonin madness. *Cell* 83, 1059-1062.

Sliwinski, T., Rozej, W., Morawiec-Bajda, A., Morawiec, Z., Reiter, R., Blasiak, J., 2007. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair. *Mutat Res* 634, 220-227.

Vanecek, J., Watanabe, K., 1998. Melatonin inhibits the increase of cyclic AMP in rat suprachiasmatic neurons induced by vasoactive intestinal peptide. *Neurosci Lett* 252, 21-24.

Verdonk, E., Johnson, K., McGuinness, R., Leung, G., Chen, Y.W., Tang, H.R., Michelotti, J.M., Liu, V.F., 2006. Cellular dielectric spectroscopy: a label-free comprehensive platform for functional evaluation of endogenous receptors. *Assay Drug Dev Technol* 4, 609-619.

Witt-Enderby, P.A., MacKenzie, R.S., McKeon, R.M., Carroll, E.A., Bordt, S.L., Melan, M.A., 2000. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton* 46, 28-42.

Witt-Enderby, P.A., Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 1998. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139, 3064-3071.



## Conclusion

Dans la lignée cellulaire CHO-K1, l'interférence par ARN des récepteurs ovins MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> permet d'inhiber d'une part, la capacité de liaison pour la 2-[<sup>125</sup>I]-iodo-mélatonine de l'ordre de 50% et 60%, respectivement et d'autre part, le niveau des ARNm codant pour ces récepteurs de l'ordre de 60% et 70%, respectivement. Toutefois, ces niveaux d'inhibition ne sont pas suffisants pour observer des effets du traitement par les siRNA sur la voie de signalisation majeure des récepteurs MT. L'optimisation des conditions expérimentales de ces études préliminaires est nécessaire avant d'élargir l'utilisation des siRNA à la culture primaire de *paris tuberculis* ou encore *in vivo*.



## Conclusion générale et perspectives



Les récepteurs à la mélatonine sont largement décrits dans la littérature. Chez l'ensemble des mammifères, le récepteur MT<sub>1</sub> est exprimé. Le récepteur MT<sub>2</sub> s'exprime également chez de nombreuses espèces mammifères (homme, rat, souris) (Reppert et al., 1996a). Jusqu'à récemment, le récepteur MT<sub>2</sub> n'était détecté ni chez le mouton (Barrett et al., 2003; Drew et al., 1998; Migaud et al., 2005) ni chez plusieurs genres de hamster (*Phodopus sungorus*, *Phodopus campbelli* et *Mesocricetus auratus*) (Weaver et al., 1996), deux espèces présentant pourtant une saisonnalité de la reproduction très marquée. Chez le hamster sibérien, espèce fortement saisonnée, le gène codant pour le récepteur MT<sub>2</sub> n'est pas fonctionnel puisqu'il contient dans sa séquence codante deux mutations non-sens (Weaver et al., 1996). Par analogie, il a été suggéré que le gène codant pour le récepteur MT<sub>2</sub> chez le mouton avait évolué en pseudogène ne produisant donc pas d'ARNm (Barrett et al., 2003).

Dans l'espèce ovine, il a été suggéré que seul le récepteur oMT<sub>1</sub> était impliqué dans la régulation dans la saisonnalité de la reproduction, puisque d'une part le récepteur MT<sub>2</sub> n'était pas identifié et que d'autre part le clonage, l'identification et la caractérisation du récepteur oMT<sub>1</sub> avaient permis d'accumuler des données en faveur de son implication (Mailliet et al., 2004). En premier lieu, des ARNm codant pour le récepteur oMT<sub>1</sub> sont détectés dans l'hypothalamus pré-mammillaire, structure cible de la mélatonine connue pour ses effets sur la reproduction (Migaud et al., 2005). Ensuite, il existe une corrélation entre la fréquence des mutations alléliques du gène oMT<sub>1</sub> et l'intensité de l'activité anovulatoire des brebis (Pelletier et al., 2000). Des mutations affectant le second exon du gène oMT<sub>1</sub> entraînent une altération de la signalisation cellulaire et par conséquent l'interprétation du signal mélatoninergique (Trecherel et al.).

Deux études récentes ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les récepteurs mélatoninergiques chez le mouton. En effet, une séquence partielle du gène codant pour le récepteur MT<sub>2</sub> a été identifiée chez le mouton (Xiao et al., 2007). Cette étude n'apporte pas une preuve formelle de la fonctionnalité du récepteur. En revanche, le clonage de la totalité de la séquence du gène codant pour le récepteur oMT<sub>2</sub> a été réalisé avec succès dans notre laboratoire à partir de rétines et ouvre la voie aux études fonctionnelles (Coge et al., 2009). D'autre part il a été montré que, dans un système de sur-expression des récepteurs humains MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>, MT<sub>2</sub> s'impliquerait préférentiellement dans la formation d'hétérodimères





(Ayoub et al., 2004). Même si l'existence de l'hétérodimérisation des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> *in vivo* n'est toujours pas établie, ces résultats renforcent l'intérêt pour le récepteur MT<sub>2</sub> en tant que partenaire du récepteur MT<sub>1</sub> pour traduire les effets de la mélatonine.

Une partie des travaux de la thèse découlent de ce clonage récent du récepteur oMT<sub>2</sub>. La caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur oMT<sub>2</sub> a été réalisée afin de comprendre son implication éventuelle dans la régulation de la saisonnalité de la reproduction. Les résultats des études pharmacologiques et fonctionnelles, en plus des données structurales suggèrent que le récepteur oMT<sub>2</sub> serait constitutivement actif, contrairement aux récepteurs hMT<sub>2</sub> et rMT<sub>2</sub>. Le niveau d'activité basale des protéines G liées aux récepteurs MT de différentes espèces a été mesuré dans différentes conditions expérimentales pouvant influencer sur le niveau de l'activité constitutive. Nous avons également œuvré à l'identification et à la caractérisation d'agonistes inverses des récepteurs MT. Une autre partie des travaux de thèse s'est focalisée sur la compréhension du(es) rôle(s) respectif(s) de chaque récepteur (MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>) par la mise au point d'une technique inhibant spécifiquement l'expression de ceux-ci dans différents contextes cellulaires.

## 1) Pharmacologie du récepteur oMT<sub>2</sub>

L'ADN complémentaire isolé à partir de rétines de mouton ne possède pas de mutations non-sens comme c'est le cas chez le hamster sibérien. Cet ADN complémentaire aboutit à l'expression d'une protéine possédant une forte identité de séquence avec les récepteurs MT<sub>2</sub> d'autres espèces (95% avec le bovin, 73% avec l'humain, 72% avec le chimpanzé, 68% avec la souris et 67 ou 58% avec le rat) (Coge et al., 2009).

Après expression stable du gène codant pour le récepteur oMT<sub>2</sub> dans la lignée CHO-K1, la caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur a été possible en utilisant des molécules de référence pour les récepteurs mélatoninergiques, comme le luzindole et le 4-phényl-2-propionamidotétraline (4P-PDOT) (Jockers et al., 2008). Par un ensemble de tests (dosage AMPc, test de liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS et spectroscopie diélectrique cellulaire), il a été établi que la pharmacologie du récepteur oMT<sub>2</sub> est similaire à celle des autres récepteurs MT.



## 2) Activité constitutive des récepteurs MT

Ce paragraphe s'articulera autour de quatre axes distincts. D'abord, nous développerons les observations structurales suggérant une activité constitutive. Ensuite, nous nous intéresserons aux facteurs pouvant moduler l'activité constitutive d'un RCPG. Puis, les agonistes inverses feront l'objet d'une discussion. Pour finir, la question de la signification physiologique de cette activité constitutive des récepteurs MT sera posée et discutée.

### 2.1) Relation entre la structure des RCPG et l'existence de l'activité constitutive

L'hypothèse de l'existence d'une activité constitutive découle des observations structurales et fonctionnelles portant sur le récepteur oMT<sub>2</sub>. En effet, ce récepteur présente une originalité dans sa structure par rapport aux récepteurs MT des autres espèces. Le récepteur oMT<sub>2</sub> possède dans son troisième domaine transmembranaire un motif particulier DRY, alors qu'un motif NRY est décrit pour les autres espèces (MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> d'homme, de singe, de rat et de souris) (Coge et al., 2009). Ce motif DRY est au cœur du verrou ionique responsable de l'état inactif des RCPG. Le verrou ionique est donc maintenu entre le motif DRY et des résidus R3.50 du TM3 et D/E6.30 du TM6 (Arginine et Acide Aspartique/Acide Glutamique) (Ballesteros et al., 2001; Smit et al., 2007). La répulsion électrostatique entre les résidus 3.50 et 6.30 des TM3 et TM6 a été décrite pour d'autres récepteurs comme étant suffisante pour induire une activation spontanée du récepteur, notamment en rendant la partie cytoplasmique du RCPG plus accessible pour la liaison des protéines G (Parnot et al., 2002; Roka et al., 1999; Smit et al., 2007). Des études de mutations dirigées rendant les résidus en position 3.50 et 6.30 différents modifieraient les interactions électrostatiques du verrou ionique et permettraient de confirmer ou d'infirmer l'importance de celui-ci dans la conformation active ou inactive des récepteurs MT. Ces éléments structuraux penchent en faveur de l'existence d'une activité constitutive du récepteur oMT<sub>2</sub>.

Cette hypothèse initiale faisant reposer l'établissement de l'activité constitutive sur la seule implication du motif DRY ne permet pas de décrire totalement le phénomène. En



effet, les récepteurs MT des autres espèces étudiées (humain, rat et ovin) ne présentent pas le motif DRY dans leur structure, alors que nous avons montré qu'ils possèdent une activité constitutive (Devavry et al., 2011). Nous supposons alors qu'une séquence d'acides aminés localisés dans un autre site serait responsable de l'activité constitutive des récepteurs MT. Le motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F du TM7 est connu pour être important dans l'activation des RCPG (Fritze *et al.*, 2003). Effectivement, l'état inactif des RCPG serait maintenu par les interactions entre le motif DRY du TM3 et le motif NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F du TM7. Une modification de la séquence de ces motifs pourrait induire un déséquilibre entre les formes actives et inactives des RCPG et induire, de ce fait, une activité spontanée de ceux-ci. Nous proposons que l'établissement de l'activité constitutive des récepteurs MT dépend plus majoritairement du motif NPxxxY(x)<sub>5,6</sub>F que du motif DRY/NRY. Une approche par mutagenèse dirigée modifiant la séquence du motif NPxxxY(x)<sub>5,6</sub>F renseignerait sur l'implication de ce motif dans la conformation active des récepteurs MT.

## 2.2) Facteurs influençant l'activité constitutive

### 2.2.1) Participation de différents sous-types de protéines G :

L'activité constitutive correspond à la capacité du récepteur à adopter sa conformation active en absence de l'agoniste. Autrement dit, la liaison aux protéines G et l'activation de celles-ci se réalise en absence de l'agoniste. L'étape limitante de l'activation des protéines G réside en l'échange du GDP en GTP au niveau de la sous-unité  $\alpha$ . Un inhibiteur spécifique de cet échange, la suramine, a été utilisé dans nos études pour s'assurer que les protéines G portaient l'activité constitutive des récepteurs MT. En effet, un récepteur constitutivement actif est fortement lié aux protéines G. Nous avons montré que la suramine perturbait de façon similaire les complexes protéines G/récepteurs MT et les complexes protéines G/récepteur hH3 de l'histamine, un récepteur connu pour être constitutivement actif (Devavry et al., 2011). Par analogie, ceci indique d'une part que les récepteurs MT sont constitutivement actifs et d'autre part que les protéines G sont responsables de cette activité spontanée. Cependant les effets de la suramine sont à compléter par une autre approche, puisque celle-ci perturbe également l'échange du GDP en GTP au niveau des petites protéines G.

Les voies de signalisation des récepteurs MT sont largement connues et détaillées dans la littérature. Le couplage s'effectue majoritairement avec une protéine G de type



inhibitrice (Gi), mais d'autres couplages avec les protéines Gq (MT<sub>1</sub>) et Gs peuvent être envisagés. Lors de l'étude de la nature des protéines G participant à l'activité constitutive des récepteurs hMT<sub>1</sub> et hMT<sub>2</sub>, une partie de la liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS persiste suite à un traitement à la toxine pertussique, inhibiteur spécifique des protéines Gi (Devavry et al., 2011). L'implication d'autres sous-types de protéines G est alors suggérée. Le test de liaison du [<sup>35</sup>S]-GTPγS permet de doser efficacement l'activité des protéines Gi. En revanche, la sensibilité de ce test pour doser l'activité des protéines Gq et Gs est faible. L'activation des protéines Gs et Gq est souvent masquée par le signal basal de l'ensemble des protéines G et plus particulièrement des protéines Gi sur-exprimées dans le cas des récepteurs MT (Milligan, 2003). Afin de s'affranchir de l'activité basale des protéines G observée dans les cellules de mammifères, l'utilisation des cellules d'insectes Sf9 peut être envisagée. En effet, cette lignée cellulaire n'exprime pas de façon endogène de récepteurs constitutivement actifs et possède une collection limitée de protéines G. Ce système cellulaire semble idéal pour l'étude de l'activité constitutive dans un environnement contrôlé et avec un faible bruit de fond dû à l'activité basale des protéines G (Schneider and Seifert, 2010). Alternativement, de nouvelles méthodologies comme la spectroscopie diélectrique cellulaire (CDS) permettent de discriminer la participation de chaque sous-type de protéine G dans l'activité constitutive des récepteurs MT quel que soit le contexte cellulaire.

#### 2.2.2) Influence de l'environnement cellulaire sur l'activité constitutive :

Comme amorcé dans le paragraphe précédent, il est établi que le contexte cellulaire dans lequel les récepteurs s'expriment est un facteur pouvant influencer le niveau d'activité constitutive. Dans le cas des récepteurs humains MT, nous avons montré que le niveau d'activation des protéines G en absence d'agoniste est plus important lorsque ceux-ci s'expriment dans une lignée cellulaire d'origine neuronale (Neuro2A) que dans une lignée cellulaire de phénotype neutre (CHO-K1) (Devavry et al., 2011). Cette différence de niveau d'activité constitutive peut s'expliquer par plusieurs paramètres : le niveau d'expression des récepteurs, la désensibilisation, la stœchiométrie entre les protéines G et les récepteurs et l'affinité ou la sélectivité de la protéine G pour son récepteur (Chalmers and Behan, 2002). Ces paramètres expliquent la pharmacologie spécifique à un tissu de certains RCPG. Aucune loi de cause à effet n'est établie pour définir dans quelle





mesure ces paramètres influencent l'activité constitutive des RCPG. De nombreuses études ont tenté de mettre en relation un taux élevé d'expression des récepteurs avec une activité constitutive forte, mais sans succès (Pour revue: Seifert and Wenzel-Seifert, 2002). Par exemple, le niveau d'activité constitutive du récepteur à l'histamine H<sub>2</sub> augmente en fonction du niveau d'expression de celui-ci dans la lignée CHO-K1 (Smit et al., 1996). En revanche, concernant le récepteur à l'histamine H<sub>3</sub>, l'activité constitutive est très importante même dans une lignée exprimant celui-ci de façon modérée (Rouleau et al., 2002). Une nouvelle technologie utilisant une méga-nucléase permet de contrôler le niveau d'intégration du gène d'intérêt dans les cellules et donc d'exprimer les récepteurs à des niveaux physiologiques (Cabaniols et al., 2010). Cette méthodologie nous renseignerait sur le lien entre le niveau d'expression des récepteurs à la mélatonine et le niveau de leur activité constitutive.

La nature des protéines intracellulaires influence également l'existence de l'activité constitutive des récepteurs. Dans des neurones de souris, l'activité constitutive des récepteurs au glutamate (mGluR1a ou mGluR5) est contrôlée par les protéines Homer qui se lient directement au récepteur en son extrémité C-terminale. Une modification de cette interaction par mutagenèse ou par stratégie anti-sens, ou par expression endogène de la protéine Homer (H1a) induit l'activité constitutive des récepteurs mGluR1a ou mGluR5. Des RCPG peuvent être activés aussi bien par des protéines intracellulaires que par l'agoniste (Ango et al., 2001). Afin d'étudier l'impact du contexte cellulaire sur l'activité constitutive des récepteurs MT, il serait intéressant d'étudier ce phénomène dans différentes lignées. La lignée cellulaire Att20, issue de tumeur hypophysaire corticotrope, est intéressante car elle exprime de façon endogène les récepteurs MT dans un environnement neuronal (Atwood et al., 2011). Un autre modèle cellulaire issu de tumeurs hypophysaires, cette fois-ci, somatotropes, les cellules GH3 peuvent être utilisées pour l'étude des récepteurs MT (Barker et al., 1987). Les cellules CaCO<sub>2</sub> peuvent également être intéressantes car ce sont des cellules intestinales utilisées comme modèle de barrière hémato-encéphalique (Sun et al., 2008). L'expression dans des contextes cellulaires différents et contrôlés pourrait apporter de nouvelles perspectives de recherche pour la pharmacologie des récepteurs MT.

### 2.3) Identification d'agonistes inverses :

L'activité spontanée des récepteurs peut être réduite par des ligands possédant un effet intrinsèque négatif: ce sont des agonistes inverses. Nous avons identifié deux agonistes inverses des récepteurs hMT (UCM 549 et UCM 724), initialement décrits comme



antagonistes des récepteurs hMT<sub>2</sub> (Spadoni et al., 2007). Le concept d'agoniste inverse a été proposé par Costa et Herz en 1989 suite à la découverte de l'activité constitutive des récepteurs  $\delta$ -opioïdes (Costa and Herz, 1989). Actuellement, il a été montré que plus de 40% des RCPG possédaient une activité constitutive (Seifert and Wenzel-Seifert, 2002) et que 85% de ligands initialement décrits comme antagonistes sont en réalité des agonistes inverses (Kenakin, 2001). Un criblage de l'ensemble des antagonistes des récepteurs MT pourrait être envisagé pour identifier des agonistes inverses plus affins et/ou sélectifs.

Comme pour le niveau d'activité constitutive, l'efficacité des agonistes inverses et des ligands en général dépend également de l'environnement cellulaire. Il est connu que l'efficacité des agonistes est directement liée au niveau d'expression du récepteur et à l'efficacité du couplage récepteur/effecteur (Black et al., 1985; Hoyer and Boddeke, 1993). Par exemple, le ligand du récepteur  $\beta$ -adrénergique, prénaltérol, se comporte comme un antagoniste, un agoniste partiel ou un agoniste plein, en fonction du tissu dans lequel ce récepteur est exprimé (Kenakin, 1995). La modification du niveau d'expression des sous-unités G $\alpha$ q augmente la puissance de l'agoniste du récepteur 5-HT<sub>2C</sub> (Price et al., 2001). Ces exemples montrent que l'amplitude de la réponse générée par un ligand est variable en fonction du contexte intracellulaire (Aloyo et al., 2009).

#### 2.4) Signifiante physiologique de l'activité constitutive :

Nous avons détaillé les paramètres structuraux, moléculaires et cellulaires responsables de l'activité constitutive des récepteurs MT exprimés dans des systèmes hétérologues. Ces systèmes d'expression hétérologues sont des outils qui nous ont permis de décrire 1) l'activité constitutive des récepteurs MT, 2) l'existence d'agonistes inverses et 3) l'influence du contexte cellulaire sur ces phénomènes d'activité constitutive et d'agonisme inverse. Dans cette prochaine partie, nous nous demandons si l'activité constitutive des récepteurs à la mélatonine est un phénomène pharmacologique artificiel ou si elle a une réelle pertinence physiologique.

L'exemple du récepteur à l'histamine H<sub>3</sub> chez le rat (rH<sub>3</sub>R) propose des éléments de réflexion intéressants. D'une part, ce récepteur à l'histamine est constitutivement actif lorsqu'il est exprimé (B<sub>max</sub> compris entre 200 et 300 fmol/mg de protéine) dans un système hétérologue tel que la lignée CHO (Rouleau et al., 2002). D'autre part, l'activité constitutive du H<sub>3</sub>R est présente dans l'hypothalamus de rat (Wieland et al.,



2001) et elle contrôlerait l'activité des neurones histaminiques *in vivo* (Chalmers and Behan, 2002; Morisset et al., 2000). Certains agonistes inverses du récepteur H<sub>3</sub> augmentent la libération de l'histamine *in vivo* et sont utilisés dans des essais cliniques pour traiter des désordres cognitifs (narcolepsie, démences, schizophrénie) et des troubles de la prise alimentaire (Pour revue: Arrang et al., 2007; Schwartz, 2011). Ainsi l'activité constitutive du récepteur H<sub>3</sub> existe aussi bien dans un système cellulaire que dans des conditions natives et elle est de plus impliquée dans la régulation de fonctions physiologiques. De nombreux autres RCPG possèdent une activité constitutive lorsqu'ils sont exprimés dans des conditions natives. Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont effectivement connus pour être constitutivement actifs au niveau des cardiomyocytes intacts (Varma *et al.*, 1999) et des membranes d'érythrocytes chez la dinde (Gotze and Jakobs, 1994; Mewes et al., 1993), ainsi que les récepteurs muscariniques M<sub>2</sub> au niveau des membranes cardiaques auriculaires (Hilf and Jakobs, 1992). Des études montrent, au niveau de l'aorte de rat, la persistance de l'activité constitutive des récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$ -adrénergiques (Noguera *et al.*, 1996).

Dans le cas des récepteurs MT, nous ne pouvons exclure que l'activité constitutive observée *in vitro* soit un phénomène pharmacologique artificiel et n'ait pas de rôle physiologique. Cette possibilité est peu probable. En effet, chez le rat, l'activité constitutive des récepteurs rMT<sub>1</sub> a été mise en évidence à partir de préparations membranaires issues de tissus d'artères caudales (Ersahin et al., 2002). C'est la seule indication de l'existence de l'activité constitutive du récepteur MT<sub>1</sub> *in vivo*. Dans les artères caudales de rat, les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> seraient impliqués respectivement dans la vasoconstriction et la vasodilatation (Doolen et al., 1999). L'activité constitutive, en potentialisant la forme active du récepteur rMT<sub>1</sub>, serait un mécanisme favorisant la vasoconstriction. Cette observation, bien que pertinente par rapport à l'importance de l'activité constitutive, est limitée à une fonction marginale de la mélatonine.

Notre discussion se focalisera sur le rôle possible de l'activité constitutive des récepteurs MT dans la synchronisation des rythmes. Nous avons montré que l'activité constitutive des récepteurs MT est commune à trois espèces (homme, rat et mouton), pour lesquelles le profil de sécrétion de la mélatonine, et donc la disponibilité de la mélatonine pour ses récepteurs, ainsi que les cinétiques d'expression des récepteurs sont pourtant différents. Dans un premier lieu, chez l'espèce ovine, la sécrétion de



mélatonine débute dès le début de la phase sombre avec un maximum rapidement atteint et s'arrête à la fin de la phase sombre. La durée de sécrétion est proportionnelle à la durée de la nuit. De plus, l'expression des récepteurs oMT varie au cours de la journée. En effet, dans les régions cibles de la mélatonine comme la PT et l'HPM, il a été montré que l'expression des récepteurs oMT augmentait avant la phase sombre et diminuait au cours de la nuit (Cogé, 2009). Les cinétiques de ces deux paramètres (sécrétion de la mélatonine et expression de ces récepteurs) semblent potentialiser le message mélatoninergique. En effet, le niveau d'expression des récepteurs oMT augmente lors de la transition jour/nuit, et par conséquent le niveau d'activité constitutive également. Les voies de signalisation couplées aux récepteurs MT sont activées avant même le début de la phase sombre. Pendant la phase sombre, le niveau de mélatonine est important. Même si le niveau d'expression des récepteurs diminue au cours de la nuit, l'affinité pour l'hormone est suffisante pour transmettre le signal jusqu'à la fin de la phase sombre (Figure 32).

Chez le rat et l'homme, le profil de sécrétion de mélatonine est différent de celui des ovins avec un pic en milieu de nuit. Chez le rat, les études sur les variations journalières d'expression des ARNm codant pour le récepteur MT<sub>1</sub> sont très controversées. Une première étude montre que le niveau d'ARNm codant pour le récepteur rMT<sub>1</sub> dans les NSC augmente de façon très importante en milieu de jour (Neu and Niles, 1997). En revanche, une autre étude ne détecte pas de variation d'expression des ARNm codant pour le récepteur rMT<sub>1</sub> dans les NSC au cours de la journée (Sugden et al., 1999a). L'étude la plus récente met en évidence un profil d'expression des ARNm codant pour le récepteur rMT<sub>1</sub> avec deux pics, au moment des deux transitions jour/nuit et nuit/jour (Poirel et al., 2002). Le signal « mélatonine » apparaît au moment des transitions jour/nuit et nuit/jour via l'activité constitutive des récepteurs MT, même si la sécrétion de mélatonine est maximale seulement en milieu de nuit. Le faible niveau de récepteurs exprimés à ce moment de la phase sombre n'affecte pas la transmission du signal grâce à la forte affinité des récepteurs pour l'hormone (Figure 32).

Au regard de ces observations, le rôle de l'activité constitutive des récepteurs MT sur la lecture du rythme de sécrétion de la mélatonine se pose. Le modèle ovin, en combinant l'expression précoce des récepteurs MT constitutivement actifs et la sécrétion pendant toute la durée de la nuit, permet d'augmenter l'amplitude du signal mélatoninergique. Le modèle rat présente une stratégie dans laquelle les récepteurs s'expriment seulement au





moment des transitions jour/nuit et nuit/jour alors que la mélatonine est présente en milieu de nuit. Cette autre stratégie, différente de celle du modèle ovin, permet également d'augmenter l'amplitude du signal mélatoninergique, mais aussi la durée de celui-ci. L'activité constitutive des récepteurs MT, quelque soit le modèle étudié et quelque soit la stratégie utilisée, contribue à l'intégration du message mélatoninergique en potentialisant d'une part l'amplitude et d'autre part la durée de celui-ci.

### 3) Les questions importantes qui se posent ?

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ouvrent de nombreuses pistes de recherche permettant d'approfondir les connaissances sur les récepteurs de la mélatonine. Dans un premier temps, la question des rôles respectifs des récepteurs MT se pose toujours. Comme suggéré au niveau de l'artère caudale de rat où les sous-types des récepteurs MT possèdent des rôles distincts (MT<sub>1</sub>: vasoconstriction et MT<sub>2</sub>: vasodilatation) (Doolen et al., 1999), nous pourrions imaginer que chaque sous-type de récepteur possède une fonction précise dans l'interprétation du signal photopériodique. Nous pourrions également imaginer que la lecture du signal mélatoninergique et donc l'implication des récepteurs MT pourrait être modulé par la formation d'homo- et/ou d'hétérodimères des récepteurs MT. En effet, les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> sont co-exprimés dans plusieurs tissus (rétine (Dubocovich, 1983), hippocampe (Musshoff et al., 2002), NSC (von Gall et al., 2002), tissu adipeux (Brydon et al., 2001), artères (Krause et al., 1995)). Des études immunohistochimiques sur des rétines humaines montrent que les deux récepteurs sont co-exprimés dans toutes les cellules ganglionnaires et photoréceptrices, suggérant ainsi la formation d'hétérodimères dans ces cellules (Meyer et al., 2002; Savaskan et al., 2007; Savaskan et al., 2002). Une étude de RT-PCR indique que les ARNm codant pour les récepteurs MT sont co-exprimés dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Musshoff et al., 2002). De plus, par immunohistochimie, les profils d'expression de MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> se superposent dans cette région (Savaskan et al., 2005; Savaskan et al., 2002). Ces résultats sont en faveur d'une possible hétérodimérisation dans l'hippocampe. Les neurones des NSC présentent également une co-expression des deux sous-types de récepteurs MT (Reppert et al., 1994; Reppert et al., 1988; von Gall et al., 2002). Des données obtenues dans des systèmes cellulaires co-exprimant les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> montrent que l'hétérodimère MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> possède un



profil pharmacologique spécifique (Ayoub et al., 2004). De plus, les ligands sélectifs du récepteur MT<sub>2</sub> comme le luzindole et le 4P-PDOT présentent une affinité plus importante pour l'hétérodimère MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>. Ces résultats permettent donc de proposer un comportement pharmacologique différent de l'hétérodimère MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> par rapport aux protomères MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>. Les conséquences fonctionnelles de l'hétérodimérisation sur la signalisation cellulaire ne sont pas actuellement connues.

Dans un second temps, des efforts de recherche sont à entreprendre pour comprendre le rôle de l'activité constitutive des récepteurs MT dans l'intégration du message lumineux, chez le mouton et/ou le rat.

### **Nous proposons différentes stratégies pour étudier ces différents points.**

En absence de ligands sélectifs et d'anticorps spécifiques, l'étude de la pharmacologie des récepteurs de la mélatonine n'est pas aisée. Au laboratoire, plusieurs outils ont été développés pour étudier les récepteurs MT. Nous avons développé une approche originale d'interférence par ARN pour discriminer le ou les rôle(s) respectif(s) des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>. Dans notre étude, nous avons montré que la transfection de siRNA dirigés contre les récepteurs rMT et oMT exprimés de façon stable dans la lignée CHO-K1 diminue la fonctionnalité des récepteurs ainsi que le niveau d'expression des ARNm codant pour ceux-ci. Actuellement, nous n'avons pas réussi à observer l'altération possible des voies de signalisation suite à l'utilisation des siRNA dirigés contre les récepteurs MT ovin et de rat. Une étude similaire sur des cultures primaires de *pars tuberalis* ovine a été réalisée. Ces cultures primaires sont de bons modèles car elles correspondent à la région cérébrale la plus riche en récepteurs MT et apportent probablement des réponses plus pertinentes sur la physiologie des animaux. Malheureusement, l'étude des récepteurs MT par l'approche d'interférence par ARN a été difficile à mettre en place dans ce contexte cellulaire. A plus long terme, l'administration contrôlée de siRNA *in vivo*, par exemple par adénovirus (AAV), dans des régions cérébrales cibles de la mélatonine permettrait de distinguer le rôle des deux sous-types de récepteurs dans l'intégration de la photopériode.

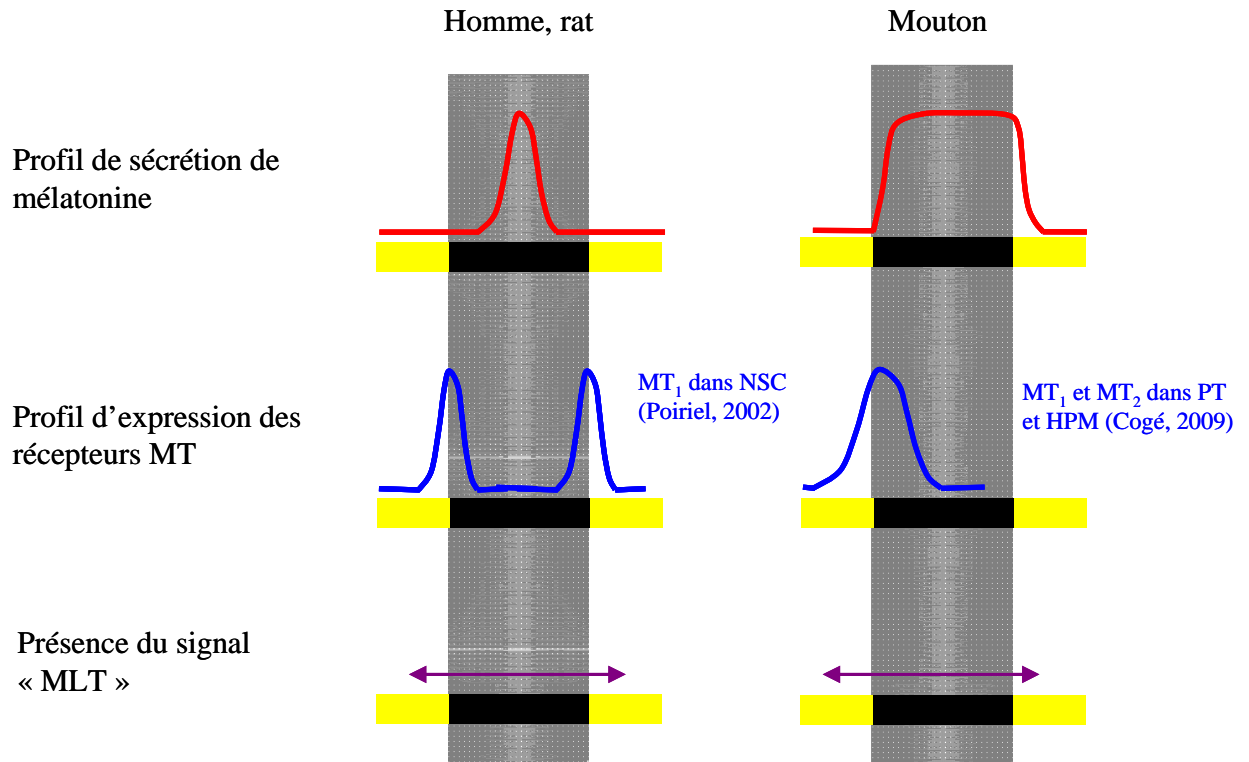
L'utilisation des siRNA affinerait ces recherches sur l'activité constitutive, en garantissant la mesure de l'activité constitutive d'un seul sous-type de récepteur. Plus généralement, les siRNA dirigés contre les récepteurs de la mélatonine seront de bons



outils pour étudier le(s) rôle(s) respectif(s) des deux sous-types de récepteurs. In vitro, en lignée cellulaire ou en culture primaire de *pars tuberalis* par exemple, la caractérisation des voies de signalisation spécifiques des récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> ainsi que l'étude des phénomènes de dimérisation seraient rendus possibles. Des études, *in vitro* et *in vivo*, de délétion du récepteur MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub> chez la souris (souches C57BL/6 ou C3H/HeN) tentent de discriminer le rôle de chaque sous-types de récepteurs dans le décalage de phase du rythme circadien (Dubocovich et al., 2005) et dans l'activité anti-dépresseur d'un antagoniste mélatoninergique, le luzindole (Sumaya et al., 2005). Dans ces études, la délétion du récepteur MT<sub>1</sub> ou MT<sub>2</sub> n'est pas ciblée à une seule région d'intérêt. Les siRNA transfectés avec des adéno-virus (AAV pour Adeno-associated virus) cible un seul gène dans une région cible bien définie : on parle de knock-down ciblé. En effet, il existe plusieurs sérotypes d'AAV présentant des tropismes cellulaires spécifiques. Les AAV de sérotype 1 et 2 infectent seulement les neurones, alors que les AAV de sérotype 5 infectent les neurones et les cellules gliales (Buning et al., 2003; Davidson et al., 2000). Cette caractéristique de tropisme cellulaire pourrait être utilisée pour apporter de nouvelles connaissances sur le rôle des récepteurs MT dans le contrôle de la saisonnalité de la reproduction, par exemple.

L'étude de l'activité constitutive passera également par l'administration d'agonistes inverses. En effet, en abolissant l'activité basale des récepteurs MT, l'utilisation des agonistes inverses permettrait d'évaluer l'implication de l'activité constitutive des récepteurs MT dans l'intégration de l'information photopériodique chez le mouton et/ou le rat.

En conclusion, les travaux de thèse ont mis en évidence l'activité constitutive des récepteurs MT. Des outils pharmacologiques (agonistes inverses et siRNA dirigés contre les récepteurs MT) ont été développés. Les agonistes inverses aideront à la compréhension de la pertinence physiologique de cette activité constitutive et l'approche par ARN interférent permettra de discriminer les rôles respectifs des récepteurs MT.



**Figure 32 :** Représentation schématique des profils de sécrétion de la mélatonine et d'expression des récepteurs à la mélatonine dans les modèles « homme et rat » et dans le modèle « mouton ».

## Bibliographie

- Acharya, S., Karnik, S.S., 1996. Modulation of GDP release from transducin by the conserved Glu134-Arg135 sequence in rhodopsin. *J Biol Chem* 271, 25406-25411.
- Alarma-Estrany, P., Pintor, J., 2007. Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther* 113, 507-522.
- Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., Breton, C., Rives, M.L., Newman, A., Javitch, J., Trinquet, E., Manning, M., Pin, J.P., Mouillac, B., Durroux, T., 2010. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol* 6, 587-594.
- Alewijnse, A.E., Timmerman, H., Jacobs, E.H., Smit, M.J., Roovers, E., Cotecchia, S., Leurs, R., 2000. The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H<sub>2</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 57, 890-898.
- Aloyo, V.J., Berg, K.A., Spampinato, U., Clarke, W.P., Harvey, J.A., 2009. Current status of inverse agonism at serotonin<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>) and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Pharmacol Ther* 121, 160-173.
- Anderson, G.M., Connors, J.M., Hardy, S.L., Valent, M., Goodman, R.L., 2002. Thyroid hormones mediate steroid-independent seasonal changes in luteinizing hormone pulsatility in the ewe. *Biol Reprod* 66, 701-706.
- Anderson, G.M., Hardy, S.L., Valent, M., Billings, H.J., Connors, J.M., Goodman, R.L., 2003. Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. *Endocrinology* 144, 2892-2901.
- Ango, F., Prezeau, L., Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J., Fagni, L., 2001. Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* 411, 962-965.
- Arendt, J. (Ed.), 1995. Melatonin and the mammalian pineal gland, London.
- Arrang, J.M., Morisset, S., Gbahou, F., 2007. Constitutive activity of the histamine H<sub>3</sub> receptor. *Trends Pharmacol Sci* 28, 350-357.
- Assayed, M.E., Abd El-Aty, A.M., 2009. Protection of rat chromosomes by melatonin against gamma radiation-induced damage. *Mutat Res* 677, 14-20.
- Aton, S.J., Huettner, J.E., Straume, M., Herzog, E.D., 2006. GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19188-19193.
- Atwood, B.K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., Straiker, A., 2011. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics* 12, 14.
- Audinot, V., Bonnaud, A., Grandcolas, L., Rodriguez, M., Nagel, N., Galizzi, J.P., Balik, A., Messenger, S., Hazlerigg, D.G., Barrett, P., Delagrangé, P., Boutin, J.A., 2008. Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors. *Biochem Pharmacol* 75, 2007-2019.
- Aurich, C., Sieme, H., Hoppe, H., Schlote, S., 1994. Involvement of endogenous opioids in the regulation of LH and testosterone release in the male horse. *J Reprod Fertil* 102, 327-336.
- Ayoub, M.A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., Jockers, R., 2002. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277, 21522-21528.
- Ayoub, M.A., Levoe, A., Delagrangé, P., Jockers, R., 2004. Preferential formation of MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT<sub>2</sub> homodimers. *Mol Pharmacol* 66, 312-321.

- Ballesteros, J.A., Jensen, A.D., Liapakis, G., Rasmussen, S.G., Shi, L., Gether, U., Javitch, J.A., 2001. Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* 276, 29171-29177.
- Ballesteros, J.A., Weinstein, H. (Eds.), 1995. Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relation in G protein coupled receptor, Sealfon SC ed. *Methods in Neurosciences: Receptor Molecular Biology*, San Diego.
- Barker, J.L., Dufy, B., Harrison, N.L., Owen, D.G., MacDonald, J.F., 1987. Signal transduction mechanisms in cultured CNS neurons and clonal pituitary cells. *Neuropharmacology* 26, 941-955.
- Barrell, G.K., Moenter, S.M., Caraty, A., Karsch, F.J., 1992. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod* 46, 1130-1135.
- Barrett, P., Conway, S., Morgan, P.J., 2003. Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res* 35, 221-230.
- Barrett, P., Ebling, F.J., Schuhler, S., Wilson, D., Ross, A.W., Warner, A., Jethwa, P., Boelen, A., Visser, T.J., Ozanne, D.M., Archer, Z.A., Mercer, J.G., Morgan, P.J., 2007. Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology* 148, 3608-3617.
- Bechgaard, E., Lindhardt, K., Martinsen, L., 1999. Intranasal absorption of melatonin in vivo bioavailability study. *Int J Pharm* 182, 1-5.
- Behrens, U.D., Douglas, R.H., Sugden, D., Davies, D.J., Wagner, H.J., 2000. Effect of melatonin agonists and antagonists on horizontal cell spinule formation and dopamine release in a fish retina. *Cell Tissue Res* 299, 299-306.
- Berg, K.A., Harvey, J.A., Spampinato, U., Clarke, W.P., 2005. Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26, 625-630.
- Bernard, M., Donohue, S.J., Klein, D.C., 1995. Human hydroxyindole-O-methyltransferase in pineal gland, retina and Y79 retinoblastoma cells. *Brain Res* 696, 37-48.
- Bertaina-Anglade, V., la Rochelle, C.D., Boyer, P.A., Mocaer, E., 2006. Antidepressant-like effects of agomelatine (S 20098) in the learned helplessness model. *Behav Pharmacol* 17, 703-713.
- Billings, H.J., Viguie, C., Karsch, F.J., Goodman, R.L., Connors, J.M., Anderson, G.M., 2002. Temporal requirements of thyroid hormones for seasonal changes in LH secretion. *Endocrinology* 143, 2618-2625.
- Bittman, E.L., Kaynard, A.H., Olster, D.H., Robinson, J.E., Yellon, S.M., Karsch, F.J., 1985. Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* 40, 409-418.
- Black, J.W., Leff, P., Shankley, N.P., 1985. Further analysis of anomalous pK<sub>B</sub> values for histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists on the mouse isolated stomach assay. *Br J Pharmacol* 86, 581-587.
- Bond, R.A., Leff, P., Johnson, T.D., Milano, C.A., Rockman, H.A., McMinn, T.R., Apparsundaram, S., Hyek, M.F., Kenakin, T.P., Allen, L.F., et al., 1995. Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* 374, 272-276.
- Borjigin, J., Li, X., Snyder, S.H., 1999. The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 53-65.
- Boutin, J.A., Audinot, V., Ferry, G., Delagrè, P., 2005. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* 26, 412-419.
- Brann, D.W., Mahesh, V.B., 1994. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 15, 3-49.



Browning, C., Beresford, I., Fraser, N., Giles, H., 2000. Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol* 129, 877-886.

Brydon, L., Petit, L., de Coppet, P., Barrett, P., Morgan, P.J., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999a. Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev* 39, 315-324.

Brydon, L., Petit, L., Delagrangé, P., Strosberg, A.D., Jockers, R., 2001. Functional expression of MT2 (Mell1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology* 142, 4264-4271.

Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999b. Dual signaling of human Mell1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 13, 2025-2038.

Brzezinski, A., Vangel, M.G., Wurtman, R.J., Norrie, G., Zhdanova, I., Ben-Shushan, A., Ford, I., 2005. Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep Med Rev* 9, 41-50.

Bulenger, S., Marullo, S., Bouvier, M., 2005. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26, 131-137.

Buning, H., Nicklin, S.A., Perabo, L., Hallek, M., Baker, A.H., 2003. AAV-based gene transfer. *Curr Opin Mol Ther* 5, 367-375.

Cabaniols, J.P., Ouvry, C., Lamamy, V., Fery, I., Craplet, M.L., Moulharat, N., Guenin, S.P., Bedut, S., Nosjean, O., Ferry, G., Devavry, S., Jacqmarcq, C., Lebuhotel, C., Mathis, L., Delenda, C., Boutin, J.A., Duchateau, P., Coge, F., Paques, F., 2010. Meganuclease-driven targeted integration in CHO-K1 cells for the fast generation of HTS-compatible cell-based assays. *J Biomol Screen* 15, 956-967.

Cagnacci, A., Elliott, J.A., Yen, S.S., 1992. Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 447-452.

Caraty, A., Evans, N.P., Fabre-Nys, C.J., Karsch, E.J., 1995. The preovulatory gonadotrophin-releasing hormone surge: a neuroendocrine signal for ovulation. *J Reprod Fertil Suppl* 49, 245-255.

Carcangiu, V., Mura, M.C., Pazzola, M., Vacca, G.M., Paludo, M., Marchi, B., Daga, C., Bua, S., Luridiana, S., 2011. Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene and its association with reproductive seasonality. *Theriogenology* 76, 419-426.

Card, J.P., Moore, R.Y., 1982. Ventral lateral geniculate nucleus efferents to the rat suprachiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity. *J Comp Neurol* 206, 390-396.

Cardinali, D.P., 1981. Melatonin. A pineal modulatory signal affecting pituitary function. *Prog Clin Biol Res* 74, 179-198.

Cardinali, D.P., Vacas, M.I., Boyer, E.E., 1979. Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 105, 437-441.

Cargnello, M., Roux, P.P., 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.

Caroleo, M.C., Nistico, G., Doria, G., 1992. Effect of melatonin on the immune system. *Pharmacol Res* 26 Suppl 2, 34-37.

Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., Garcia-Maurino, S., Reiter, R.J., Guerrero, J.M., 2004. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 18, 537-539.

Carrillo-Vico, A., Guerrero, J.M., Lardone, P.J., Reiter, R.J., 2005. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27, 189-200.

Cerione, R.A., Codina, J., Benovic, J.L., Lefkowitz, R.J., Birnbaumer, L., Caron, M.G., 1984. The mammalian beta 2-adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry* 23, 4519-4525.

Cerutti, P.A., 1994. Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 344, 862-863.

Chalmers, D.T., Behan, D.P., 2002. The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nat Rev Drug Discov* 1, 599-608.

Champier, J., Claustrat, B., Besancon, R., Eymin, C., Killer, C., Jouvet, A., Chamba, G., Fevre-Montange, M., 1997. Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci* 60, 2191-2197.

Chan, A.S., Lai, F.P., Lo, R.K., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Stanbridge, E.J., Wong, Y.H., 2002. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 14, 249-257.

Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., Stevens, R.C., 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.

Chetsawang, B., Chetsawang, J., Govitrapong, P., 2009. Protection against cell death and sustained tyrosine hydroxylase phosphorylation in hydrogen peroxide- and MPP-treated human neuroblastoma cells with melatonin. *J Pineal Res* 46, 36-42.

Clapham, D.E., Neer, E.J., 1993. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365, 403-406.

Coge, F., Guenin, S.P., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., Legros, C., Ouvry, C., Cohen, W., Renault, N., Nosjean, O., Malpoux, B., Delagrangé, P., Boutin, J.A., 2009. The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT(2) receptor. *Br J Pharmacol* 158, 1248-1262.

Cohen, G.B., Yang, T., Robinson, P.R., Oprian, D.D., 1993. Constitutive activation of opsin: influence of charge at position 134 and size at position 296. *Biochemistry* 32, 6111-6115.

Cohen, M., Roselle, D., Chabner, B., Schmidt, T.J., Lippman, M., 1978. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature* 274, 894-895.

Cos, S., Sanchez-Barcelo, E.J., 2000. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* 15, 637-647.

Costa, T., Herz, A., 1989. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7321-7325.

Dardente, H., Cermakian, N., 2005. [How many pieces to build a circadian clock?]. *Med Sci (Paris)* 21, 66-72.

Dardente, H., Wyse, C.A., Birnie, M.J., Dupre, S.M., Loudon, A.S., Lincoln, G.A., Hazlerigg, D.G., 2010. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol* 20, 2193-2198.

Davidson, B.L., Stein, C.S., Heth, J.A., Martins, I., Kotin, R.M., Derksen, T.A., Zabner, J., Ghodsi, A., Chiorini, J.A., 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3428-3432.

de Bodinat, C., Guardiola-Lemaitre, B., Mocaer, E., Renard, P., Munoz, C., Millan, M.J., 2010. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat Rev Drug Discov* 9, 628-642.

Devavry, S., legros, C., Brasseur, C., Delagrangé, P., Spadoni, G., Cohen, W., Boutin, J.A., Nosjean, O., 2011. Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT1 and hMT2 and discovery of inverse agonists. *J Pineal Res.*

Doolen, S., Krause, D.N., Duckles, S.P., 1999. Estradiol modulates vascular response to melatonin in rat caudal artery. *Am J Physiol* 276, H1281-1288.

Drazen, D.L., Nelson, R.J., 2001. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 74, 178-184.

Drew, J.E., Barrett, P., Mercer, J.G., Moar, K.M., Canet, E., Delagrangé, P., Morgan, P.J., 2001. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* 13, 453-458.

Drew, J.E., Barrett, P., Williams, L.M., Conway, S., Morgan, P.J., 1998. The ovine melatonin-related receptor: cloning and preliminary distribution and binding studies. *J Neuroendocrinol* 10, 651-661.

Dubocovich, M.L., 1983. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 306, 782-784.

Dubocovich, M.L., Delagrangé, P., Krause, D.N., Sugden, D., Cardinali, D.P., Olcese, J., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62, 343-380.

Dubocovich, M.L., Hudson, R.L., Sumaya, I.C., Masana, M.I., Manna, E., 2005. Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res* 39, 113-120.

Dubocovich, M.L., Masana, M.I., Iacob, S., Sauri, D.M., 1997. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355, 365-375.

Dubocovich, M.L., Rivera-Bermudez, M.A., Gerdin, M.J., Masana, M.I., 2003. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 8, d1093-1108.

Dubocovich, M.L., Yun, K., Al-Ghoul, W.M., Benloucif, S., Masana, M.I., 1998. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* 12, 1211-1220.

Dufourny, L., Levasseur, A., Migaud, M., Callebaut, I., Pontarotti, P., Malpoux, B., Monget, P., 2008a. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol* 8, 105.

Dufourny, L., Migaud, M., Thiery, J.C., Malpoux, B., 2008b. Development of an in vivo adeno-associated virus-mediated siRNA approach to knockdown tyrosine hydroxylase in the lateral retrochiasmatic area of the ovine brain. *J Neurosci Methods* 170, 56-66.

Duncan, M.J., 2007. Circannual prolactin rhythms: calendar-like timer revealed in the pituitary gland. *Trends Endocrinol Metab* 18, 259-260.

Duncan, M.J., Davis, F.C., 1993. Developmental appearance and age related changes in specific 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the suprachiasmatic nuclei of female Syrian hamsters. *Brain Res Dev Brain Res* 73, 205-212.

Dupre, S.M., Dardente, H., Birnie, M.J., Loudon, A.S., Lincoln, G.A., Hazlerigg, D.G., 2011. Evidence for RGS4 modulation of melatonin and thyrotrophin signalling pathways in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol*.

Duvernoy, H.M., Parratte, B., Tatu, L., Vuillier, F., 2000. The human pineal gland: relationships with surrounding structures and blood supply. *Neurol Res* 22, 747-790.

Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R., Reppert, S.M., 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6133-6137.

Ersahin, C., Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 2002. Constitutively active melatonin MT(1) receptors in male rat caudal arteries. *Eur J Pharmacol* 439, 171-172.

Favre, N., Fanelli, F., Missotten, M., Nichols, A., Wilson, J., di Tiani, M., Rommel, C., Scheer, A., 2005. The DRY motif as a molecular switch of the human oxytocin receptor. *Biochemistry* 44, 9990-10008.

Foreman, J.C., Johanson, T., 2003. Textbook of receptor pharmacology, 2nd ed. CRC Press.

Forsayeth, J.R., Eberling, J.L., Sanftner, L.M., Zhen, Z., Pivrotto, P., Bringas, J., Cunningham, J., Bankiewicz, K.S., 2006. A dose-ranging study of AAV-hAADC therapy in Parkinsonian monkeys. *Mol Ther* 14, 571-577.

Foster, R.G., Provencio, I., Bovee-Geurts, P.H., DeGrip, W.J., 2003. The photoreceptive capacity of the developing pineal gland and eye of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Neuroendocrinol* 15, 355-363.

Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., Palczewski, K., 2003. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* 421, 127-128.

Franke, R.R., Sakmar, T.P., Graham, R.M., Khorana, H.G., 1992. Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin. *J Biol Chem* 267, 14767-14774.

Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K.P., Ernst, O.P., 2003. Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2290-2295.

Gauer, F., Masson-Pevet, M., Saboureau, M., George, D., Pevet, P., 1993a. Differential seasonal regulation of melatonin receptor density in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nuclei: a study in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*, L.). *J Neuroendocrinol* 5, 685-690.

Gauer, F., Masson-Pevet, M., Skene, D.J., Vivien-Roels, B., Pevet, P., 1993b. Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* 57, 120-126.

Geary, G.G., Krause, D.N., Duckles, S.P., 1997. Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *Am J Physiol* 273, H1530-1536.

Gerdin, M.J., Masana, M.I., Ren, D., Miller, R.J., Dubocovich, M.L., 2003. Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 931-939.

Ghosh, A., Hellewell, J.S., 2007. A review of the efficacy and tolerability of agomelatine in the treatment of major depression. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 1999-2004.

Glass, J.D., 1986. Short photoperiod-induced gonadal regression: effects on the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system of the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Biol Reprod* 35, 733-743.

Gotze, K., Jakobs, K.H., 1994. Unoccupied beta-adrenoceptor-induced adenylyl cyclase stimulation in turkey erythrocyte membranes. *Eur J Pharmacol* 268, 151-158.

Grace, M.S., Cahill, G.M., Besharse, J.C., 1991. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res* 559, 56-63.

Guerrero, J.M., Reiter, R.J., 2002. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2, 167-179.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.

Hannibal, J., 2002. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 309, 73-88.

Hanon, E.A., Lincoln, G.A., Fustin, J.M., Dardente, H., Masson-Pevet, M., Morgan, P.J., Hazlerigg, D.G., 2008. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol* 18, 1147-1152.

- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R., Cardinali, D.P., 2006. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 313-316.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.W., 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-1070.
- Havern, R.L., Whisnant, C.S., Goodman, R.L., 1994. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. *Endocrinology* 134, 1905-1914.
- Hazlerigg, D.G., Gonzalez-Brito, A., Lawson, W., Hastings, M.H., Morgan, P.J., 1993. Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 132, 285-292.
- Herxheimer, A., 2005. Jet lag. *Clin Evid*, 2178-2183.
- Hibert, M.F., Trumpp-Kallmeyer, S., Bruinvels, A.T., Hoflack, J., 1991. [Modeling of hormonal receptors. Application to drug design]. *Therapie* 46, 445-451.
- Hilf, G., Jakobs, K.H., 1992. Agonist-independent inhibition of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes. *Eur J Pharmacol* 225, 245-252.
- Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.W., Park, J.H., Heck, M., Ernst, O.P., 2009. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem Sci* 34, 540-552.
- Hommel, J.D., Sears, R.M., Georgescu, D., Simmons, D.L., DiLeone, R.J., 2003. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9, 1539-1544.
- Hoyer, D., Boddeke, H.W., 1993. Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition. *Trends Pharmacol Sci* 14, 270-275.
- Imbesi, M., Uz, T., Dzitoyeva, S., Giusti, P., Manev, H., 2008. Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT1 and MT2 melatonin receptors. *Brain Res* 1227, 19-25.
- Iuvone, P.M., Tosini, G., Pozdeyev, N., Haque, R., Klein, D.C., Chaurasia, S.S., 2005. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 24, 433-456.
- Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., Stevens, R.C., 2008. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322, 1211-1217.
- Jankovic, B.D., Isakovic, K., Petrovic, S., 1970. Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. *Immunology* 18, 1-6.
- Jarzynka, M.J., Passey, D.K., Ignatius, P.F., Melan, M.A., Radio, N.M., Jockers, R., Rasenick, M.M., Brydon, L., Witt-Enderby, P.A., 2006. Modulation of melatonin receptors and G-protein function by microtubules. *J Pineal Res* 41, 324-336.
- Jimenez-Jorge, S., Jimenez-Caliani, A.J., Guerrero, J.M., Naranjo, M.C., Lardone, P.J., Carrillo-Vico, A., Osuna, C., Molinero, P., 2005. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *J Pineal Res* 39, 77-83.
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J.A., Delagrang, P., 2008. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 154, 1182-1195.
- Johnston, J.D., Messenger, S., Ebling, F.J., Williams, L.M., Barrett, P., Hazlerigg, D.G., 2003. Gonadotrophin-releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2831-2835.

Jou, M.J., Peng, T.I., Reiter, R.J., Jou, S.B., Wu, H.Y., Wen, S.T., 2004. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 37, 55-70.

Kalsbeek, A., Buijs, R.M., Engelmann, M., Wotjak, C.T., Landgraf, R., 1995. In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 682, 75-82.

Karbownik, M., Reiter, R.J., 2000. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med* 225, 9-22.

Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res* 40, 185-232.

Kato, K., Hirai, K., Nishiyama, K., Uchikawa, O., Fukatsu, K., Ohkawa, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Miyamoto, M., 2005. Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology* 48, 301-310.

Kaur, C., Ling, E.A., 2008. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem* 15, 3068-3080.

Kenakin, T., 1995. Agonist-receptor efficacy. I: Mechanisms of efficacy and receptor promiscuity. *Trends Pharmacol Sci* 16, 188-192.

Kenakin, T., 1996. The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol Rev* 48, 413-463.

Kenakin, T., 2001. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J* 15, 598-611.

Klein, D.C., 2007. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem* 282, 4233-4237.

Kokkola, T., Salo, O.M., Poso, A., Laitinen, J.T., 2005. The functional role of cysteines adjacent to the NRY motif of the human MT1 melatonin receptor. *J Pineal Res* 39, 1-11.

Konakchieva, R., Kyurkchiev, S., Kehayov, I., Taushanova, P., Kanchev, L., 1995. Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *J Neuroimmunol* 63, 125-132.

Koski, G., Streaty, R.A., Klee, W.A., 1982. Modulation of sodium-sensitive GTPase by partial opiate agonists. An explanation for the dual requirement for Na<sup>+</sup> and GTP in inhibitory regulation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 257, 14035-14040.

Krauchi, K., Cajochen, C., Danilenko, K.V., Wirz-Justice, A., 1997. The hypothermic effect of late evening melatonin does not block the phase delay induced by concurrent bright light in human subjects. *Neurosci Lett* 232, 57-61.

Krause, D.N., Barrios, V.E., Duckles, S.P., 1995. Melatonin receptors mediate potentiation of contractile responses to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery. *Eur J Pharmacol* 276, 207-213.

Krause, D.N., Geary, G.G., Doolen, S., Duckles, S.P., 1999. Melatonin and cardiovascular function. *Adv Exp Med Biol* 460, 299-310.

Kristiansen, K., 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103, 21-80.

Le Corre, S., Chemineau, P., 1993. Serotonergic 5HT2 receptors mediate the inhibitory action of serotonin on luteinizing hormone secretion in ovariectomized, estradiol-treated ewes that are refractory to short days. *Biol Reprod* 49, 140-147.

Lemoine, P., Guilleminault, C., Alvarez, E., 2007. Improvement in subjective sleep in major depressive disorder with a novel antidepressant, agomelatine: randomized, double-blind comparison with venlafaxine. *J Clin Psychiatry* 68, 1723-1732.

Leone, A.M., Francis, P.L., Silman, R.E., 1987. The isolation, purification, and characterisation of the principal urinary metabolites of melatonin. *J Pineal Res* 4, 253-266.

- LeSauter, J., Silver, R., 1998. Output signals of the SCN. *Chronobiol Int* 15, 535-550.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M.A., Guillaume, J.L., Couturier, C., Delagrangé, P., Jockers, R., 2006a. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 25, 3012-3023.
- Levoye, A., Jockers, R., Ayoub, M.A., Delagrangé, P., Savaskan, E., Guillaume, J.L., 2006b. Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?--Focus on melatonin receptors. *Chronobiol Int* 23, 419-426.
- Lewy, A.J., Lefler, B.J., Emens, J.S., Bauer, V.K., 2006. The circadian basis of winter depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7414-7419.
- Li, J., Edwards, P.C., Burghammer, M., Villa, C., Schertler, G.F., 2004. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J Mol Biol* 343, 1409-1438.
- Li, J., Huang, P., Chen, C., de Riel, J.K., Weinstein, H., Liu-Chen, L.Y., 2001. Constitutive activation of the mu opioid receptor by mutation of D3.49(164), but not D3.32(147): D3.49(164) is critical for stabilization of the inactive form of the receptor and for its expression. *Biochemistry* 40, 12039-12050.
- Lincoln, G.A., Clarke, I.J., 1994. Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 6, 251-260.
- Lincoln, G.A., Ebling, F.J., Martin, G.B., 1987. Endogenous opioid control of pulsatile LH secretion in rams: modulation by photoperiod and gonadal steroids. *J Endocrinol* 115, 425-438.
- Liu, A.C., Lewis, W.G., Kay, S.A., 2007. Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nat Chem Biol* 3, 630-639.
- Lucas, R.J., Freedman, M.S., Munoz, M., Garcia-Fernandez, J.M., Foster, R.G., 1999. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 505-507.
- MacKenzie, R.S., Melan, M.A., Passey, D.K., Witt-Enderby, P.A., 2002. Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 63, 587-595.
- Maggio, R., Novi, F., Scarselli, M., Corsini, G.U., 2005. The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *FEBS J* 272, 2939-2946.
- Mailliet, F., Audinot, V., Malpoux, B., Bonnaud, A., Delagrangé, P., Migaud, M., Barrett, P., Viaud-Massuard, M.C., Lesieur, D., Lefoulon, F., Renard, P., Boutin, J.A., 2004. Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors. *Biochem Pharmacol* 67, 667-677.
- Mailliet, F., Ferry, G., Vella, F., Berger, S., Coge, F., Chomarat, P., Mallet, C., Guenin, S.P., Guillaumet, G., Viaud-Massuard, M.C., Yous, S., Delagrangé, P., Boutin, J.A., 2005. Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol* 71, 74-88.
- Malek, Z.S., Dardente, H., Pevet, P., Raison, S., 2005. Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *Eur J Neurosci* 22, 895-901.
- Malpoux, B., 2006. Seasonal regulation of reproduction in mammals. *JD Neill*.
- Malpoux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G., Chemineau, P., 1998. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139, 1508-1516.
- Manno, C.S., Chew, A.J., Hutchison, S., Larson, P.J., Herzog, R.W., Arruda, V.R., Tai, S.J., Ragni, M.V., Thompson, A., Ozelo, M., Couto, L.B., Leonard, D.G., Johnson, F.A.,

- McClelland, A., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A.W., Kay, M.A., High, K.A., Glader, B., 2003. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101, 2963-2972.
- Mao, L., Cheng, Q., Guardiola-Lemaitre, B., Schuster-Klein, C., Dong, C., Lai, L., Hill, S.M., 2010. In vitro and in vivo antitumor activity of melatonin receptor agonists. *J Pineal Res* 49, 210-221.
- Masana, M.I., Doolen, S., Ersahin, C., Al-Ghoul, W.M., Duckles, S.P., Dubocovich, M.L., Krause, D.N., 2002. MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 1295-1302.
- Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 2001. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE* 2001, pe39.
- Masson-Pevet, M., Gauer, F., 1994. Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol Signals* 3, 63-70.
- Maurice, P., Daulat, A.M., Turecek, R., Ivankova-Susankova, K., Zamponi, F., Kamal, M., Clement, N., Guillaume, J.L., Bettler, B., Gales, C., Delagrang, P., Jockers, R., 2010. Molecular organization and dynamics of the melatonin MT receptor/RGS20/G(i) protein complex reveal asymmetry of receptor dimers for RGS and G(i) coupling. *EMBO J* 29, 3646-3659.
- Maywood, E.S., Bittman, E.L., Hastings, M.H., 1996. Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod* 54, 470-477.
- McNulty, S., Ross, A.W., Barrett, P., Hastings, M.H., Morgan, P.J., 1994. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 6, 523-532.
- McNulty, S., Ross, A.W., Shiu, K.Y., Morgan, P.J., Hastings, M.H., 1996. Phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis is regulated both by cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms. *J Neuroendocrinol* 8, 635-645.
- Message, S., Caillol, M., George, D., Martinet, L., 1997. Seasonal variation of melatonin binding sites in the pars tuberalis of the male mink (*Mustela vison*). *J Neuroendocrinol* 9, 523-528.
- Message, S., Caillol, M., Martinet, L., 1999. Long-term exposure of hypothalamic explants to melatonin alters the release of gonadotrophin releasing hormone and the density of melatonin binding sites in the pars tuberalis of the male mink (*Mustela vison*). *J Pineal Res* 26, 17-27.
- Mewes, T., Dutz, S., Ravens, U., Jakobs, K.H., 1993. Activation of calcium currents in cardiac myocytes by empty beta-adrenoceptors. *Circulation* 88, 2916-2922.
- Meyer, P., Pache, M., Loeffler, K.U., Brydon, L., Jockers, R., Flammer, J., Wirz-Justice, A., Savaskan, E., 2002. Melatonin MT-1-receptor immunoreactivity in the human eye. *Br J Ophthalmol* 86, 1053-1057.
- Migaud, M., Daveau, A., Malpoux, B., 2005. MTNR1A melatonin receptors in the ovine preammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. *Biol Reprod* 72, 393-398.
- Milano, C.A., Allen, L.F., Rockman, H.A., Dolber, P.C., McMinn, T.R., Chien, K.R., Johnson, T.D., Bond, R.A., Lefkowitz, R.J., 1994. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 264, 582-586.
- Milligan, G., 2003. Principles: extending the utility of [<sup>35</sup>S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol Sci* 24, 87-90.
- Mirshahi, M., Faure, J.P., Brisson, P., Falcon, J., Guerlotte, J., Collin, J., 1984. S-antigen immunoreactivity in retinal rods and cones and pineal photosensitive cells. *Biol Cell* 52, 195-198.



- Molinari, E.J., North, P.C., Dubocovich, M.L., 1996. 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur J Pharmacol* 301, 159-168.
- Moore, R.Y., 1995. Organization of the mammalian circadian system. *Ciba Found Symp* 183, 88-99; discussion 100-106.
- Moore, R.Y., Lenn, N.J., 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146, 1-14.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150, 112-116.
- Morgan, P.J., Barrett, P., Hazlerigg, D., Milligan, G., Lawson, W., MacLean, A., Davidson, G., 1995. Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. *J Neuroendocrinol* 7, 361-369.
- Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E., Helliwell, R., 1994. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24, 101-146.
- Morin, D., Cotte, N., Balestre, M.N., Mouillac, B., Manning, M., Breton, C., Barberis, C., 1998. The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities. *FEBS Lett* 441, 470-475.
- Morin, L.P., 1992. Serotonergic reinnervation of the hamster suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet without functional circadian rhythm recovery. *Brain Res* 599, 98-104.
- Morin, L.P., Blanchard, J.H., 2001. Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J Comp Neurol* 437, 79-90.
- Morrisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C.R., Schwartz, J.C., Arrang, J.M., 2000. High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408, 860-864.
- Musshoff, U., Riewenherm, D., Berger, E., Fauteck, J.D., Speckmann, E.J., 2002. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus* 12, 165-173.
- Nagaraja, S., Iyer, S., Liu, X., Eichberg, J., Bond, R.A., 1999. Treatment with inverse agonists enhances baseline atrial contractility in transgenic mice with chronic beta2-adrenoceptor activation. *Br J Pharmacol* 127, 1099-1104.
- Naji, L., Carrillo-Vico, A., Guerrero, J.M., Calvo, J.R., 2004. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 74, 2227-2236.
- Nakao, N., Ono, H., Yoshimura, T., 2008. Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions. *Reproduction* 136, 1-8.
- Neu, J.M., Niles, L.P., 1997. A marked diurnal rhythm of melatonin ML1A receptor mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 49, 303-306.
- Newman-Tancredi, A., Audinot, V., Moreira, C., Verrielle, L., Millan, M.J., 2000. Inverse agonism and constitutive activity as functional correlates of serotonin h5-HT(1B) receptor/G-protein stoichiometry. *Mol Pharmacol* 58, 1042-1049.
- Noguera, M.A., Ivorra, M.D., D'Ocon, P., 1996. Functional evidence of inverse agonism in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 119, 158-164.
- Nonno, R., Lucini, V., Spadoni, G., Pannacci, M., Croce, A., Esposti, D., Balsamini, C., Tarzia, G., Fraschini, F., Stankov, B.M., 2000. A new melatonin receptor ligand with mt1-agonist and MT2-antagonist properties. *J Pineal Res* 29, 234-240.
- Nonno, R., Pannacci, M., Lucini, V., Angeloni, D., Fraschini, F., Stankov, B.M., 1999. Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *Br J Pharmacol* 127, 1288-1294.

Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275, 31311-31317.

Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 61, 1369-1379.

Olcese, J.M., Cao, C., Mori, T., Mamcarz, M.B., Maxwell, A., Runfeldt, M.J., Wang, L., Zhang, C., Lin, X., Zhang, G., Arendash, G.W., 2009. Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res* 47, 82-96.

Olie, J.P., Kasper, S., 2007. Efficacy of agomelatine, a MT1/MT2 receptor agonist with 5-HT2C antagonistic properties, in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 10, 661-673.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.

Papp, M., Gruca, P., Boyer, P.A., Mocaer, E., 2003. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology* 28, 694-703.

Pappolla, M.A., Sos, M., Omar, R.A., Bick, R.J., Hickson-Bick, D.L., Reiter, R.J., Efthimiopoulos, S., Robakis, N.K., 1997. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci* 17, 1683-1690.

Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W., Ernst, O.P., 2008. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454, 183-187.

Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P., Clauser, E., 2002. Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* 13, 336-343.

Paul, P., Lahaye, C., Delagrangé, P., Nicolas, J.P., Canet, E., Boutin, J.A., 1999. Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J Pharmacol Exp Ther* 290, 334-340.

Peirson, S.N., Halford, S., Foster, R.G., 2009. The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2849-2865.

Pelletier, J., Bodin, L., Hanocq, E., Malpaux, B., Teyssier, J., Thimonier, J., Chemineau, P., 2000. Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel(1a) receptor in the ewe. *Biol Reprod* 62, 1096-1101.

Perreau-Lenz, S., Pevet, P., Buijs, R.M., Kalsbeek, A., 2004. The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int* 21, 1-25.

Pickard, G.E., 1982. The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *J Comp Neurol* 211, 65-83.

Pickering, D.S., Niles, L.P., 1990. Pharmacological characterization of melatonin binding sites in Syrian hamster hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 175, 71-77.

Piketty, V., 2001. Absence of sexual dimorphism in pars tuberalis [125I]-melatonin binding sites of lambs slaughtered in June and in October. *J Pineal Res* 30, 50-55.

Piketty, V., Pelletier, J., 1993. Melatonin receptors in the lamb pars tuberalis/median eminence throughout the day. *Neuroendocrinology* 58, 359-365.

Pin, J.P., Acher, F., 2002. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1, 297-317.

Poirel, V.J., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Gauer, F., 2002. MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 946, 64-71.

Premont, R.T., Inglese, J., Lefkowitz, R.J., 1995. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* 9, 175-182.

Price, R.D., Weiner, D.M., Chang, M.S., Sanders-Bush, E., 2001. RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters receptor-mediated activation of G13 protein. *J Biol Chem* 276, 44663-44668.

Prinster, S.C., Hague, C., Hall, R.A., 2005. Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 57, 289-298.

Ralph, M.R., Hurd, M.W., 1996. Pacemaker interactions in the mammalian circadian system. *Braz J Med Biol Res* 29, 77-85.

Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F., Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.

Rasmussen, S.G., Jensen, A.D., Liapakis, G., Ghanouni, P., Javitch, J.A., Gether, U., 1999. Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. *Mol Pharmacol* 56, 175-184.

Recio, J., Pevet, P., Vivien-Roels, B., Miguez, J.M., Masson-Pevet, M., 1996. Daily and photoperiodic melatonin binding changes in the suprachiasmatic nuclei, paraventricular thalamic nuclei, and pars tuberalis of the female Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Biol Rhythms* 11, 325-332.

Redman, J., Armstrong, S., Ng, K.T., 1983. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219, 1089-1091.

Reiter, R.J., 1991. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 79, C153-158.

Reiter, R.J., Paredes, S.D., Manchester, L.C., Tan, D.X., 2009a. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44, 175-200.

Reiter, R.J., Tan, D.X., Korkmaz, A., 2009b. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension. *J Hypertens Suppl* 27, S17-20.

Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., El-Sawi, M.R., 2002. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. *Ann N Y Acad Sci* 959, 238-250.

Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8734-8738.

Reppert, S.M., Perlow, M.J., Ungerleider, L.G., Mishkin, M., Tamarkin, L., Orloff, D.G., Hoffman, H.J., Klein, D.C., 1981. Effects of damage to the suprachiasmatic area of the anterior hypothalamus on the daily melatonin and cortisol rhythms in the rhesus monkey. *J Neurosci* 1, 1414-1425.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., 1995. Melatonin madness. *Cell* 83, 1059-1062.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63, 647-676.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T., 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177-1185.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T., Mahle, C.D., Kolakowski, L.F., Jr., 1996a. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett* 386, 219-224.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Godson, C., 1996b. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17, 100-102.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Rivkees, S.A., Stopa, E.G., 1988. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 242, 78-81.

Ribelayga, C., Gauer, F., Calgari, C., Pevet, P., Simonneaux, V., 1999. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 140, 1375-1384.

Roberts, C., Hatcher, P., Hagan, J.J., Austin, N.E., Jeffrey, P., Wyman, P., Gaster, L.M., Routledge, C., Middlemiss, D.N., 2000. The effect of SB-236057-A, a selective 5-HT<sub>1B</sub> receptor inverse agonist, on in vivo extracellular 5-HT levels in the freely-moving guinea-pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362, 177-183.

Roka, F., Brydon, L., Waldhoer, M., Strosberg, A.D., Freissmuth, M., Jockers, R., Nanoff, C., 1999. Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol* 56, 1014-1024.

Rouleau, A., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., Morisset, S., Gbahou, F., Schwartz, J.C., Arrang, J.M., 2002. Histamine H<sub>3</sub>-receptor-mediated [<sup>35</sup>S]GTP gamma[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H<sub>3</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 135, 383-392.

Rovati, G.E., Capra, V., Neubig, R.R., 2007. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* 71, 959-964.

Roy, D., Angelini, N.L., Fujieda, H., Brown, G.M., Belsham, D.D., 2001. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology* 142, 4711-4720.

Rozov, S.V., Filatova, E.V., Orlov, A.A., Volkova, A.V., Zhloba, A.R., Blashko, E.L., Pozdeyev, N.V., 2003. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine is a product of melatonin oxidation in rats. *J Pineal Res* 35, 245-250.

Sainz, R.M., Mayo, J.C., Rodriguez, C., Tan, D.X., Lopez-Burillo, S., Reiter, R.J., 2003. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 60, 1407-1426.

Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O., Leppaluoto, J., 2005. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci* 76, 1123-1134.

Savaskan, E., Ayoub, M.A., Ravid, R., Angeloni, D., Fraschini, F., Meier, F., Eckert, A., Muller-Spahn, F., Jockers, R., 2005. Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res* 38, 10-16.

Savaskan, E., Jockers, R., Ayoub, M., Angeloni, D., Fraschini, F., Flammer, J., Eckert, A., Muller-Spahn, F., Meyer, P., 2007. The MT2 melatonin receptor subtype is present in human retina and decreases in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 4, 47-51.

Savaskan, E., Wirz-Justice, A., Olivieri, G., Pache, M., Krauchi, K., Brydon, L., Jockers, R., Muller-Spahn, F., Meyer, P., 2002. Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. *J Histochem Cytochem* 50, 519-526.

Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., De Benedetti, P.G., Cotecchia, S., 1996. Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J* 15, 3566-3578.

Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.W., Hofmann, K.P., Ernst, O.P., 2008. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455, 497-502.

Schertler, G.F., Hargrave, P.A., 1995. Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11578-11582.

Schmid, H.A., 1993. Decreased melatonin biosynthesis, calcium flux, pineal gland calcification and aging: a hypothetical framework. *Gerontology* 39, 189-199.

Schneider, E.H., Seifert, R., 2010. Coexpression systems as models for the analysis of constitutive GPCR activity. *Methods Enzymol* 485, 527-557.

Schuhler, S., Pitrosky, B., Kirsch, R., Pevet, P., 2002. Entrainment of locomotor activity rhythm in pinealectomized adult Syrian hamsters by daily melatonin infusion. *Behav Brain Res* 133, 343-350.

Schuster, C., 2007. [Sites and mechanisms of action of melatonin in mammals: the MT1 and MT2 receptors]. *J Soc Biol* 201, 85-96.

Schwartz, J.C., 2011. The histamine H3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. *Br J Pharmacol* 163, 713-721.

Seifert, R., Wenzel-Seifert, K., 2002. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366, 381-416.

Sethi, S., Adams, W., Pollock, J., Witt-Enderby, P.A., 2008. C-terminal domains within human MT1 and MT2 melatonin receptors are involved in internalization processes. *J Pineal Res* 45, 212-218.

Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., Kobayashi, T., Stevens, R.C., Iwata, S., 2011. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* 475, 65-70.

Sidibe, A., Mullier, A., Chen, P., Baroncini, M., Boutin, J.A., Delagrangé, P., Prevot, V., Jockers, R., 2010. Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence. *J Pineal Res* 48, 263-269.

Simko, F., Pechanova, O., 2009. Potential roles of melatonin and chronotherapy among the new trends in hypertension treatment. *J Pineal Res* 47, 127-133.

Simonneaux, V., Ribelayga, C., 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55, 325-395.

Skene, D.J., Masson-Pevet, M., Pevet, P., 1993. Seasonal changes in melatonin binding sites in the pars tuberalis of male European hamsters and the effect of testosterone manipulation. *Endocrinology* 132, 1682-1686.

Skene, D.J., Papagiannidou, E., Hashemi, E., Snelling, J., Lewis, D.F., Fernandez, M., Ioannides, C., 2001. Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. *J Pineal Res* 31, 333-342.

Skwarlo-Sonta, K., Majewski, P., Markowska, M., Oblap, R., Olszanska, B., 2003. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 342-349.

Sliwinski, T., Rozej, W., Morawiec-Bajda, A., Morawiec, Z., Reiter, R., Blasiak, J., 2007. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair. *Mutat Res* 634, 220-227.

Slominski, A., Semak, I., Pisarchik, A., Sweatman, T., Szczesniewski, A., Wortsman, J., 2002. Conversion of L-tryptophan to serotonin and melatonin in human melanoma cells. *FEBS Lett* 511, 102-106.

Slotten, H.A., Krekling, S., Sicard, B., Pevet, P., 2002. Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav Brain Res* 133, 11-19.

Smit, M.J., Leurs, R., Alewijnse, A.E., Blauw, J., Van Nieuw Amerongen, G.P., Van De Vrede, Y., Roovers, E., Timmerman, H., 1996. Inverse agonism of histamine H2 antagonist accounts for upregulation of spontaneously active histamine H2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6802-6807.

- Smit, M.J., Vischer, H.F., Bakker, R.A., Jongejan, A., Timmerman, H., Pardo, L., Leurs, R., 2007. Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive G protein-coupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 53-87.
- Spadoni, G., Bedini, A., Diamantini, G., Tarzia, G., Rivara, S., Lorenzi, S., Lodola, A., Mor, M., Lucini, V., Pannacci, M., Caronno, A., Fraschini, F., 2007. Synthesis, enantiomeric resolution, and structure-activity relationship study of a series of 10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cycloheptene MT2 receptor antagonists. *ChemMedChem* 2, 1741-1749.
- Srinivasan, V., Smits, M., Spence, W., Lowe, A.D., Kayumov, L., Pandi-Perumal, S.R., Parry, B., Cardinali, D.P., 2006. Melatonin in mood disorders. *World J Biol Psychiatry* 7, 138-151.
- Stankov, B., Cozzi, B., Lucini, V., Fumagalli, P., Scaglione, F., Fraschini, F., 1991. Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. A comparative in vitro binding study. *Neuroendocrinology* 53, 214-221.
- Stefulj, J., Hortner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wolfler, A., Semmler, J., Liebmann, P.M., 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 30, 243-247.
- Stehle, J.H., von Gall, C., Schomerus, C., Korf, H.W., 2001. Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 16, 312-325.
- Sugden, D., 2003. Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem* 86, 1308-1311.
- Sugden, D., McArthur, A.J., Ajpru, S., Duniec, K., Piggins, H.D., 1999a. Expression of mt(1) melatonin receptor subtype mRNA in the entrained rat suprachiasmatic nucleus: a quantitative RT-PCR study across the diurnal cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 72, 176-182.
- Sugden, D., Yeh, L.K., Teh, M.T., 1999b. Design of subtype selective melatonin receptor agonists and antagonists. *Reprod Nutr Dev* 39, 335-344.
- Sumaya, I.C., Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 2005. The antidepressant-like effect of the melatonin receptor ligand luzindole in mice during forced swimming requires expression of MT2 but not MT1 melatonin receptors. *J Pineal Res* 39, 170-177.
- Sun, H., Chow, E.C., Liu, S., Du, Y., Pang, K.S., 2008. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 395-411.
- Tamarkin, L., Baird, C.J., Almeida, O.F., 1985. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227, 714-720.
- Tenn, C., Niles, L.P., 1993. Physiological regulation of melatonin receptors in rat suprachiasmatic nuclei: diurnal rhythmicity and effects of stress. *Mol Cell Endocrinol* 98, 43-48.
- Terrillon, S., Bouvier, M., 2004. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5, 30-34.
- Tessonnaud, A., Locatelli, A., Caldani, M., Viguier-Martinez, M.C., 1995. Bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei alter the nocturnal melatonin secretion in sheep. *J Neuroendocrinol* 7, 145-152.
- Thapan, K., Arendt, J., Skene, D.J., 2001. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol* 535, 261-267.
- Thiery, J.C., Gayrard, V., Le Corre, S., Viguie, C., Martin, G.B., Chemineau, P., Malpoux, B., 1995. Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil Suppl* 49, 285-296.
- Tijmes, M., Pedraza, R., Valladares, L., 1996. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids* 61, 65-68.

Tillet, Y., Caldani, M., Batailler, M., 1989. Anatomical relationships of monoaminergic and neuropeptide Y-containing fibres with luteinizing hormone-releasing hormone systems in the preoptic area of the sheep brain: immunohistochemical studies. *J Chem Neuroanat* 2, 319-326.

Trecherel, E., Batailler, M., Chesneau, D., Delagrangé, P., Malpoux, B., Chemineau, P., Migaud, M., Functional characterization of polymorphic variants for ovine MT1 melatonin receptors: Possible implication for seasonal reproduction in sheep. *Anim Reprod Sci.*

Trumpp-Kallmeyer, S., Chini, B., Mouillac, B., Barberis, C., Hoflack, J., Hibert, M., 1995. Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharm Acta Helv* 70, 255-262.

Turek, F.W., 1998. Circadian rhythms. *Horm Res* 49, 109-113.

Turek, F.W., Swann, J., Earnest, D.J., 1984. Role of the circadian system in reproductive phenomena. *Recent Prog Horm Res* 40, 143-183.

Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., Schertler, G.F., 1997. Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 389, 203-206.

Unger, V.M., Schertler, G.F., 1995. Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. *Biophys J* 68, 1776-1786.

Urizar, E., Montanelli, L., Loy, T., Bonomi, M., Swillens, S., Gales, C., Bouvier, M., Smits, G., Vassart, G., Costagliola, S., 2005. Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J* 24, 1954-1964.

van der Beek, E.M., van Oudheusden, H.J., Buijs, R.M., van der Donk, H.A., van den Hurk, R., Wiegant, V.M., 1994. Preferential induction of c-fos immunoreactivity in vasoactive intestinal polypeptide-innervated gonadotropin-releasing hormone neurons during a steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology* 134, 2636-2644.

Vanecek, J., 1988a. Melatonin binding sites. *J Neurochem* 51, 1436-1440.

Vanecek, J., 1988b. The melatonin receptors in rat ontogenesis. *Neuroendocrinology* 48, 201-203.

Vanecek, J., Kosar, E., 1994. Ontogenesis of melatonin receptors in anterior pituitary and pars tuberalis of golden hamsters. *Physiol Res* 43, 379-382.

Vanecek, J., Sugden, D., Weller, J., Klein, D.C., 1985. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* 116, 2167-2173.

Vanecek, J., Watanabe, K., 1998. Melatonin inhibits the increase of cyclic AMP in rat suprachiasmatic neurons induced by vasoactive intestinal peptide. *Neurosci Lett* 252, 21-24.

Varma, D.R., Shen, H., Deng, X.F., Peri, K.G., Chemtob, S., Mulay, S., 1999. Inverse agonist activities of beta-adrenoceptor antagonists in rat myocardium. *Br J Pharmacol* 127, 895-902.

Vella, F., Ferry, G., Delagrangé, P., Boutin, J.A., 2005. NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries. *Biochem Pharmacol* 71, 1-12.

Verdonk, E., Johnson, K., McGuinness, R., Leung, G., Chen, Y.W., Tang, H.R., Michelotti, J.M., Liu, V.F., 2006. Cellular dielectric spectroscopy: a label-free comprehensive platform for functional evaluation of endogenous receptors. *Assay Drug Dev Technol* 4, 609-619.

Viguie, C., Caraty, A., Locatelli, A., Malpoux, B., 1995. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed increase in LHRH and luteinizing hormone pulsatile secretion. *Biol Reprod* 52, 1114-1120.

Viswanathan, M., Laitinen, J.T., Saavedra, J.M., 1990. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6200-6203.

Viswanathan, M., Scalbert, E., Delagrangé, P., Guardiola-Lemaitre, B., Saavedra, J.M., 1997. Melatonin receptors mediate contraction of a rat cerebral artery. *Neuroreport* 8, 3847-3849.

Vollrath, L., 1979. Comparative morphology of the vertebrate pineal complex. *Prog Brain Res* 52, 25-38.

von Gall, C., Stehle, J.H., Weaver, D.R., 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309, 151-162.

von Gall, C., Weaver, D.R., Moek, J., Jilg, A., Stehle, J.H., Korf, H.W., 2005. Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci* 1040, 508-511.

Waldhauser, F., Waldhauser, M., Lieberman, H.R., Deng, M.H., Lynch, H.J., Wurtman, R.J., 1984. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology* 39, 307-313.

Wang, L.M., Suthana, N.A., Chaudhury, D., Weaver, D.R., Colwell, C.S., 2005. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 22, 2231-2237.

Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G., Tate, C.G., Schertler, G.F., 2008. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491.

Weaver, D.R., Liu, C., Reppert, S.M., 1996. Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10, 1478-1487.

Wehr, T.A., Duncan, W.C., Jr., Sher, L., Aeschbach, D., Schwartz, P.J., Turner, E.H., Postolache, T.T., Rosenthal, N.E., 2001. A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Arch Gen Psychiatry* 58, 1108-1114.

Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., Reppert, S.M., 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706.

Welsh, D.K., Takahashi, J.S., Kay, S.A., 2010. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 72, 551-577.

Wieland, K., Bongers, G., Yamamoto, Y., Hashimoto, T., Yamatodani, A., Menge, W.M., Timmerman, H., Lovenberg, T.W., Leurs, R., 2001. Constitutive activity of histamine h(3) receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H(3) antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 908-914.

Witt-Enderby, P.A., Bennett, J., Jarzynka, M.J., Firestone, S., Melan, M.A., 2003. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 72, 2183-2198.

Witt-Enderby, P.A., MacKenzie, R.S., McKeon, R.M., Carroll, E.A., Bordt, S.L., Melan, M.A., 2000. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton* 46, 28-42.

Witt-Enderby, P.A., Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 1998. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139, 3064-3071.

Workman, J.L., Nelson, R.J., 2010. Potential animal models of seasonal affective disorder. *Neurosci Biobehav Rev*.

Wu, Y.H., Zhou, J.N., Balesar, R., Unmehopa, U., Bao, A., Jockers, R., Van Heerikhuizen, J., Swaab, D.F., 2006. Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *J Comp Neurol* 499, 897-910.

Wynn, V.T., Arendt, J., 1988. Effect of melatonin on the human electrocardiogram and simple reaction time responses. *J Pineal Res* 5, 427-435.

Xiao, C.T., Chu, M.X., Fu, Y., Fang, L., Ye, S.C., 2007. Analysis of polymorphism, structure and function of exon 2 of ovine melatonin receptor 1b gene: a clue as to why it lacks expression in sheep. *J Pineal Res* 42, 97-104.



- Yan, L., Silver, R., 2002. Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur J Neurosci* 16, 1531-1540.
- Yasuo, S., Nakao, N., Ohkura, S., Iigo, M., Hagiwara, S., Goto, A., Ando, H., Yamamura, T., Watanabe, M., Watanabe, T., Oda, S., Maeda, K., Lincoln, G.A., Okamura, H., Ebihara, S., Yoshimura, T., 2006. Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short-day breeder: implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology* 147, 432-440.
- Young, I.M., Leone, R.M., Francis, P., Stovell, P., Silman, R.E., 1985. Melatonin is metabolized to N-acetyl serotonin and 6-hydroxymelatonin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 60, 114-119.
- Zarazaga, L.A., Malpoux, B., Guillaume, D., Bodin, L., Chemineau, P., 1998. Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. *Am J Physiol* 274, E1086-1090.
- Zawilska, J.B., Skene, D.J., Arendt, J., 2009. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 61, 383-410.
- Zhao, X., Yokoyama, K., Whitten, M.E., Huang, J., Gelb, M.H., Palczewski, K., 1999. A novel form of rhodopsin kinase from chicken retina and pineal gland. *FEBS Lett* 454, 115-121.
- Zhou, J., Zhang, S., Zhao, X., Wei, T., 2008. Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid-beta1-42. *J Pineal Res* 45, 157-165.





Séverine DEVAVRY



# Récepteurs de la mélatonine : pharmacologie du récepteur ovin MT<sub>2</sub>, identification de leur activité constitutive et développement d'une approche par ARN interférent



## Résumé

La mélatonine est une hormone synthétisée et sécrétée uniquement la nuit par la glande pinéale. Son rôle principal est son implication dans la synchronisation de la saison de reproduction. La mélatonine se lie aux récepteurs, MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub>, membres de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG).

Le clonage récent du récepteur ovin MT<sub>2</sub> a remis en cause toutes les données connues. La pharmacologie et les voies de signalisation du récepteur oMT<sub>2</sub> ont été étudiées et sont communes à celles des récepteurs des autres espèces. En revanche, oMT<sub>2</sub> possède une originalité de séquence avec la présence du motif DRY, fortement impliqué dans l'établissement de l'activité constitutive des RCPG. D'une part, nous avons montré que l'ensemble des récepteurs MT possèdent une activité constitutive. D'autre part, nous avons identifié deux agonistes inverses pour les récepteurs hMT<sub>2</sub>, initialement décrits comme antagonistes. Dans l'optique de discriminer les rôles respectifs des récepteurs MT *in vivo*, le développement d'une approche par ARN interférents a été validée dans un modèle cellulaire, la lignée CHO-K1 exprimant les récepteurs ovins et de rat.

**Mots-clés : Mélatonine, RCPG, ovin, activité constitutive, agonistes inverses, ARN interférents**

## Résumé en anglais

Melatonin is a hormone synthesized and secreted only during night by pineal gland. A main role of melatonin concerns its implication in the synchronisation of reproductive seasonality. Binding sites of melatonin are MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptors which belong to the superfamily of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors (GPCRs).

Recent cloning of ovine MT<sub>2</sub> receptor has challenged the knowledge about melatonin receptors. We demonstrated that its pharmacology and signalling pathways were similar to subtype 2 receptor of others species (human and rat). Nevertheless, oMT<sub>2</sub> receptor possesses a particularity of sequence, with the presence of DRY motif which is known to be involved in the establishment of constitutive activity of GPCRs. In our study, we demonstrated the existence of constitutive activity for all the melatonin receptors. In addition, we identified two inverse agonists for human MT<sub>2</sub> receptors, previously described as antagonists. To describe the respective roles of each subtype of melatonin receptors *in vivo*, siRNA approach was developed in cell line, CHO-K1 expressing ovine and rat melatonin receptors.

**Key words: Melatonin, GPCR, ovine, constitutive activity, inverse agonists, siRNA**