

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

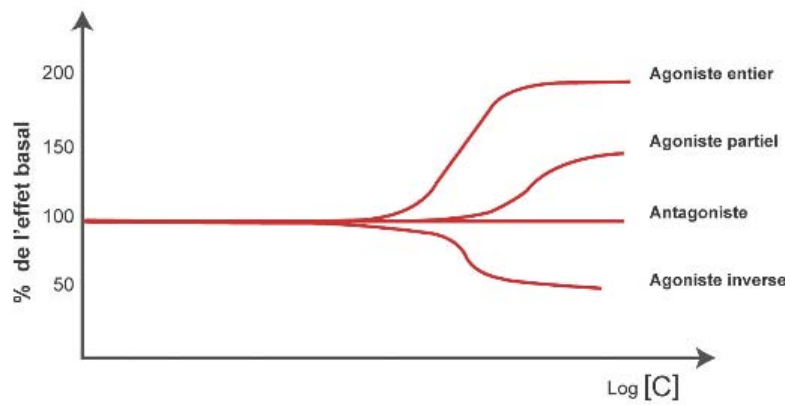


Figure 20: Représentation schématique du comportement pharmacologique de différents ligands : les agonistes (pleins ou partiels), les antagonistes et les agonistes inverses (pleins ou partiels).

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.

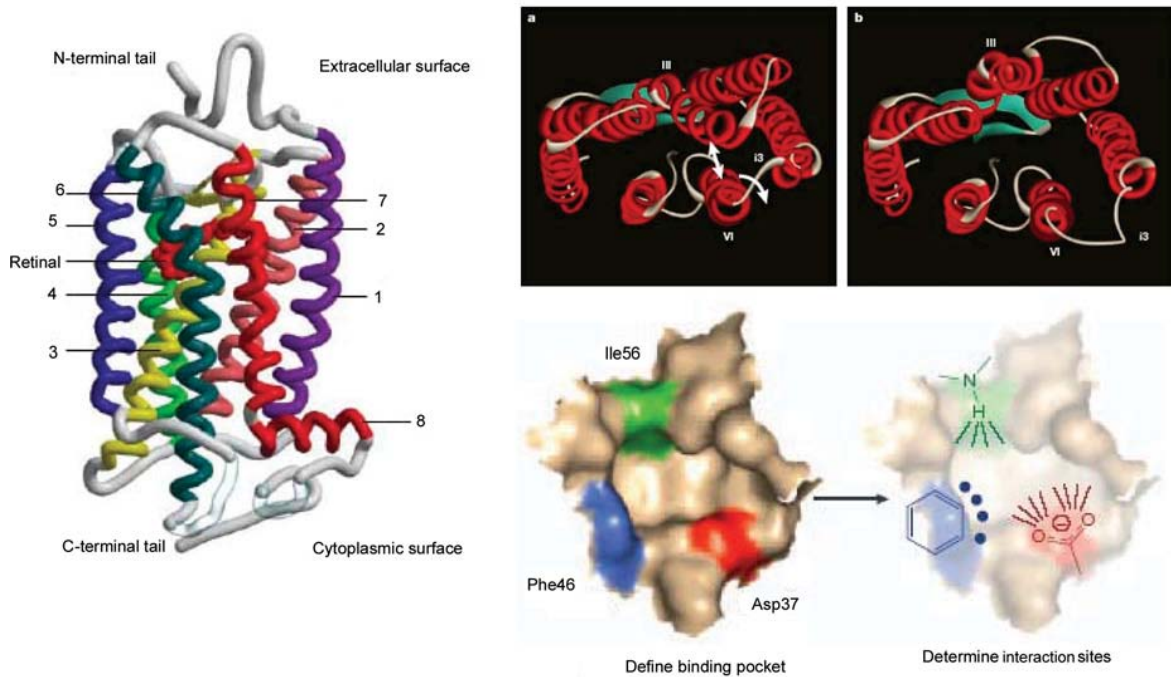


Figure 21: Structure de la rhodopsine bovine avec son ligand lié, le rétinal. La structure est présentée perpendiculairement et parallèlement au plan de la membrane. D'après Strosberg et al., 2007.

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 β 1-adrénérergique, le récepteur β 2-adrénérergique, 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 α 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

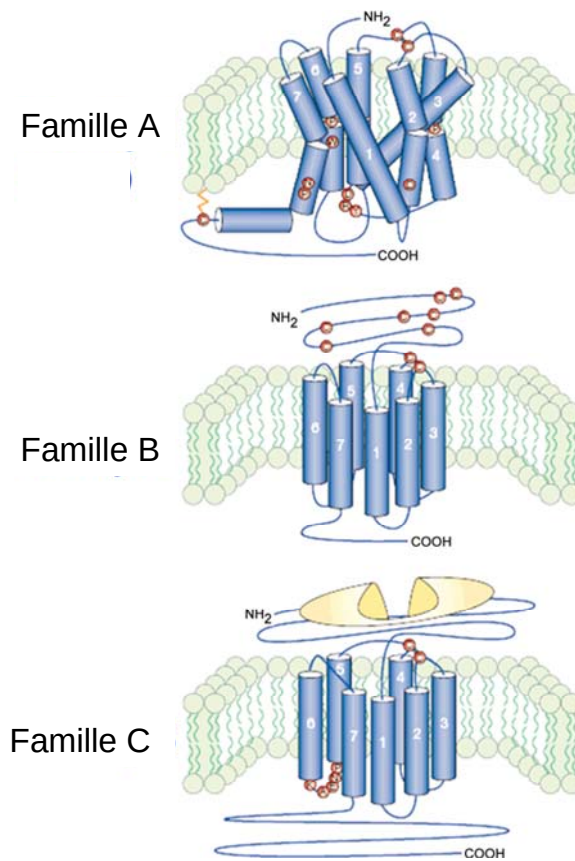


Figure 22: Structure schématique d'un exemple de chaque récepteur des trois familles des récepteurs couplés aux protéins G. Adapté de Strosberg A.D., 2007.

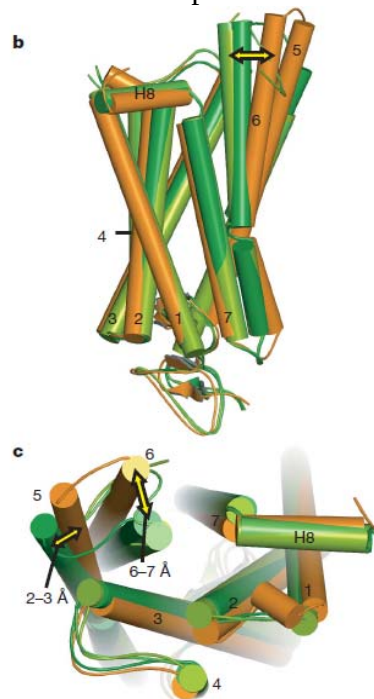


Figure 23: Structure de l'opsine. Les hélices sont représentées comme des bâtonnets et les boucles ont été estompées pour plus de clareté. b) vue de coté, c) vue du côté cytoplasmique. La double flèche jaune indique les différentes positions du segment cytoplasmique du domaine transmembranaire TM6, avec 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 α , 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)_{5,6}F du TM 7. A l'état inactif, les

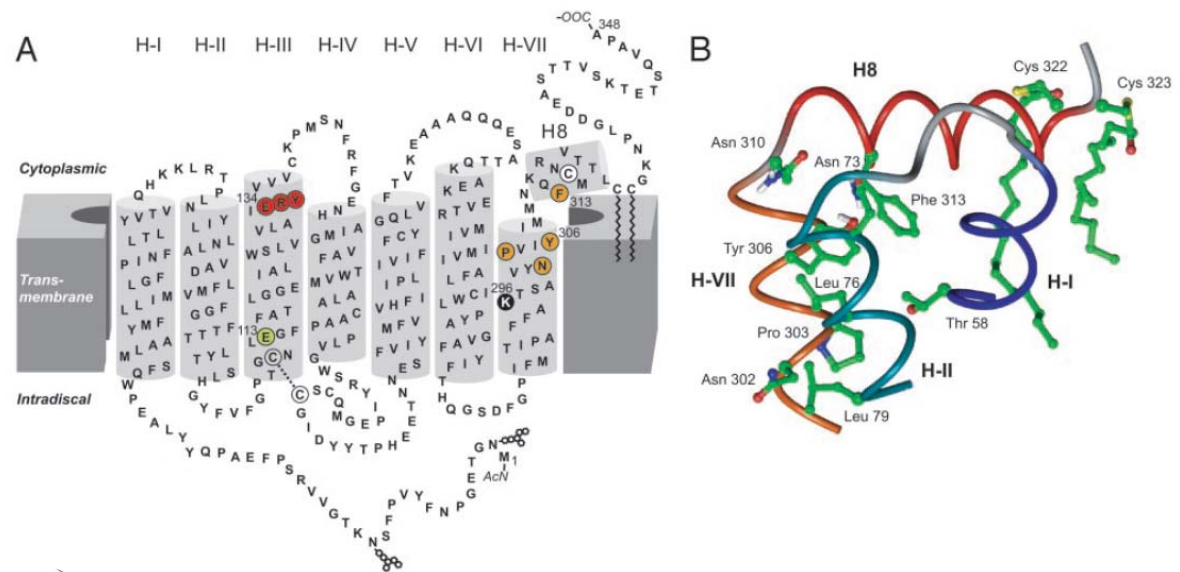


Figure 24: Motifs D(E)RY et NPxxY(x)5,6F de la rhodopsine. (A) Schéma de la structure secondaire de la rhodopsine bovine avec les motifs conservés D(E)RY (rouge) et NPxxY(x)5,6F (orange) dans l'hélice transmembranaire 3 (H-III) et 7 (H-VII), respectivement. Dans la structure cristalline, une hélice amphipatique 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)_{5,6}F est impliqué dans deux types d'interaction à l'état inactif. La tyrosine du motif NPxxY(x)_{5,6}F forme une liaison avec la phénylalanine (F 7.60) de l'hélice 7. L'asparagine du motif NPxxY(x)_{5,6}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)_{5,6}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)_{5,6}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)_{5,6}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 α 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 α et d'un dimère β - γ . 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 α : G_s , G_i , G_q et G_{12} . En absence de ligand sur le récepteur, la protéine G est sous forme inactive, c'est à dire que la sous-unité α est liée au GDP (guanine nucleotide diphosphate) et qu'ils forment avec le dimère β - γ un trimère. Une fois le ligand fixé au récepteur, la sous-unité α s'active en échangeant le GDP avec un GTP (guanine nucleotide tri-

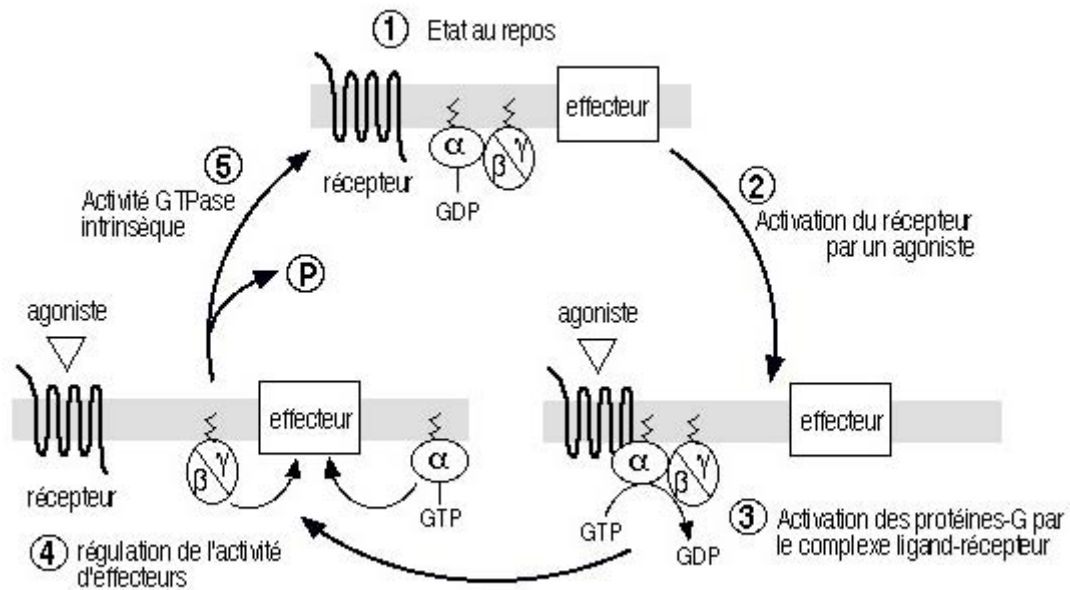


Figure 25 : Représentation schématique de l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G hétérotrimériques : dissociation des protéines G. α : sous-unité α , $\beta\gamma$: dimère des sous-unités $\beta\gamma$, GDP : guanosine diphosphate, GTP : guanosine triphosphate. D'après site internet rcpg.chez.com.

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 α et d'autre part, le dimère β - γ . La sous-unité α interagit avec les différents effecteurs des voies de signalisation impliquées dans la réponse pharmacologique. Il est désormais admis que le dimère β - γ pouvait également être impliqué dans la signalisation (Clapham and Neer, 1993). La sous-unité α 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 δ (Koski et al., 1982) et pour les récepteurs β 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 β 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 β 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_{1B} 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 β -adrénergiques exprimés dans du tissu cardiaque (Varma et al., 1999), les récepteurs α_{1A} et α_{1D} -adrénergiques exprimés dans l'aorte de rat (Noguera et al., 1996), les récepteurs à la sérotonine 5-HT_{1B} 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_{2C} *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 [³H]-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, ML₁ et ML₂, sur la base des différences d'affinité et de cinétique de liaison avec le radioligand de référence, la 2-[¹²⁵I]-iodo-mélatonine (2-[¹²⁵I]-MLT), ainsi que des différences au niveau des profils pharmacologiques de ligands synthétiques (la 2-iodo-mélatonine, la N-acétyl-sérotonine et la mélatonine). ML₁ présente une affinité pour la 2-[¹²⁵I]-MLT, de l'ordre du

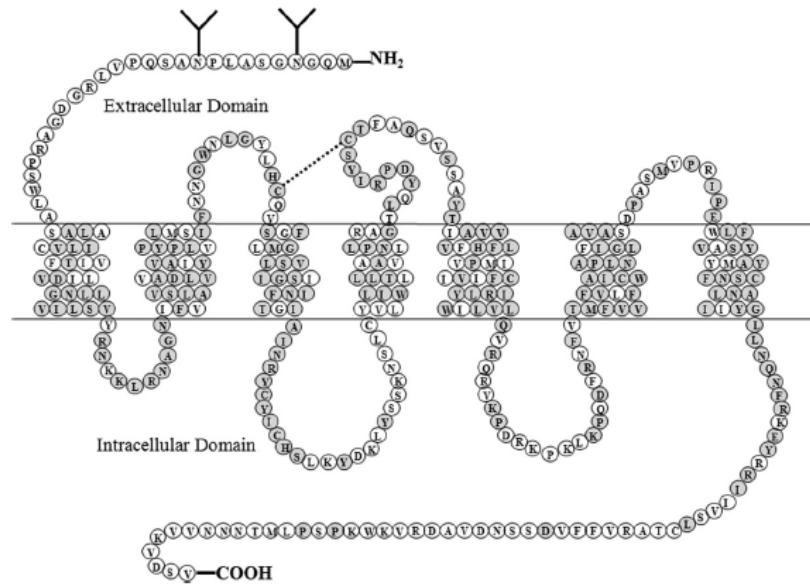


Figure 26: Structure protéique schématisée du récepteur hMT₁. Les cercles gris correspondent aux acides aminés communs aux récepteurs hMT₁ et hMT₂. D'après Reppert and Weaver (1995).

picomolaire, alors que ML₂ 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 ML₂ a été pharmacologiquement caractérisé et renommé MT₃ (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-[¹²⁵I]-MLT sur le site de liaison MT₃, avec un profil pharmacologique distinct de celui des récepteurs couplés aux protéines G, MT₁ et MT₂ (Mailliet et al., 2005; Nosjean et al., 2001; Paul et al., 1999). Le site de liaison MT₃ 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-[¹²⁵I]-MLT identique au profil de liaison de MT₃ 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 (Mel_{1c}) 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 ML₁ : Mel_{1a}, actuellement MT₁; Mel_{1b}, correspondant à MT₂ 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 MT₁ et MT₂ 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 MT₁ et MT₂ présentent une forte identité de

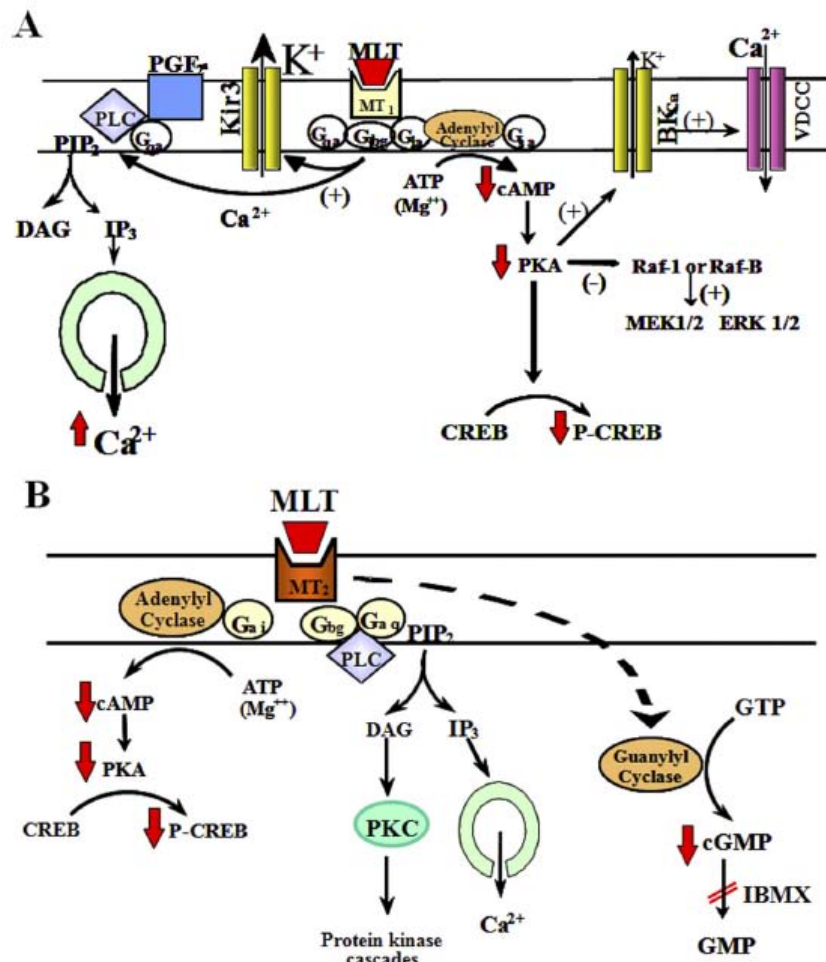


Figure 27 : Voies de signalisation des récepteurs mélatoninergiques MT₁ (A) et MT₂ (B). cAMP : adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate, BK_{Ca} : canal potassique activé par le calcium, Ca²⁺ : ion calcium, CREB : protéine se liant à l'élément de réponse liant l'AMPc, DAG : diacylglycérol, ER : réticulum endoplasmique, FP : récepteur de la prostaglandine F_{2α}, G_{ai}, G_{βγi} et G_{αq} : sous-unités des protéines Gi et Gq, GMP : guanosine monophosphate, GTP : guanosine triphosphate, IBMX : isobutykmethylxantine, IP₃ : inositol triphosphate, MLT : mélatonine, MT₁ et MT₂ : sous-types 1 et 2 des récepteurs membranaires de la mélatonine, P-CREB : forme phosphorylée de CREB, PGF_{2α} : Prostaglandine F_{2α}, PIP₂ : 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 MT₂ ovin possède un motif DRY. Les récepteurs MT₂ 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 MT₁ présente deux sites de glycosylation potentielle sur des résidus asparagine (Asn), alors que celle du récepteur MT₂ n'en possède qu'un seul. L'extrémité C-terminale des deux récepteurs contient un site pour la caséine kinase 1 α , 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)						Cellules CHO					
	hMT1			hMT2			Test de liaison			Stimulation GTPγS		
	hMT1 (pKi)	hMT2 (pKi)	Ratio Ki (MT1/MT2)	hMT1 (pEC50)	hMT2 (pEC50)	Ratio pEC50 (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	9.7	9.8	1.1	11	10.1	0.1
S 20098	9.1	10.2	14	8.8	10	16	8.8	10	16	9.4	10.3	7.9
Mélatonine	9.1	9.8	4.9	8.6	9.8	4.5	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	8.3	9.3	9.6	8	9.0	12.6
6-chloromélatonine	7.9	9.7	57	8.3	9.3	9.6	8.3	9.3	9.6	8.1	9.8	50
6-hydroxymélatonine	9.4	8.3	7.3	8.3	9.3	9.6	8.3	9.3	9.6	7.2	7.4	0.6
5-méthoxyluzindole	7.5	9.6	130	7.2	8.5	20	7.2	8.5	20	N.D	N.D	
8M-PDOT	7.2	8.5	20	6.7	6.7	1.2	6.7	6.7	1.2	5.7	6.6	7.9
N-acétylsérotinine	5.6	6.6	10	5.6	6.6	10	5.6	6.6	10	N.D	N.D	
5-MCA-NAT	8.4	10.3	90	8.4	10.3	90	8.4	10.3	90	8.7	10.3	44
Ilk7												

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 MT₁

Le couplage des récepteurs MT₁ peut se faire avec des protéines hétérotrimériques inhibitrices G_i, sensibles à la toxine pertussique (PTX), inhibiteur spécifique, et avec des protéines G_{q/11}, insensibles à la PTX. Lors de la liaison de la mélatonine sur son récepteur de type 1, une protéine G_i 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 MT₁ peuvent directement activer la voie de la phospholipase C (PLC), ou indirectement via la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine G. L'activation des récepteurs MT₁ peut réguler également certains canaux ioniques. Dans des cellules de *pars tuberalis* ovine, l'activation des récepteurs MT₁ entraîne l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Ca²⁺) 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 MT₁, la mélatonine agit via les protéines G sensibles à la PTX et inhibe le flux calcique. Les récepteurs MT₁ peuvent également se coupler aux canaux potassiques activés par le calcium (BK_{Ca2+}) 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 MT₂

Les récepteurs MT₂ 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 MT₂ 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 MT₂ sont couplés à la voie de signalisation de l'inositol triphosphate (IP₃). En effet, la liaison de la mélatonine sur MT₂ induit l'activation d'une protéine G_q qui active la phospholipase C (PLC). Celle-ci produit à partir d'un lipide transmembranaire, le phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP₂), le diacyl glycérol (DAG) et le second messager, l'IP₃. L'IP₃ possède des récepteurs exprimés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, ainsi il module le relargage intracellulaire du Ca²⁺.

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 MT₁ et MT₂ présentent une affinité de l'ordre du picomolaire pour le radioligand de référence, 2-[¹²⁵I]-iodomélatonine. Les récepteurs MT₁ et MT₂, 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-acétylsérotonine >> sérotonine. Par ailleurs, le récepteur MT₁ se distingue du récepteur MT₂ 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 MT₂ 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 MT₂ que pour MT₁ 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 MT₂. Cependant, le ratio d'affinité MT₁/MT₂ (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 MT₂ que pour MT₁. Les ligands spécifiques et sélectifs de MT₂, 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 MT₁/MT₂ (Ayoub et al., 2004). Le HEAT (5-hydroxyethoxy-N-acetyltryptamine), un ligand non-sélectif MT₁ et MT₂, montre des efficacités différentes en agissant comme un agoniste plein pour MT₁ et comme un antagoniste de MT₂ (Nonno et al., 2000). IIK7 est un agoniste sélectif de MT₂, 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 MT₁ 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 MT₁ (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 hMT₁, ces molécules présenteraient une plus grande affinité pour MT₁ en présence plutôt qu'en absence de GTP. De plus, le luzindole et le 4P-PDOT diminueraient la liaison basale du [³⁵S]-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-[¹²⁵I]-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 MT₁ et MT₂ 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 MT₁ 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 MT₁ et MT₂ 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 MT₁ 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 MT₂ 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 MT₁ versus celle du récepteur MT₂ n'est pas bien établie. Chez des nombreuses espèces, incluant l'homme, les ARNm codant pour les récepteurs MT₁ et MT₂ 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 MT₁ induit une vasoconstriction alors que celle du récepteur MT₂ 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_{Ca2+}). Ces résultats sont cependant controversés. 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 MT₁, l'expression des gènes horloges (*mPer1*, *mCry1*, *Clock*, and *Bmal1*) est diminuée drastiquement. Ces résultats permettent d'identifier le rôle du récepteur MT₁ exprimé dans la *pars tuberalis*, chez la souris. En effet, en agissant par les récepteurs MT₁, 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 MT₁ et /ou MT₂, 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 (MT₁ et MT₂) 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 MT₂ (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.

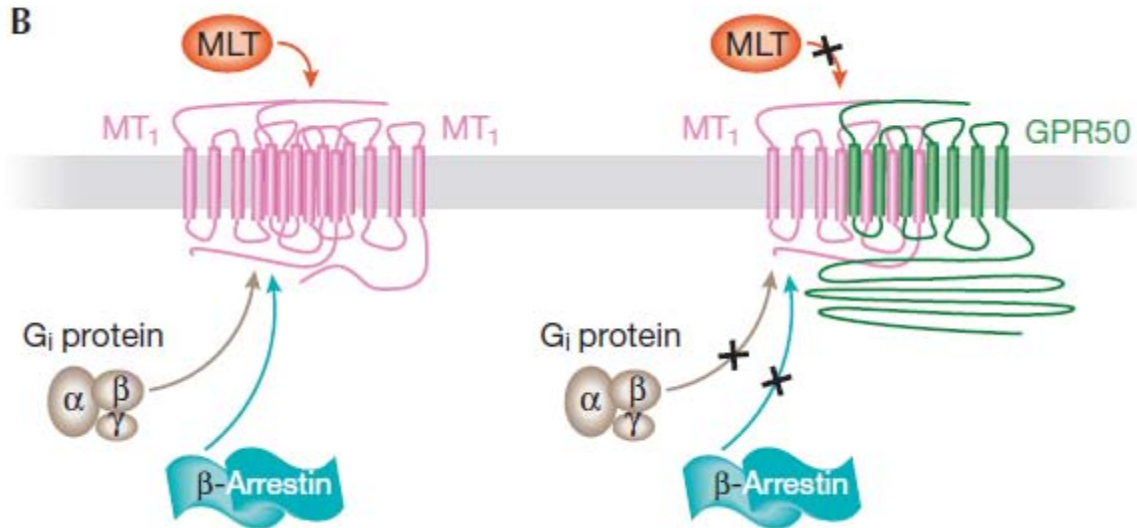


Figure 29: Dimérisation des récepteurs MT₁ et GPR50. La stimulation des homodimères MT₁ (rose) avec la mélatonine augmente le couplage avec les protéines Gi et le recrutement des β-arrestines, et inhibe la production d'AMPc. La coexpression avec le récepteur orphelin GPR50 (vert) empêche les interactions avec les β-arrestines et les protéines Gi, 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 Levoe 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, MT₁, MT₂ 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 MT₁, MT₂ et GPR50 peuvent former des homodimères mais également des hétérodimères (Ayoub et al., 2002). La formation d'hétérodimères MT₁/MT₂ semblerait modifier la fonctionnalité de ceux-ci. En effet, le profil pharmacologique de l'hétérodimère MT₁/MT₂ 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 MT₁ et MT₂ est conservée. Dans le cas de l'hétérodimère MT₁/GPR50, la capacité de liaison de la mélatonine par le récepteur MT₁ est complètement perdue, ainsi que son couplage avec les protéines Gi et les β-arrestines (Levoye et al., 2006b). En revanche, l'hétérodimérisation du récepteur MT₂ avec le récepteur GPR50 ne modifie pas la fonction de MT₂. 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 (MT₁ et MT₂) 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

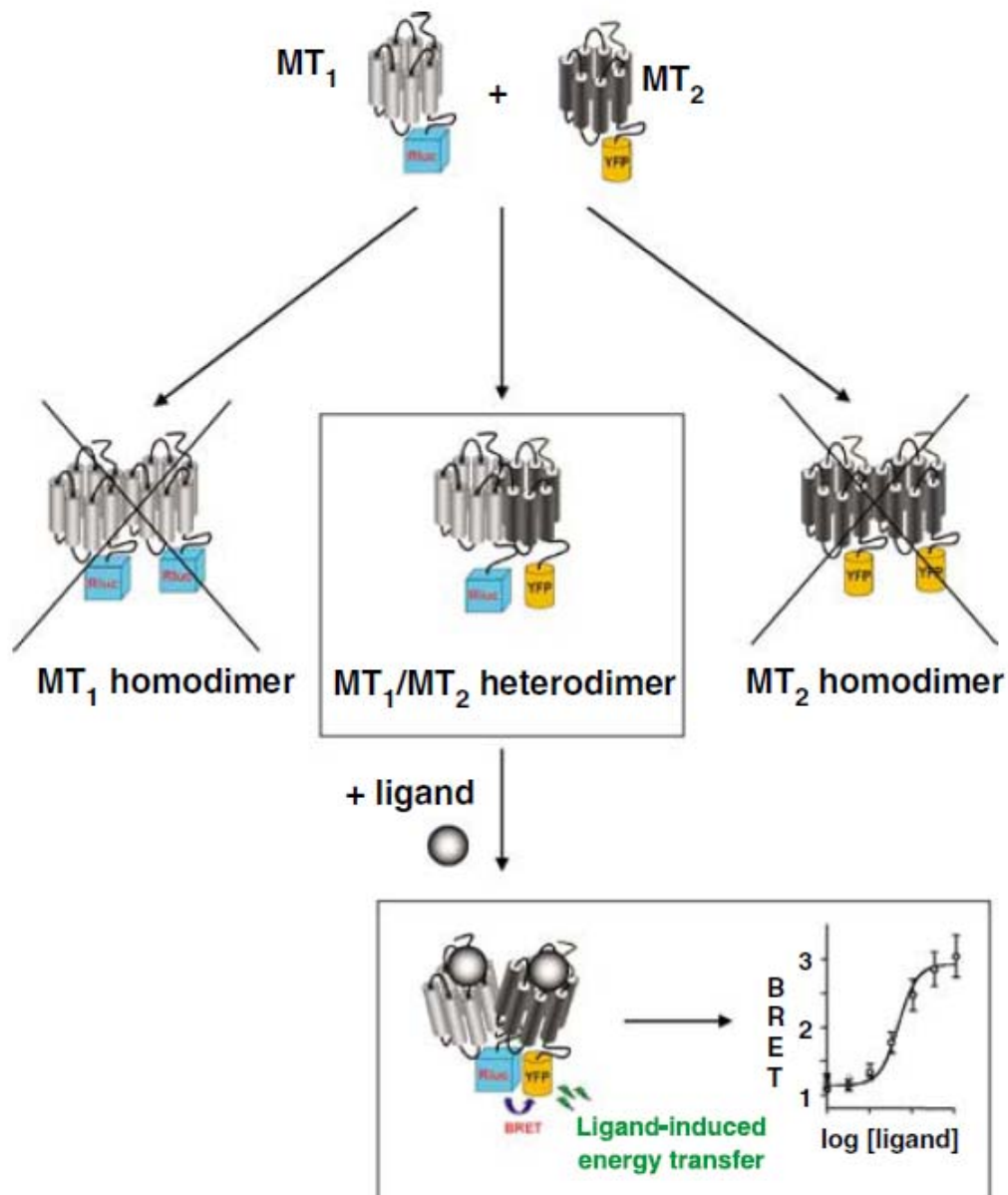


Figure 30: Détermination du profil pharmacologique des hétérodimères MT₁/MT₂ par BRET (transfert d'énergie par résonance de bioluminescence). La co-expression des protéines de fusion MT₁-Rluc (luciférase Renilla) et MT₂-YFP (variant jaune de la protéine verte fluorescente) résulte en la formation de trois espèces d'oligomères différents (homodimères MT₁-Rluc, homodimères MT₂-YFP et hétérodimères MT₁-Rluc/MT₂-YFP). La technique de BRET permet de détecter uniquement les hétérodimères MT₁-Rluc/MT₂-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 MT₁, MT₂ 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 MT₁ et MT₂ 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 MT₁ ainsi que le récepteur lui-même sont présents à la naissance, mais diminuent drastiquement ensuite. Vingt et un jours après la naissance, le récepteur MT₁ 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 β -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 MT₁ et MT₂ 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 (EC₅₀) 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 MT₁ et MT₂ 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 MT₁ humain (hMT₁) n'est observée. En revanche, suite à une exposition longue à des concentrations supra-physiologiques (100nM), la densité des récepteurs hMT₁ et hMT₂ 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 MT₁ et MT₂ 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 MT₁, 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 hMT₂ exprimés dans la lignée CHO. Ces phénomènes ne sont pas observés dans la lignée CHO exprimant les récepteurs hMT₁ (Gerdin et al., 2003). Cette régulation différentielle des récepteurs hMT₁ et hMT₂ pourrait être le mécanisme par lequel la mélatonine régule dans le temps ses effets physiologiques.

D'autre part, les récepteurs hMT₁ exprimés dans des cellules de mammifères non-neuronales seraient constitutivement actifs (Ersahin et al., 2002; Roka et al., 1999). Les récepteurs hMT₁ 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 mutagénèse dirigée ont montré que l'extrémité C-terminale des récepteurs MT₁ et MT₂ 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 α 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 stœchiométrie 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).

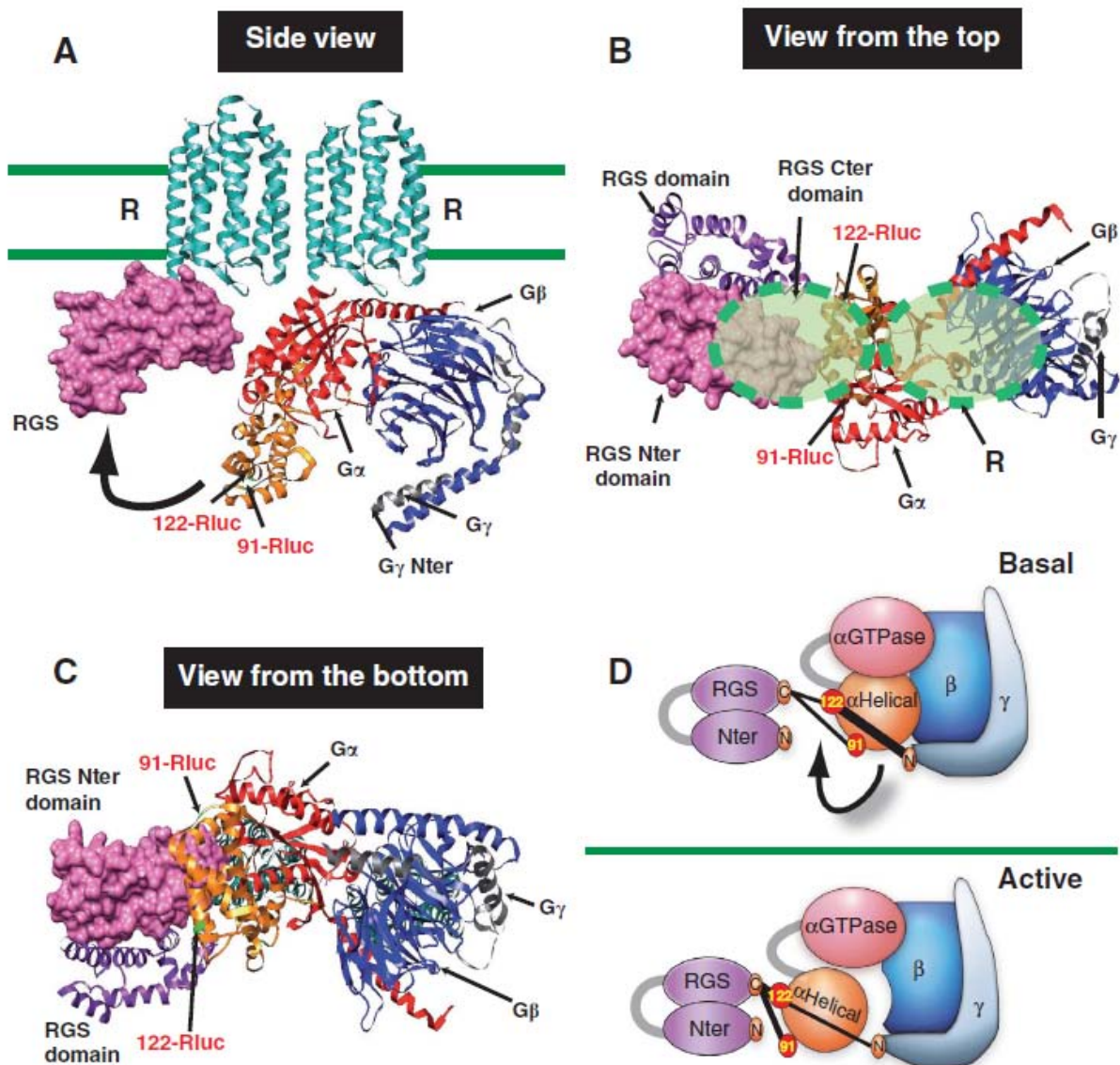


Figure 31 : Schéma de l'organisation asymétrique du complexe protéique MT₁/Gi/RGS20 à l'état basal et à l'état activé par la mélatonine. (A-C) Représentation schématique du complexe entre le dimère de RCPG, la protéine G hétérotrimérique et la RGS (protéine régulatrices de la signalisation des protéines 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 MT₁/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 MT₁ et MT₂. 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 oMT₂.** Le clonage du récepteur oMT₂ dans son intégralité a été réalisé pour la première fois dans notre laboratoire à partir de rétines de mouton. L'expression stable du récepteur oMT₂ dans la lignée cellulaire CHO-K1 a permis la caractérisation pharmacologique et fonctionnelle du récepteur oMT₂, 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 oMT₂ 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 MT₂ ovin est similaire à celle des autres récepteurs MT₂ étudiés (humain et rat). La seule particularité du récepteur oMT₂ 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 oMT₂ 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 MT₁ et/ou MT₂. 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 MT₁ et MT₂ 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-[¹²⁵I]-iodo-mélatonine qu'au niveau transcriptionnel, par des RT-PCR en temps réel.