

Sites et mécanismes d'action de la mélatonine chez les Mammifères : les récepteurs MT1 et MT2

par Carole Schuster

Institut de Recherches Internationales Servier (IRIS), 29-31, rue du Pont, 92578 Neuilly Sur Seine Cedex.
Tél. : 01 55 72 61 75. Fax : 01 55 72 31 01. E-mail : carole.schuster-klein@fr.netgrs.com

Reçu le 8 mars 2007

RÉSUMÉ

La sécrétion rythmique de mélatonine par la glande pinéale joue un rôle clé dans la synchronisation des fonctions circadiennes et saisonnières avec les variations cycliques de l'environnement. Les effets biologiques de cette neurohormone sont relayés principalement par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Ces récepteurs, appelés MT1 et MT2, sont présents dans un grand nombre de structures centrales et périphériques chez les Mammifères avec de grandes variations inter-espèces. Néanmoins, seuls les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus, siège de la principale horloge biologique circadienne, et la *pars tuberalis* de l'adénohypophyse contiennent des récepteurs de la mélatonine chez une majorité d'espèces. L'inhibition de la production d'AMPc par l'intermédiaire d'une protéine Gi/Go constitue l'une des principales voies de signalisation des récepteurs MT1 et MT2 mais de mul-

tiples autres voies de transduction sont également mises en jeu selon le type cellulaire étudié (PKC, Ca²⁺, canaux K⁺ ou encore GMPc pour MT2...). De nombreux facteurs ou stimuli physiologiques sont capables d'influencer le nombre et le statut fonctionnel des récepteurs MT1 et MT2 tels que la mélatonine, la photopériode, l'horloge circadienne ou encore les phénomènes de dimérisation récepteuriel. La mélatonine présente de nombreux effets physiologiques pour lesquels les mécanismes d'action et le rôle spécifique des récepteurs MT1 et MT2 ne sont pas encore clairement élucidés. Toutefois, des outils pharmacologiques sélectifs de chacun des deux sous-types réceptoriels sont en cours d'identification, notamment dans le groupe Servier, afin d'améliorer nos connaissances sur la fonctionnalité et le rôle physiologique des récepteurs MT1 et MT2 dans les structures centrales et périphériques.

SUMMARY Sites and mechanisms of action of melatonin in mammals: the MT1 and MT2 receptors

The rhythmic secretion of melatonin by the pineal gland plays a key role in the synchronisation of circadian and seasonal functions with cyclic environmental variations. The biological effects of this neurohormone are relayed mainly by G-protein-coupled seven-transmembrane receptors. These receptors, known as MT1 and MT2, are present in a large number of central and peripheral structures in mammals, with considerable inter-species variations. However, only the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus, the site of the master circadian biological clock, and the *pars tuberalis* of the adenohypophysis contain melatonin receptors in the majority of species. Inhibition of the production of AMPc by a Gi/Go protein is one of the principal signalling pathways of the MT1 and MT2 receptors, although many other signal transduction pathways are

also brought into play according to the cell type studied (PKC, Ca²⁺, K⁺ channels or GMPc in the case of MT2, etc.). Numerous factors or physiological stimuli are capable of influencing the number and functional status of the MT1 and MT2 receptors, such as melatonin, the photoperiod, the circadian clock or the phenomena of receptor dimerisation. Melatonin has numerous physiological effects for which the mechanisms of action and the specific role of the MT1 and MT2 receptors have not yet been clearly elucidated. However, selective pharmacological tools for each of the two receptor subtypes are currently being identified, notably in the Servier Group, for the purpose of furthering our knowledge of the functionality and physiological role of the MT1 and MT2 receptors in the central and peripheral structures.

INTRODUCTION

La plupart des variables biologiques, physiologiques et comportementales fluctuent chez les Êtres Vivants avec une périodicité proche de 24 heures. Ces rythmes circa-

diens sont contrôlés par les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus qui sont le siège de la principale horloge biologique circadienne des Mammifères, y compris chez l'Homme (Ralph *et al.*, 1990). Le cycle jour/nuit à l'échelle de 24 heures et la photopériode (durée de l'éclair-

rement quotidien) à l'échelle des saisons sont les principaux synchroniseurs de l'horloge biologique afin que les processus biologiques rythmiques se reproduisent de façon optimale à une période précise du jour ou de l'année. Les noyaux suprachiasmatiques contrôlent également la sécrétion rythmique de mélatonine par la glande pinéale par l'intermédiaire d'une voie polyneuronal complexe impliquant la noradrénaline libérée par les ganglions cervicaux supérieurs. Cette neurohormone est sécrétée uniquement pendant la nuit chez toutes les espèces animales, qu'elles soient nocturnes ou diurnes et la durée de son pic de sécrétion est proportionnelle à la durée de la nuit. Ce sont donc les variations de la durée de présence nocturne de mélatonine dans la circulation au cours des saisons qui transmettent l'information photopériodique à l'ensemble de l'organisme. La mélatonine joue donc le rôle d'hormone « donneuse de temps » en distribuant à la fois un message circadien (*via* sa sécrétion nocturne quotidienne) et un message saisonnier (*via* les variations de sa durée de sécrétion), ce qui permet à l'organisme de s'organiser temporellement. La mélatonine joue ainsi un rôle clé dans la synchronisation des fonctions circadiennes et saisonnières avec les variations cycliques de l'environnement en agissant sur des structures cibles par l'intermédiaire de mécanismes dépendants de récepteurs (Fig. 1) (pour revues : Cassone, 1990; Goldman & Darrow, 1983; Klein & Moore, 1979; Moore, 1983; Pévet, 1988; Tamarkin *et al.*, 1985).

Depuis les années 1980, les récepteurs de la mélatonine ont fait l'objet de nombreuses recherches et par souci de clarté, nous n'aborderons ici que les données relatives aux récepteurs membranaires de la mélatonine chez les Mammifères et en particulier, leur structure, pharmacologie, distribution, rôle physiologique et régulation.

CLONAGE ET STRUCTURE DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DE LA MÉLATONINE

Nomenclature des récepteurs mélatoninergiques clonés

Nos connaissances sur les sites et les mécanismes d'action de la mélatonine se sont beaucoup développées au cours des 20 dernières années bien que beaucoup d'interrogations subsistent encore. La mélatonine a été isolée en 1958 par le groupe de Lerner, mais ce n'est qu'à partir de 1987, avec la mise au point d'un agoniste iodé, la 2-¹²⁵I-mélatonine, que les premiers sites de liaison de haute affinité ont pu être détectés dans le cerveau de rat (Lerner *et al.*, 1958; Vanecek *et al.*, 1987). En 1994, deux sous-types de récepteurs de la mélatonine de haute affinité appelés MT1 et MT2 ont été clonés chez les Mammifères, y compris chez l'Homme. Deux isoformes α et β du récepteur MT1 ont également été isolés chez le Mouton. Il est à noter que les récepteurs MT2 ne sont pas fonctionnels chez les hamsters sibériens et dorés en raison de la présence de mutations non-sens (arrêt prématuré de la traduction protéique). Un 3^{ème} sous-type, appelé Mel1c, a été cloné chez les Vertébrés non mammaliens mais il n'est pas exprimé chez les Mam-

mifères. Les récepteurs de la mélatonine présentent une haute affinité pour la 2-¹²⁵I-mélatonine caractérisée par un Kd de valeur picomolaire (Barrett *et al.*, 1997; Gauer *et al.*, 1998; Reppert *et al.*, 1994, 1995a, b; Roca *et al.*, 1996; Weaver *et al.*, 1996).

Un site de liaison non membranaire et d'affinité nanomolaire, appelé MT3/QR2, a également été purifié en 2000. Ce site est apparenté à une enzyme de la famille des quinones réductases qui est impliquée dans les processus de stress oxydatif (Nosjean *et al.*, 2000; Mailliet *et al.*, 2004). Les caractéristiques pharmacologiques et fonctionnelles du site MT3/QR2 sont décrites dans l'article de Jean Boutin publié dans ce même ouvrage.

Structure des récepteurs MT1/MT2 et sites d'interaction ligand-récepteur

Les récepteurs MT1 et MT2 sont des récepteurs de 350 à 365 acides aminés couplés à des protéines G. Leur structure est donc classiquement constituée de sept domaines transmembranaires reliés entre eux par des boucles intracellulaires et extracellulaires. Les récepteurs de la mélatonine partagent une homologie de séquence en acides aminés de 60 % et sont considérés comme des sous-types uniques en raison de leur structure moléculaire et leur localisation chromosomique distincte (chez l'Homme, les gènes MT1 et MT2 sont présents respectivement sur les chromosomes 4 et 11). Ils forment un groupe distinct dans la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G en raison de la présence de séquences d'acides aminés spécifiques comme le motif NRY situé dans la deuxième boucle intracellulaire. Des sites de glycosylations sont également présents au niveau de l'extrémité N terminale ainsi que des sites potentiels de phosphorylation à la protéine kinase A, C et à la caséine kinase 1 et 2 au niveau de la queue C terminale. Ces sites de phosphorylations pourraient participer à la régulation de la fonction du récepteur (Fig. 2) (Kokkola & Laitinen, 1998; Reppert *et al.*, 1994, 1995a, b; Slaugenhaupt *et al.*, 1995).

Des modèles des récepteurs MT1 et MT2 ont été construits à partir d'études de relations structure-activité avec divers ligands et sur la base de la structure de la rhodopsine, seul récepteur couplé aux protéines G cristallisé à ce jour. Des études de mutagenèse dirigée ont ensuite été réalisées afin, d'une part, de corroborer ou réfuter ces modèles d'interaction ligand-récepteur et, d'autre part, d'identifier les résidus aminoacides essentiels aux poches de liaison ou à la fonctionnalité du récepteur. Par exemple, le résidu asparagine de la séquence NRY hautement conservée au sein de la famille des récepteurs de la mélatonine joue un rôle clé dans le couplage fonctionnel des récepteurs avec les protéines G. Les résidus valine et histidine localisés dans le domaine transmembranaire 5 sont impliqués dans la formation de la poche de liaison du ligand et l'interaction du groupement 5-méthoxy de la mélatonine avec le résidu histidine est nécessaire à l'activation des récepteurs MT1 et MT2 (Fig. 2). D'autres résidus situés dans les domaines transmembranaires 3, 5, 6 et 7 sont également impliqués dans l'affinité et la liaison avec des agonistes (Conway *et al.*, 1997, 2001; Kokkola

et al., 2003 ; Mazna *et al.*, 2005). Ces études de relations structure-activité sont essentielles à l'identification de ligands sélectifs pour chacun des sous-types de récepteurs de la mélatonine (Guardiola-Lemaître, 2005 ; Lesieur *et al.*, 1998).

Caractéristiques pharmacologiques des récepteurs MT1 et MT2

Les caractéristiques fonctionnelles des récepteurs MT1 et MT2 ont été essentiellement obtenues à partir de récepteurs recombinants exprimés dans différentes cellules transfectées (CHO, HEK293). Les récepteurs MT1 et MT2 présentent une haute affinité pour la 2-¹²⁵I-mélatonine avec des valeurs comprises entre 20 et 200 pM selon les tissus étudiés. Les sites MT2 présentent une affinité un peu plus faible pour la 2-¹²⁵I-mélatonine mais les profils pharmacologiques des deux sous-types de récepteurs sont très similaires pour la plupart des ligands standards testés. De nombreux ligands à la fois MT1 et MT2 ont été développés par le groupe Servier, et en particulier le Valdoxan® (agomélatine), un agoniste mélatoninergique MT1 et MT2 et antagoniste sérotonergique 5-HT_{2C}, en cours d'enregistrement à l'Agence Européenne du Médicament dans le traitement de la dépression (Kennedy & Emsley, 2006 ; Loo *et al.*, 2002 et *cf.* article de B. Guardiola-Lemaître publié dans ce même ouvrage). Le Rozerem® (rameltéon), un agoniste MT1/MT2 du groupe Takeda, a également obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des troubles du sommeil (Wurtman, 2006). Depuis les années 1990, un certain nombre d'agonistes et d'antagonistes dits « MT1 ou MT2 sélectifs » ont été développés par le groupe Servier et d'autres groupes industriels ou universitaires avec des ratios de sélectivité plus ou moins élevés (Audinot *et al.*, 2003 ; Dubocovich *et al.*, 1997 ; Fourmaintraux *et al.*, 1998 ; Guardiola-Lemaître, 2005 ; Leclerc *et al.*, 1998 ; Zlotos, 2005). Néanmoins, les avancées dans la recherche sur les récepteurs de la mélatonine et la compréhension des fonctions physiologiques associées à chacun des deux sous-types de récepteurs sont actuellement freinées par le manque de ligands « hautement » sélectifs, c'est-à-dire actifs principalement sur l'un des deux sites. La recherche dans ce domaine reste néanmoins très active dans le groupe Servier.

DISTRIBUTION DES RÉCEPTEURS MT1 ET MT2

Compte tenu des outils disponibles à ce jour, la localisation des récepteurs de la mélatonine peut être étudiée grâce à a) la technique de liaison avec la 2-¹²⁵I-mélatonine (sur membranes ou coupes de tissus congelées) qui permet la localisation de la protéine membranaire mais sans distinction entre les sites MT1 et MT2 (Vanecek *et al.*, 1987) et b) des techniques d'hybridation *in situ* radioactive ou non radioactive qui permettent d'étudier respectivement la distribution tissulaire ou cellulaire de l'ARN messager (Klosen *et al.*, 2002 ; Gauer *et al.*, 1998). En revanche, la technique d'immunocytochimie, qui permettrait de distinguer la localisation des protéines MT1

des protéines MT2, n'est pas disponible en raison de l'absence, à ce jour, d'anticorps suffisamment spécifiques, fiables et reproductibles.

Système nerveux central des Mammifères

Depuis 1987, la technique de liaison avec la 2-¹²⁵I-mélatonine a permis de révéler une distribution très large de ces récepteurs au niveau central. En effet, plus de 110 structures cérébrales recensées à ce jour contiennent des récepteurs de la mélatonine. Ils sont par exemple présents dans le thalamus (noyaux paraventriculaires, reuniens, dorsolatéral, etc.), l'hypothalamus (noyaux suprachiasmatiques, paraventriculaires, hypothalamus médiobasal, etc.), le cortex, l'amygdale, l'hippocampe, le cervelet, l'*area postrema*, les noyaux du lit de la strie terminale (BNST), les bulbes olfactifs, la *pars tuberalis*, une expansion antéroventrale de l'adénohypophyse, et dans de nombreuses autres structures. Toutefois, la nature et le nombre de structures concernées varient considérablement d'une espèce à l'autre, ce qui pourrait expliquer la diversité des réponses physiologiques induites par la mélatonine. Néanmoins, les deux seules structures qui contiennent des récepteurs de la mélatonine chez une majorité d'espèces de Mammifères sont les noyaux suprachiasmatiques (sauf chez les Mustélidés et le Mouton) et la *pars tuberalis* (pour revues : Ekmekcioglu, 2006 ; Masson-Pévet *et al.*, 1994 ; Morgan *et al.*, 1994 ; Poirel *et al.*, 2003 ; Stankov & Fraschini, 1993).

Tissus périphériques des Mammifères

Les récepteurs de la mélatonine présentent également une large distribution au niveau périphérique. Ils ont été décrits par exemple dans la rétine (MT1 et MT2) de nombreuses espèces y compris chez l'Homme, le système reproducteur (testicules, ovaires, prostate, glandes mammaires, etc.), cardiovasculaire (cœur, artères coronaires et périphériques), immunitaire et digestif (intestin, côlon, foie), mais aussi dans la graisse brune, les reins, les poumons, les glandes surrénales, les plaquettes sanguines, etc (Dubocovich & Markowska, 2005 ; Ekmekcioglu, 2006 ; Le Gouic *et al.*, 1997 ; Poirel *et al.*, 2003).

Toutefois, le manque d'outils techniques, en particulier d'anticorps et de ligands plus sélectifs, limite considérablement l'identification des structures et du phénotype cellulaire exprimant spécifiquement les récepteurs MT1 et MT2. Ces données sont fondamentales à la compréhension du rôle physiologique de chacun des sous-types de récepteurs de la mélatonine dans les structures centrales et périphériques.

RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES RÉCEPTEURS MT1 ET MT2

La mélatonine est impliquée dans la régulation et la synchronisation de multiples fonctions circadiennes et saisonnières ; les rythmes circadiens étant contrôlés par

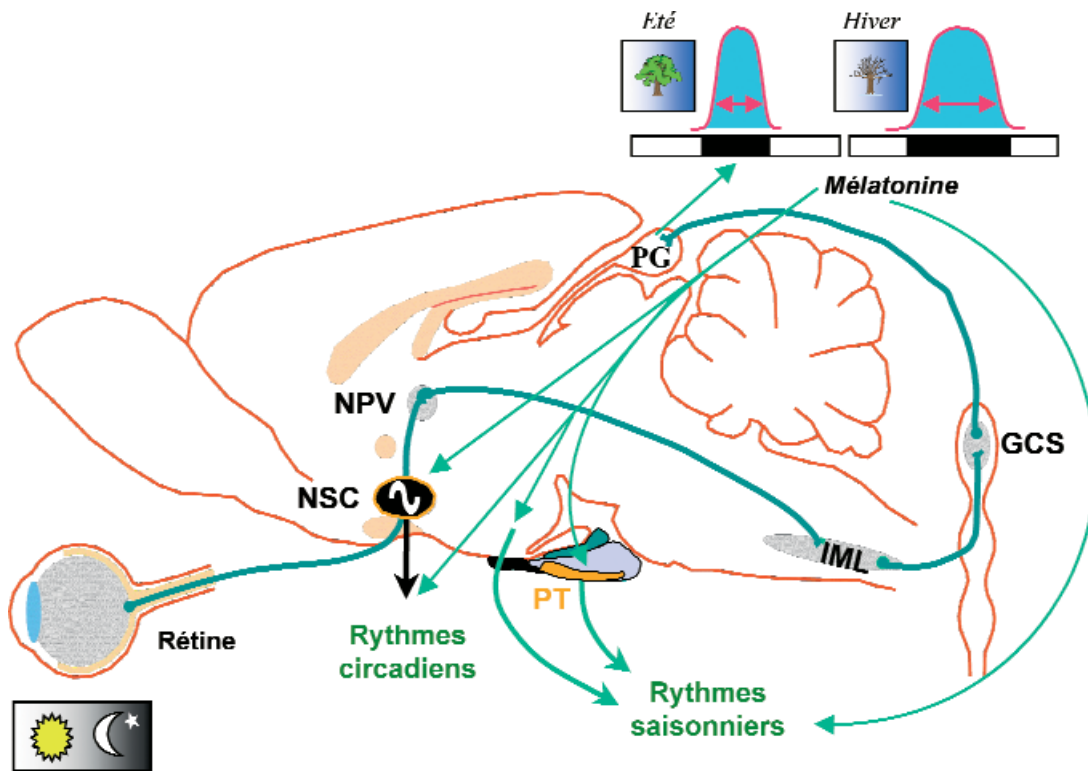
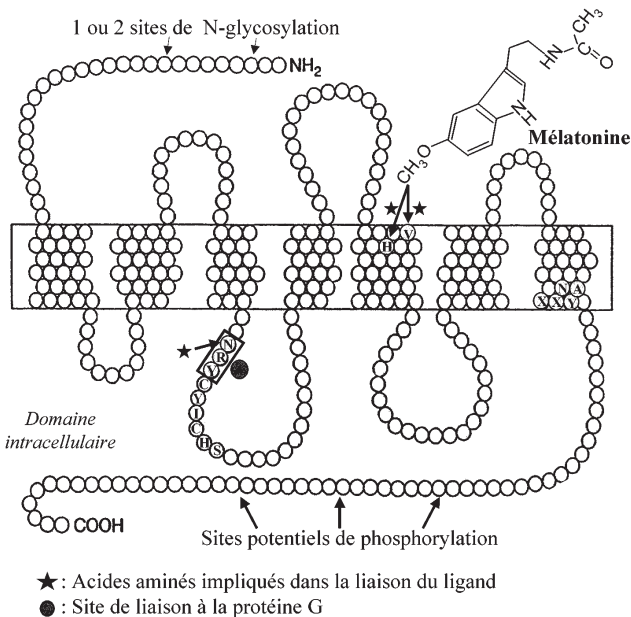


FIG. 1. – Représentation schématique de la voie polyneurone contrôlant la sécrétion rythmique de mélatonine.

Chez les Mammifères, la synthèse rythmique de mélatonine par la glande pinéale (PG) est générée par l’horloge biologique circadienne des noyaux suprachiasmatiques (NSC) par l’intermédiaire de différents relais hypothalamiques et médullaires. L’activité de l’horloge est synchronisée à une période de 24 heures par le cycle jour/nuit. Le contrôle de la synthèse de mélatonine par les NSC se traduit par une inhibition de jour et une activation de nuit de l’activité noradrénergique des fibres issues des ganglions cervicaux supérieurs (GCS) qui contrôlent l’activité de l’enzyme limitante de la synthèse de mélatonine. La mélatonine est donc sécrétée uniquement pendant la nuit et la durée de son pic de sécrétion est proportionnelle à la durée de la nuit. Les messages circadiens et saisonniers véhiculés par la mélatonine sont ensuite distribués à l’ensemble de l’organisme afin de permettre la synchronisation des fonctions physiologiques et comportementales et donc le maintien d’une homéostasie temporelle.

IML : colonne intermédiaire latérale de la moëlle épinière ; NPV : noyaux paraventriculaires de l’hypothalamus ; PT : *pars tuberalis* de l’adénohypophyse.



les noyaux suprachiasmatiques. Elle participe donc au maintien d’une organisation temporelle optimale de l’organisme. Parmi ces fonctions physiologiques, on peut citer par exemple la reproduction, la lactation, l’hibernation, le métabolisme glucidique et énergétique, la mue du pelage, mais aussi le cycle veille/sommeil, les sécrétions hormonales (glucocorticoïdes, hormones hypophysaires), les systèmes immunitaire (production de cytokines et

FIG. 2. – Structure des récepteurs de la mélatonine de type MT1 et MT2.

Les récepteurs MT1 et MT2 sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Ils forment un groupe distinct dans la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G en raison de la présence de motifs spécifiques aux récepteurs de la mélatonine (séquences NRY, NAXXY et CY/CICHS). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d’identifier au moins trois résidus amino-acides (représentés par les étoiles) impliqués dans la liaison de la mélatonine ainsi que le site de liaison des protéines G (représenté par le cercle gris). A : alanine ; C : cystéine ; H : histidine ; I : isoleucine ; N : asparagine ; R : arginine ; S : sérine ; V : valine ; Y : tyrosine.

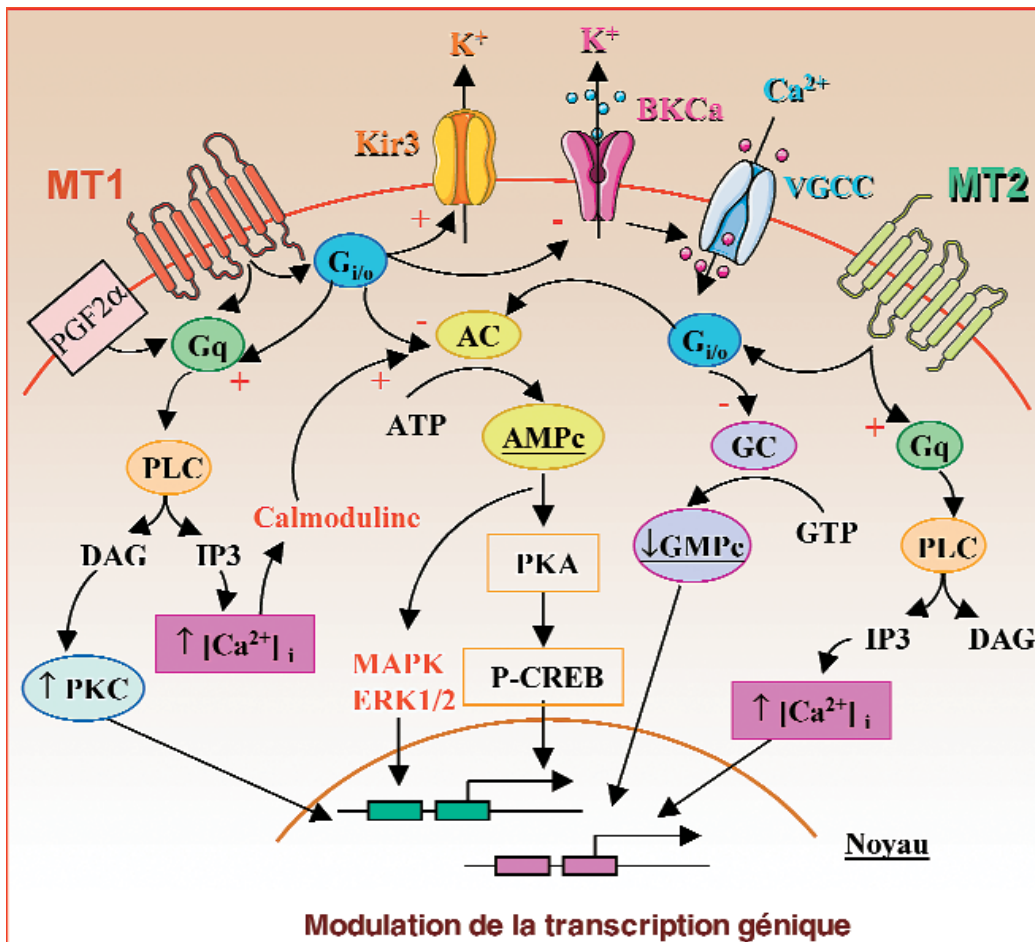


FIG. 3. – Voies de signalisation couplées aux récepteurs de la mélatonine de type MT1 et MT2.

Les récepteurs de la mélatonine sont couplés à de multiples voies de transduction qui diffèrent selon le type cellulaire dans lequel le récepteur est exprimé. L'inhibition de la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) par l'intermédiaire d'une protéine G inhibitrice de type Gi/Go couplée à l'adénylate cyclase (AC) constitue l'une des principales voies de signalisation des récepteurs MT1 et MT2. Les récepteurs de la mélatonine peuvent également conduire à une stimulation de la protéine kinase C (PKC) et/ou à une augmentation du calcium intracellulaire (Ca^{2+}) par l'intermédiaire de la phospholipase C (PLC). Parallèlement à ces voies de transduction communes, les récepteurs MT1 et MT2 présentent des différences de couplage (Ca^{2+} /calmoduline, canaux K^+ pour MT1 ou encore GMPC pour MT2).

(+) : activation; (-) : inhibition. ATP : adénosine triphosphate; BKCa : canaux potassiques sensibles au calcium; DAG : diacylglycérol; ERK1/2 : facteurs de transcription se liant au site SRE (élément de réponse au sérum); GC : guanylate cyclase; GMPC : guanosine monophosphate cyclique; GTP : guanosine triphosphate; IP3 : inositol triphosphate; Kir3 : canal potassique responsable du courant K^+ de rectification (hyperpolarisation); MAPK : protéine kinase activée par les facteurs mitogènes; P-CREB : forme phosphorylée de la protéine se liant au site CRE (élément de réponse de l'AMPc); PKA : protéine kinase dépendante de l'AMPc; VGCC : canaux calciques voltage-dépendant.

d'anticorps), cardiovasculaire (pression artérielle, fonction cardiaque), gastrointestinale (motilité intestinale) et osseuse (résorption et formation osseuse), la fonction rétinienne et la prolifération cellulaire (Cassone, 1990; Dubocovich *et al.*, 2003; Ekmekcioglu, 2006; Pévet, 1988).

La question fondamentale qui se pose est de savoir quelles sont les activités biologiques qui peuvent être attribuées aux récepteurs MT1 ou aux récepteurs MT2 ?

L'horloge biologique circadienne

L'activité électrique de tranches de cerveaux contenant les noyaux supra-chiasmatiques présente un rythme carac-

térisé par des valeurs élevées de jour et faibles de nuit. L'application de mélatonine pendant le jour entraîne une inhibition de l'activité électrique spontanée des neurones de l'horloge et un déphasage immédiat du pic d'activité qui débute plus tôt le jour suivant (Liu *et al.*, 1997). Chez les souris présentant une invalidation du gène MT1, l'effet inhibiteur de la mélatonine sur le rythme de décharges neuronales est aboli, alors que le déphasage n'est pas affecté. En revanche, chez les hamsters sibériens et dorés, où le récepteur MT2 est naturellement invalidé, la mélatonine est capable non seulement d'inhiber mais également de déphaser l'activité de l'horloge (Dubocovich *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 1996).

In vivo, l'administration de mélatonine exogène en fin de jour par injection ou perfusion induit chez les rongeurs des décalages de phase du rythme d'activité locomotrice de roue qui débute chaque jour un peu plus tôt (avance de phase). Ce résultat démontre que la mélatonine exogène est capable de modifier le fonctionnement de l'horloge (activité chronobiotique) (Armstrong *et al.*, 1993; Pitrosky *et al.*, 1999; Redman *et al.*, 1983). Toutefois, l'inactivation du gène MT1 conduit à la perte des effets déphasants de la mélatonine (Dubocovich *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces résultats permet donc de conclure que l'activation des récepteurs MT1 dans les noyaux suprachiasmatiques conduit à une inhibition de l'activité électrique neuronale spontanée de l'horloge et à un déphasage du rythme d'activité locomotrice. Les récepteurs MT2 pourraient participer aux décalages de phase de l'activité des noyaux suprachiasmatiques mais leur rôle exact reste encore à élucider.

Axe hypothalamo-hypophysaire et gonadique

L'implication de la mélatonine dans la synchronisation des fonctions saisonnières avec les variations annuelles de la photopériode a été formellement établie chez de nombreuses espèces photopériodiques par l'administration de mélatonine exogène sous différentes formes (injection, implant, perfusion chronique). Les fonctions de reproduction et de lactation sont de loin les fonctions saisonnières les plus étudiées pour appréhender le mécanisme d'action de la mélatonine qui diffère selon l'espèce considérée (effet activateur ou inhibiteur). Par exemple, chez les hamsters, le passage des jours longs de l'été aux jours courts de l'hiver, qui entraîne un allongement de la durée de sécrétion de mélatonine, provoque une régression testiculaire, un arrêt du cycle oestrien et une diminution de la sécrétion des hormones hypophysaires (FSH, LH, prolactine) et gonadiques (testostérone, estrogènes). Ces effets impliquent l'activation des récepteurs de la mélatonine au niveau hypothalamique (modulation des neurones à GnRH), de la *pars tuberalis* et des gonades, sachant que l'adénohypophyse n'exprime pas ces récepteurs. Les mécanismes mis en jeu par la mélatonine dans la régulation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire et gonadique sont complexes et semblent impliquer principalement les récepteurs MT1 (Goldman & Darrow, 1983; Lincoln & Richardson, 1998; Malpoux *et al.*, 1998; Pévet, 1988; Tamarkin *et al.*, 1985). Toutefois, la participation des récepteurs MT2 ne peut pas être totalement exclue.

L'étude de la régulation saisonnière de la production de prolactine (PRL) a permis d'appréhender le rôle des récepteurs de la mélatonine de la *pars tuberalis*. Cette structure, qui borde l'ensemble de la tige hypophysaire, est constituée d'un mélange de cellules présentant un phénotype similaire à celui des cellules hypophysaires. Elle contient également des cellules endocrines spécifiques qui sécrètent un facteur encore non identifié appelé «tubéraline» responsable de la libération de PRL par les cellules lactotropes de l'adénohypophyse (Hazlerigg *et al.*, 1996). La production de PRL est plus faible en

photopériode courte c'est à dire pendant les jours courts de l'hiver. La *pars tuberalis* constitue un site d'action majeur de la mélatonine car elle contient des récepteurs de la mélatonine chez toutes les espèces de Mammifères et la densité en récepteurs y est très élevée (Lincoln & Richardson, 1998; Masson-Pévet *et al.*, 1994). Chez le Rat et le Hamster d'Europe, l'hybridation *in situ* non radioactive dirigée contre l'ARN messager MT1 combinée à de l'immunocytochimie dirigée contre les principales hormones hypophysaires a permis de localiser les récepteurs MT1 dans les cellules spécifiques de la *pars tuberalis* de type thyrotrope. Ces cellules, qui expriment la β -TSH, ne présentent pas les mêmes caractéristiques fonctionnelles que les cellules thyrotropes classiques de l'adénohypophyse. Chez le Hamster d'Europe, l'allongement du pic de mélatonine lors du passage aux jours courts de l'hiver (photopériode courte) conduit également à une diminution de l'expression des récepteurs MT1 et de la β -TSH, suggérant une réduction générale de l'activité transcriptionnelle et sécrétoire de la *pars tuberalis* (Dardente *et al.*, 2003a; Klosien *et al.*, 2002).

Par conséquent, il est suggéré que l'activation par la mélatonine des récepteurs MT1 localisés dans les cellules thyrotropes spécifiques de la *pars tuberalis* inhibe la sécrétion de tubéraline. Cette inhibition serait plus importante en photopériode courte, du fait de l'allongement de la durée de sécrétion de mélatonine, ce qui provoque une chute de la libération de PRL par les cellules lactotropes de l'hypophyse. Il en résulte un cycle annuel de production de PRL caractérisé par des concentrations faibles en photopériode courte et élevées en photopériode longue, et ceci chez toutes les espèces saisonnières (Lincoln & Richardson, 1998).

Les bases moléculaires de l'action de la mélatonine dans la *pars tuberalis* impliquent des gènes dits «gènes horloges», notamment *Per1* et *Cry1*, qui sont responsables du décodage de la photopériode. L'expression de *Cry1* augmente pendant la nuit et celle de *Per1* est élevée en début de jour, ce qui correspond aux périodes où la synthèse de mélatonine endogène est respectivement activée ou stoppée. En effet, l'administration de mélatonine en fin de jour induit une augmentation immédiate mais transitoire de *Cry1* et une diminution de l'expression de *Per1* le lendemain. Comme les changements de la durée du jour induisent des modifications dans le délai entre le début et la fin du pic de mélatonine, ils induisent également des modifications dans le délai entre les pics d'expression de *Per1* et *Cry1*. Par conséquent, en hiver, lorsque les jours sont courts et les nuits longues, le complexe PER/CRY peut se former du fait de la proximité des deux pics et l'expression des gènes de sortie est inhibée. A l'inverse, en été, lorsque les jours sont longs et les nuits courtes, le complexe PER/CRY n'a pas le temps de se former avant la dégradation de chaque protéine et la sortie fonctionnelle est activée. Il est donc proposé actuellement que les gènes horloges de la *pars tuberalis* permettent le décodage de l'information photopériodique véhiculée par la mélatonine et donc la transduction des effets biologiques de la mélatonine (e.g. inhibition de la sécrétion de tubéraline), par l'intermédiaire de la forma-

tion ou non du complexe PER/CRY (Dardente *et al.*, 2003b; Lincoln *et al.*, 2002; Messager *et al.*, 2000).

Système cardiovasculaire et thermorégulation

Les récepteurs MT1 et MT2 sont présents dans les artères coronaires, cérébrales et périphériques de nombreuses espèces de Mammifères. Des études chez le Rat suggèrent que la mélatonine peut présenter une double activité à l'instar du système sympathique, selon le type récepteur exprimé avec un effet vasoconstricteur après activation des récepteurs MT1 (artères cérébrales et caudales du rat) ou un effet vasodilatateur après activation des récepteurs MT2 (artère caudale du rat). Des récepteurs MT1 et MT2 ont également été détectés dans le ventricule cardiaque gauche chez l'Homme. Les effets vasculaires de la mélatonine joueraient un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et la thermorégulation (Ekmekcioglu, 2006; Ting *et al.*, 1997; Scheer *et al.*, 2004).

Système immunitaire

La mélatonine présente un effet immunostimulateur général en agissant à la fois sur les réponses immunitaires de type cellulaire et humorale. Les récepteurs MT2 semblent être impliqués dans l'augmentation de la prolifération des splénocytes (immunité cellulaire) et de la production d'immunoglobulines de type IgG (immunité humorale). La mélatonine stimule également l'activité des macrophages et des lymphocytes T (de type helper, natural killer et cytotoxique) et régule la production de nombreuses cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, INF γ , TNF α et TGF β). La présence à la fois de récepteurs MT1 et MT2 et d'un site d'action nucléaire a été décrite dans les cellules immunitaires mais il est encore difficile d'associer un effet immunologique spécifique à chacun de ces sous-types récepteurs (Liebmann *et al.*, 1997; Pévet, 1998; Ekmekcioglu, 2006).

Physiologie rétinienne

Les récepteurs de la mélatonine sont exprimés dans différents types cellulaires de la rétine incluant les cellules amacrines, horizontales et ganglionnaires ainsi que les segments internes des bâtonnets chez de nombreuses espèces, y compris chez l'Homme. L'activation des récepteurs MT2 conduit à l'inhibition de la libération de dopamine par les cellules amacrines de la rétine de lapin. Il a été proposé que l'inhibition mutuelle entre la mélatonine et la dopamine (neuromédiateur de la vision diurne) jouerait un rôle dans les mécanismes d'adaptation de la rétine aux lumières de faible intensité. Le rôle des récepteurs MT1 dans la fonction rétinienne reste encore à ce jour inconnu (Dubocovich *et al.*, 1983; Vanecek, 1998).

Cancer

L'activité antiproliférative et oncostatique de la mélatonine a été décrite dans de nombreux modèles cellu-

lares et de tumeurs spontanées, greffées ou induites par des carcinogènes. L'effet inhibiteur de la mélatonine sur la croissance tumorale s'exerce à plusieurs niveaux cellulaires et semble impliquer principalement les récepteurs MT1 (inhibition de l'expression des récepteurs aux estrogènes ER α et du métabolisme des acides gras, ralentissement du cycle cellulaire, effet pro-apoptotique, etc.). Cependant, la participation des récepteurs MT2 dans l'activité antiproliférative de la mélatonine ne peut pas être totalement exclue, sachant que la mélatonine inhibe la croissance des cellules de choriocarcinome connues pour n'exprimer que le sous-type MT2 (Blask *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2001; Shiu *et al.*, 1999).

La mélatonine présente de nombreux autres effets physiologiques pour lesquels les mécanismes d'action et le rôle spécifique des récepteurs MT1 et MT2 ne sont pas encore identifiés. Ces effets biologiques ont fait l'objet de nombreuses publications de synthèse (Dubocovich *et al.*, 2003; Dubocovich & Markowska, 2005; Ekmekcioglu, 2006; Witt-Enderby *et al.*, 2003).

VOIES DE SIGNALISATION COUPLÉES AUX RÉCEPTEURS DE LA MÉLATONINE

Les récepteurs de la mélatonine sont couplés à une grande variété de voies de signalisation intracellulaire qui diffèrent selon le type cellulaire étudié. En effet, les récepteurs de la mélatonine peuvent, d'une part, être couplés à une grande diversité de protéines G (Gi, Gs, Gq, Gz, G α 16...) et, d'autre part, mettent en jeu de nombreux effecteurs. Par exemple, les récepteurs MT1 et MT2 inhibent la production d'AMPc par l'intermédiaire d'une protéine Gi/o couplée à l'adénylate cyclase. Cet effet inhibiteur conduit à une diminution de l'activité de la protéine kinase A, de CREB ou des MAP Kinases, ce qui provoque un arrêt de la transcription des gènes cibles. Les récepteurs de la mélatonine peuvent également être couplés à la phospholipase C par l'intermédiaire d'une protéine Gq conduisant à une stimulation de la protéine kinase C et/ou à une augmentation du calcium intracellulaire (Barrett *et al.*, 1999; McArthur *et al.*, 1997; Ruppert *et al.*, 1994, 1995a, b; Vanecek, 1998).

Parallèlement à ces voies de transduction communes, il existe des différences de couplage entre les récepteurs MT1 et MT2. En effet, l'activation des récepteurs MT2 conduit à une inhibition de la voie du GMPc, en plus de l'inhibition de la voie de l'AMPc (Petit *et al.*, 1999). Dans les noyaux suprachiasmatiques, la stimulation d'un courant potassique hyperpolarisant *via* les canaux Kir3 par le récepteur MT1 conduit à l'inhibition de l'activité électrique spontanée de l'horloge (Jiang *et al.*, 1995). De même, il peut exister un couplage fonctionnel entre les récepteurs MT1 et les canaux potassiques sensibles au calcium (BKCa) conduisant à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant (Dubocovich *et al.*, 2003). Des études de transfection dans des cellules neuronales ont montré que les récepteurs MT1 sont capables, non pas d'inhiber mais d'activer la voie de l'AMPc *via* un

mécanisme impliquant probablement la protéine Gq et le complexe Ca^{2+} /calmoduline (Schuster *et al.*, 2005).

Les récepteurs de la mélatonine mettent donc en jeu de multiples voies de transduction, ce qui souligne l'importance du contexte cellulaire dans lequel le récepteur est exprimé car il peut déterminer non seulement la fonctionnalité d'un récepteur mais également son rôle physiologique (Fig. 3).

RÉGULATION DES RÉCEPTEURS DE LA MÉLATONINE

Les facteurs physiologiques régulant l'activité des récepteurs MT1 et MT2 peuvent également contribuer à la diversité des réponses physiologiques induites par la mélatonine. Différents types de régulation des récepteurs de la mélatonine ont été décrits notamment dans les noyaux suprachiasmatiques et la *pars tuberalis*.

Régulation homologue des récepteurs MT1 et MT2

L'un des mécanismes les plus classiques de régulation des récepteurs membranaires, hormis la modulation du nombre de récepteurs par synthèse ou dégradation, est la désensibilisation induite par la stimulation prolongée du ligand à son récepteur. Toute possibilité de réponse biologique est ainsi bloquée, alors que le ligand est toujours présent. On parle alors de régulation ou de désensibilisation homologue.

Par exemple, dans la *pars tuberalis* du rat, la suppression de la mélatonine endogène, soit de façon temporaire par illumination constante des animaux, soit de façon irréversible par pinéalectomie, entraîne une augmentation de la densité des récepteurs de la mélatonine. Cette augmentation peut être contrebalancée par une injection unique de mélatonine exogène (Gauer *et al.*, 1993). De la même façon, dans la même structure mais chez deux espèces de hamsters différentes, une injection unique de mélatonine, administrée lorsque les concentrations de mélatonine endogène sont les plus faibles, induit une diminution importante du nombre de récepteurs à la surface cellulaire (Schuster *et al.*, 2001). Ces résultats démontrent clairement que la mélatonine régule directement la densité de ses propres récepteurs par un mécanisme de désensibilisation homologue de la protéine-réceptrice.

Néanmoins, dans les conditions physiologiques, les concentrations de mélatonine plasmatique fluctuent au cours de la journée et des saisons. La mélatonine est donc capable d'influencer le statut fonctionnel de ses récepteurs non seulement par elle-même, mais également *via* les variations journalières et saisonnières de son pic de sécrétion nocturne. L'une des conséquences est que la densité des récepteurs de la mélatonine varie également au cours de la journée, où elle est inversement proportionnelle aux concentrations de mélatonine circulante. Les récepteurs sont actifs de jour et inactifs de nuit, où ils sont désensibilisés alors que le ligand est toujours

présent. La suppression expérimentale de la mélatonine endogène conduit à l'abolition de ce rythme en raison de l'absence de désensibilisation nocturne. Par conséquent, dans certaines structures comme la *pars tuberalis* du Rat et du Hamster doré, la mélatonine endogène est directement responsable des variations journalières de la densité de ses récepteurs. Néanmoins, dans d'autres structures, ce rythme dépend à la fois de la mélatonine et d'autres facteurs tels que le cycle jour/nuit ou l'horloge circadienne (Gauer *et al.*, 1994a; Masson-Pévet *et al.*, 2000; Recio *et al.*, 1998; Schuster *et al.*, 2000, 2001 et *cf.* paragraphe ci-dessous). La désensibilisation homologue des récepteurs de la mélatonine semblerait faire intervenir les microtubules et des protéines de régulation spécifiques aux protéines G, appelées RGS₄, mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore clairement élucidés (Witt-Enderby *et al.*, 2004).

Régulation hétérologue des récepteurs MT1 et MT2

De nombreux facteurs physiologiques, autres que la mélatonine, peuvent également influencer le nombre et le statut fonctionnel des récepteurs de la mélatonine. On parle alors de régulation hétérologue.

Influence de la lumière ou du cycle jour/nuit

L'application de créneaux lumineux pendant la nuit chez des animaux pinéalectomisés (donc sans mélatonine circulante), entraîne une augmentation significative de la densité des récepteurs de la mélatonine dans les noyaux suprachiasmatiques du Rat et la *pars tuberalis* du Hamster sibérien. Chez le Rat, cette régulation par la lumière et plus particulièrement l'alternance lumière/obscurité joue un rôle clé dans l'apparition des variations journalières de la densité des récepteurs de la mélatonine localisés dans les noyaux suprachiasmatiques (Gauer *et al.*, 1994a, 1997; Schuster *et al.*, 2000, 2001).

Influence de la photopériode

Dans la *pars tuberalis* des espèces photopériodiques telles que les hamsters, on observe une diminution de la densité des récepteurs de la mélatonine en photopériode courte qui mime les jours courts de l'hiver. Cette diminution saisonnière résulterait en fait d'une diminution de la synthèse des récepteurs MT1 induite par l'allongement de la durée de sécrétion nocturne de mélatonine (Gauer *et al.*, 1994b; Recio *et al.*, 1998; Schuster *et al.*, 2001).

Influence des hormones sexuelles

Chez le Rat et le Hamster doré, des implants de testostérone induisent une diminution de la densité des récepteurs de la mélatonine et réduisent donc leur fonctionnalité. Ce phénomène de désensibilisation est également observé en présence d'estrogènes dans les ovaires du Rat (Clemens *et al.*, 2001; Recio *et al.*, 1996).

Dimérisation des récepteurs MT1 et MT2

Comme un certain nombre de récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs de la mélatonine présentent la

capacité de former *in vitro* des dimères. Toutefois, la probabilité de former des homodimères MT1 ou des hétérodimères MT1/MT2 est supérieure à celle mesurée pour les homodimères MT2. La formation de ces dimères intervient précocement après la synthèse protéique et les complexes formés sont stables tout au long du cycle de vie des récepteurs (Ayoub *et al.*, 2002, 2004). Néanmoins, deux questions majeures restent encore à élucider, à savoir : a) la dimérisation des récepteurs MT1 et MT2 existe-t-elle *in vivo* ? et b) quelles sont les conséquences fonctionnelles et les implications physiologiques de cette dimérisation ?

Les récepteurs MT1 et MT2 sont également capables de former des hétérodimères avec un récepteur orphelin, le GPR50. Le rôle physiologique de GPR50 reste encore inconnu mais des mutations de ce récepteur seraient associées avec certaines pathologies métaboliques ou psychiatriques comme la dépression. Ce récepteur est incapable de lier la mélatonine et n'affecte pas la fonction des récepteurs MT2 ou des hétérodimères MT1/MT2. En revanche, l'association de GPR50 avec MT1 entraîne une diminution des capacités de liaison de ce récepteur avec la mélatonine et une réduction du couplage fonctionnel avec des seconds messagers sans affecter le nombre de récepteurs exprimés à la surface cellulaire. L'hypothèse est que l'effet inhibiteur de GPR50 serait lié à sa longue chaîne C-terminale qui empêcherait l'interaction du récepteur MT1 avec les protéines G, bloquant ainsi toute possibilité de déclencher une réponse biologique (Levoye *et al.*, 2006).

Pour résumer, il a été montré que la mélatonine régule directement la densité de ses propres récepteurs par un mécanisme de désensibilisation homologue. Des facteurs physiologiques, autres que la mélatonine, influencent également la fonction des récepteurs MT1 et MT2 (régulation hétérologue). Outre la régulation de la protéine-réceptrice, il existe un second niveau de régulation car un certain nombre des facteurs décrits ci-dessus, y compris la mélatonine, sont capables d'agir au niveau de l'expression de l'ARN messager et donc de la synthèse des récepteurs pour une régulation à plus long terme (Guerero *et al.*, 2000 ; Schuster *et al.*, 2000, 2001). Ceci ajoute un degré de complexité supplémentaire à la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation du statut fonctionnel des récepteurs de la mélatonine.

CONCLUSION

Chez les Mammifères, les récepteurs MT1 et MT2 sont impliqués dans la transmission des messages circadiens et saisonniers véhiculés par la mélatonine afin de maintenir une « homéostasie » temporelle de l'organisme en réponse aux changements périodiques de l'environnement. Ce sont des récepteurs membranaires couplés à des protéines G qui sont distribués largement au niveau central et périphérique avec de grandes variations inter-espèces. La mélatonine présente de nombreux effets physiologiques pour lesquels les mécanismes d'action et le

rôle spécifique des récepteurs MT1 et MT2 ne sont pas encore clairement identifiés. Néanmoins, le groupe Serivier reste particulièrement impliqué dans la recherche de ligands MT1 ou MT2 sélectifs afin de pouvoir élucider la fonction exacte des récepteurs de la mélatonine dans chacune des structures étudiées. Les récepteurs MT1 et MT2 constituent à ce jour des cibles thérapeutiques d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique dans le traitement des pathologies liées à une désorganisation des rythmes circadiens et saisonniers telles que les troubles du sommeil, la dépression, le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et métaboliques (*cf.* article de B. Guardiola-Lemaitre publié dans ce même ouvrage).

BIBLIOGRAPHIE

- Armstrong S. M., McNulty O. M., Guardiola-Lemaitre B. & Redman J. R., Successful use of S20098 and melatonin in an animal model of delayed sleep-phase syndrome (DSPS). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1993, 46, 45-49.
- Audinot V., Mailliet F., Lahaye-Brasseur C., Bonnaud A., Le Gall A., Amosse C., Dromaint S., Rodriguez M., Nagel N., Galizzi J. P., Malpoux B., Guillaumet G., Lesieur D., Lefoulon F., Renard P., Delagrang P. & Boutin J. A., New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2003, 367, 553-561.
- Ayoub M. A., Couturier C., Lucas-Meunier E., Angers S., Fossier P., Bouvier M. & Jockers R., 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 M. A., Levoye A., Delagrang P. & Jockers R., Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol. Pharmacol.*, 2004, 66, 312-321.
- Barrett P., Conway S., Jockers R., Strosberg A. D., Guardiola-Lemaitre B., Delagrang P. & Morgan P. J., Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mel 1a melatonin receptor. *Biochem. Biophys. Acta*, 1997, 1356, 299-307.
- Barrett P., Morris M., Choi W. S., Ross A. & Morgan P. J., Melatonin receptors and signal transduction mechanisms. *Biol. Signals Recept.*, 1999, 8, 6-14.
- Blask D. E., Sauer L. A. & Dauchy R. T., Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanism of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr. Topics Med. Chem.*, 2002, 2, 113-132.
- Cassone V. M., Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.*, 1990, 13, 457-464.
- Clemens J. W., Jarzynka M. J. & Witt-Enderby P. A., Down-regulation of MT1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci.*, 2001, 69, 27-35.
- Conway S., Canning S. J., Barrett P., Guardiola-Lemaitre B., Delagrang P. & Morgan P. J., The roles of valine 208 and histidine 211 in ligand binding and receptor function of the ovine Mel1a β melatonin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 239, 418-423.
- Conway S., Mowat E. S., Drew J. E., Barrett P., Delagrang P. & Morgan P. J., Serine residues 110 and 114 are required for agonist binding but not antagonist binding to the melatonin

- MT(1) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 282, 1229-1236.
- Dardente H., Klosen P., Pévet P. & Masson-Pévet M., MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.*, 2003a, 15, 778-786.
- Dardente H., Menet J. S., Poirel V. J., Streicher D., Gauer F., Vivien-Roels B., Klosen P., Pévet P. & Masson-Pévet M., Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Mol. Brain Res.*, 2003b, 114, 101-106.
- Dubocovich M. L., Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*, 1983, 204, 183-184.
- Dubocovich M. L., Masana M. I., Iacob S. & Sauri D. M., 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.*, 1997, 355, 365-375.
- Dubocovich M. L., Yun K., Al Ghoul W. M., Benloucif S. & Masana M. I., Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J.*, 1998, 12, 1211-1220.
- Dubocovich M. L., Rivera-Bermudez M. A., Gerdin M. J. & Masana M. I., Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front. Biosci.*, 2003, 8, d1093-d1108.
- Dubocovich M. L. & Markowska M., Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 2005, 27, 101-110.
- Dubocovich M. L., Hudson R. L., Sumaya I. C., Masana M. I. & Manna E., Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J. Pineal Res.*, 2005, 39, 113-120.
- Ekmekcioglu C., Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed. Pharmacother.*, 2006, 60, 97-108.
- Fourmaintraux E., Depreux P., Lesieur D., Guardiola-Lemaitre B., Bennejean C., Delagrangé P. & Howell H. E., Tetrahydro-naphthalenic derivatives as new agonist and antagonist ligands for melatonin receptors. *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, 6, 9-13.
- Gauer F., Masson-Pévet M. & Pévet P., Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res.*, 1993, 602, 153-156.
- Gauer F., Masson-Pévet M., Stehle J. & Pévet P., Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res.*, 1994a, 641, 92-98.
- Gauer F., Masson-Pévet M. & Pévet P., Seasonal regulation of melatonin receptors in rodent pars tuberalis: correlation with reproductive state. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, 1994b, 96, 187-195.
- Gauer F., Schuster C., Pévet P. & Masson-Pévet M., Effect of a light pulse on melatonin receptor density and mRNA expression in Siberian hamster suprachiasmatic nuclei. *Neurosci. Lett.*, 1997, 233, 49-52.
- Gauer F., Schuster C., Poirel V. J., Pévet P. & Masson-Pévet M., Cloning experiments and developmental expression of both melatonin receptor Mel1A mRNA and melatonin binding sites in the Syrian hamster suprachiasmatic nuclei. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1998, 60, 193-202.
- Goldman B. D. & Darrow J. M., The pineal gland and mammalian photoperiodism. *Neuroendocrinology*, 1983, 37, 386-396.
- Guardiola-Lemaitre B., Melatonergic receptor agonists and antagonists: pharmacological aspects and therapeutic perspective. *Ann. Pharm. Fr.*, 2005, 63, 385-400.
- Guerrero H. Y., Gauer F., Schuster C., Pévet P. & Masson-Pévet M., Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat pars tuberalis. *Neuroendocrinology*, 2000, 71, 163-169.
- Hazlerigg D. G., Hastings M. H. & Morgan P. J., Production of a prolactin releasing factor by the ovine pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.*, 1996, 8, 489-492.
- Hill S. M., Kiefer T., Teplitzky S., Spriggs L. L. & Ram P., Modulation of the estrogen response pathway in human breast cancer cells by melatonin. In : Bartsch C., Bartsch H., Blask D. E., Cardinali D. P., Hrushesky W. J. M. & Mecke D. (Eds) The pineal gland and cancer. Springer-Verlag, Berlin, 2001, 343-358.
- Jiang Z. G., Nelson C. S. & Allen C. N., Melatonin activates an outward current and inhibits I_h in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.*, 1995, 687, 125-132.
- Kennedy S. H. & Emsley R., Placebo-controlled trial of agomelatine in the treatment of major depressive disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 2006, 16, 93-100.
- Klein D. C. & Moore R. Y., Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.*, 1979, 174, 245-262.
- Klosen P., Bienvenu C., Demarteau O., Dardente H., Guerrero H., Pévet P. & Masson-Pévet M., The mt1 melatonin receptor and ROR β receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J. Histochem. Cytochem.*, 2002, 50, 1647-1657.
- Kokkola T. & Laitinen J. T., Melatonin receptor genes. *Ann. Med.*, 1998, 30, 88-94.
- Kokkola T., Foord S. M., Watson M. A., Vakkuri O. & Laitinen J. T., Important amino acids for the function of the human MT1 melatonin receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, 65, 1463-1471.
- Le Gouic S., Atgie C., Viguerie-Bascands N., Hanoun N., Larrouy D., Ambid L., Raimbault S., Ricquier D., Delagrangé P., Guardiola-Lemaitre B., Penicaud L. & Casteilla L., Characterization of a melatonin binding site in Siberian hamster brown adipose tissue. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 339, 271-278.
- Leclerc V., Fourmaintraux E., Depreux P., Lesieur D., Morgan P., Howell H. E., Renard P., Caignard D. H., Pfeiffer B., Delagrangé P., Guardiola-Lemaitre B. & Andrieux J., Synthesis and structure-activity relationships of novel naphthalenic and bisosteric related amidic derivatives as melatonin receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, 6, 1875-1887.
- Lerner A. B., Case J. D., Takahashi Y., Lee T. H. & Mori W., Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, 80, 2587.
- Lesieur D., Leclerc V., Chavatte P., Marot C., Renard P. & Guardiola-Lemaitre B., Melatonin, a pertinent prototype for therapeutic innovation. *Thérapie*, 1998, 53, 429-437.
- Levoye A., Dam J., Ayoub M. A., Guillaume J. L., Couturier C., Delagrangé P. & Jockers R., The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J.*, 2006, 25, 3012-3023.
- Liebmann P. M., Wolfner A., Felsner P., Hofer D. & Schauenstein K., Melatonin and the immune system. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997, 112, 203-211.
- Lincoln G., Messenger S., Andersson H. & Hazlerigg D., Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 13890-13895.
- Lincoln G. A. & Richardson M., Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 1998, 119, 283-294.
- Liu C., Weaver D. R., Jin X., Shearman L. P., Pieschl R. L., Gribkoff V. K. & Reppert S. M., Molecular dissection of two dis-

- tinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 1997, 19, 91-102.
- Loo H., Hale A., D'Haenen H., Determination of the dose of agomelatine, a melatoninergic agonist and selective 5-HT(2C) antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 2002, 17, 239-47.
- Maillet F., Ferry G., Vella F., Thiam K., Delagrance P. & Boutin J. A., Organs from mice deleted for NRH: quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT3. *FEBS Lett.*, 2004, 578, 116-120.
- Malpoux B., Daveau A., Maurice-Mandon F., Duarte G. & Chemineau P., 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*, 1998, 139, 1508-1516.
- Masson-Pévet M., George D., Kalsbeek A., Saboureau M., Lakhdar-Ghazal N. & Pévet P., An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res.*, 1994, 278, 97-106.
- Masson-Pévet M., Gauer F., Schuster C. & Guerrero H. Y., Photic regulation of mt(1) melatonin receptors and 2-iodomelatonin binding in the rat and Siberian hamster. *Biol. Signals Recept.*, 2000, 9, 188-196.
- Mazna P., Berka K., Jelinkova I., Balik A., Svoboda P., Obsilova V., Obsil T. & Teisinger J., Ligand binding to the human MT2 melatonin receptor: the role of residues in transmembrane domains 3, 6, and 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 332, 726-734.
- McArthur A. J., Hunt A. E. & Gillette M. U., Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology*, 1997, 138, 627-634.
- Message S., Hazlerigg D. G., Mercer J. G. & Morgan P. J., Photoperiod differentially regulates the expression of Per1 and ICER in the *pars tuberalis* and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur. J. Neurosci.*, 2000, 12, 2865-2870.
- Moore R. Y., Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.*, 1983, 42, 2783-2789.
- Morgan P. J., Barrett P., Howell H. E. & Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.*, 1994, 24, 101-146.
- Nosjean O., Ferro M., Cogé F., Beauverger P., Henlin J. M., Lefoulon F., Fauchere J. L., Delagrance P., Canet E. & Boutin J. A., Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 31311-31317.
- Petit L., Lacroix I., De Coopet P., Strosberg A.D. & Jockers R., Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cGMP pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, 58, 633-639.
- Pévet P., The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1988, 28, 443-458.
- Pitrosky B., Kirsch R., Malan A., Mocaer E. & Pévet P., Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am. J. Physiol.*, 1999, 277, R812-R828.
- Poirel V. J., Cailotto C., Streicher D., Pévet P., Masson-Pévet M. & Gauer F., MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuroendocrinol. Lett.*, 2003, 24, 33-38.
- Ralph M. R., Foster R. G., Davis F. C. & Menaker M., Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 1990, 247, 975-978.
- Recio J., Pévet P., Miguez J. M. & Masson-Pévet M., Melatonin receptors in the suprachiasmatic nuclei and *pars tuberalis* of testosterone induced photoresponsive rats. *Neurosci. Lett.*, 1996, 214, 53-56.
- Recio J., Gauer F., Schuster C., Pévet P. & Masson-Pévet M., Daily and photoperiodic 2-¹²⁵I-melatonin binding changes in the *pars tuberalis* of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*): effect of constant light exposure and pinealectomy. *J. Pineal Res.*, 1998, 24, 162-167.
- Redman J., Armstrong S. & Ng K. T., Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*, 1983, 219, 1089-1091.
- Reppert S. M., Weaver D. R. & Ebisawa T., Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 1994, 13, 1177-1185.
- Reppert S. M., Godson C., Mahle C. D., Weaver D. R., Slaugenhaupt S. A. & Gusella J. F., Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995a, 92, 8734-8738.
- Reppert S. M., Weaver D. R., Cassone V. M., Godson C. & Kolakowski L. F. Jr., Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*, 1995b, 15, 1003-1015.
- Roca A. L., Godson C., Weaver D. R. & Reppert S. M., Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology*, 1996, 137, 3469-3477.
- Scheer F. A. J. L., Van Montfrans G. A., Van Someren E. J. W., Mairuhu G. & Buijs R. M., Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension*, 2004, 43, 192-197.
- Schuster C., Gauer F., Guerrero H., Lakhdar-Ghazal N., Pévet P. & Masson-Pévet M., Photic regulation of mt1 melatonin receptors in the Siberian hamster *pars tuberalis* and suprachiasmatic nuclei: involvement of the circadian clock and intergeniculate leaflet. *J. Neuroendocrinol.*, 2000, 12, 207-216.
- Schuster C., Gauer F., Malan A., Recio J., Pévet P. & Masson-Pévet M., The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt(1) melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinology*, 2001, 74, 55-68.
- Schuster C., Williams L. M., Morris A., Morgan P. J. & Barrett P., The human MT1 melatonin receptor stimulates cAMP production in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells via a calcium-calmodulin signal transduction pathway. *J. Neuroendocrinol.*, 2005, 17, 170-178.
- Shiu S. Y., Li L., Xu J. N., Pang C. S., Wong J. T. & Pang S. F., Melatonin-induced inhibition of proliferation and G1/S cell cycle transition delay of human choriocarcinoma JAr cells: possible involvement of MT2 (MEL1B) receptor. *J. Pineal Res.*, 1999, 27, 183-192.
- Slaugenhaupt S. A., Roca A. L., Liebert C. B., Altherr M. R., Gusella J. F. & Reppert S. M., Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics*, 1995, 27, 355-357.
- Stankov B. & Fraschini F., High affinity melatonin binding sites in the vertebrate brain. *Neuroendocrinology Lett.*, 1993, 15, 149-164.
- Tamarkin L., Baird C. J. & Almeida O. F., Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*, 1985, 227, 714-720.
- Ting K. N., Dunn W. R., Davies D. J., Sugden D., Delagrance P., Guardiola-Lemaitre B., Scalbert E. & Wilson V. G., Studies on the vasoconstrictor action of melatonin and putative

- melatonin receptor ligands in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br. J. Pharmacol.*, 1997, 122, 1299-1306.
- Vanecek J., Pavlik A. & Illnerova H., Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.*, 1987, 435, 359-362.
- Vanecek J., Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.*, 1998, 78, 687-721.
- Weaver D. R., Liu C. & Reppert S. M., Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol. Endocrinol.*, 1996, 10, 1478-1487.
- Witt-Enderby P. A., Bennett J., Jarzynka M. J., Firestine S. & Melan M. A., Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.*, 2003, 72, 2183-2198.
- Witt-Enderby P. A., Jarzynka M. J., Krawitt B. J. & Melan M. A., Knock-down of RGS4 and beta tubulin in CHO cells expressing the human MT1 melatonin receptor prevents melatonin-induced receptor desensitization. *Life Sci.*, 2004, 75, 2703-2715.
- Wurtman R., Ramelteon: a novel treatment for the treatment of insomnia. *Expert Rev. Neurother.*, 2006, 6, 957-964.
- Zlotos D. P., Recent advances in melatonin receptor ligands. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 2005, 338, 229-247.
-