

Le récepteur MT3 : où en sommes-nous ?

par Jean A. Boutin

*Pharmacologie Moléculaire et cellulaire, Institut de Recherches Servier, 125, chemin de Ronde, 78290 Croissy-sur-Seine.
E-mail : jean.boutin@fr.netgrs.com*

Reçu le 29 janvier 2007

RÉSUMÉ

La mélatonine est une neurohormone synthétisée par la glande pinéale la nuit. On prête à cette hormone de multiples fonctions dans de très nombreux systèmes patho-physiologiques, en particulier, des propriétés anti-oxydantes à des concentrations pharmacologiques (1 μ M et au-delà). La mélatonine agirait au travers de ses interactions avec 3 cibles moléculaires clairement identifiées : 2 récepteurs à 7 domaines transmembranaires (MT₁ et MT₂) et un site de fixation atypique (MT₃). Celui-ci a été purifié dans notre laboratoire et est identique à une enzyme appelée quinone réductase 2 (QR2, E.C. 1.10.99.2). Cette enzyme possède plusieurs propriétés inhabituelles. En particulier, elle ne reconnaît pas comme co-substrat les dérivés nicotinamides classiques (NADH et NADPH) mais plutôt des dérivés rares, en particulier la N-ribosyl-nicotinamide. Parmi ses autres caractéristiques deux sont de premières importances : 1) les souris KO pour QR2 (QR2^{-/-}) construites dans le laboratoire du Dr Jaiswal

à Houston (Texas) ainsi que les cellules dérivées de ces souris KO montrent une résistance accrue à la toxicité induite par la ménadione (la ménadione est le principal substrat connu de QR2), suggérant fortement que QR2 a un rôle d'activation toxique de cette quinone et non un rôle de détoxification, comme pressenti par des travaux antérieurs, et essentiellement basé sur sa ressemblance avec QR1, la très décrite enzyme de détoxification des quinones ; 2) le resveratrol, une molécule anti-oxydante dont les caractéristiques ne sont pas sans rappeler celles de la mélatonine, inhibe avec une affinité de l'ordre de 30 nM la QR2. La présentation résumera l'état des connaissances sur QR2 et sa relation avec la mélatonine et particulièrement fera état de quelques hypothèses de travail tentant à démontrer que les propriétés anti-oxydantes de la mélatonine pourraient être essentiellement dues à son interaction avec QR2.

SUMMARY Melatonin binding site MT₃ is QR2: state of the art

Melatonin is a neurohormone primarily synthesized in the pineal gland at night. It has numerous functions in various pathophysiological situations, including anti-oxidant properties at pharmacological concentrations (1 μ M and above). It is believed that melatonin acts through three main targets: two 7TM receptors (MT₁ and MT₂) and one atypical binding site called MT₃. This last binding site has been purified in our laboratory and is designated as quinone reductase 2 (QR2, E.C. 1.10.99.2). This enzyme has several individualistic features. It does not recognize standard nicotinamide derivatives as co-substrates, but rather, it recognizes rare ones such as N-ribosyl-nicotinamide. Among other features of this enzyme,

two are of major importance: 1) experiments from Dr Jaiswal (Houston, Texas) laboratory with QR2^{-/-} mice and with cells derived from them demonstrated that this enzyme is implicated in the toxicological activation of menadione, and thus, may have an activation rather than a detoxification role, as formerly believed, and 2) the polyphenol resveratrol, a molecule with anti-oxidant properties, is a potent inhibitor of QR2 (~ 30 nM). This talk will briefly summarize these findings, and will present our working hypotheses, molecular tools and findings on several aspects of the possible relationship between QR2 and melatonin, in particular those suggesting a mechanism for the anti-oxidant activity of melatonin.

LA MÉLATONINE ET SES ACTIONS

La mélatonine est dérivée du tryptophane par l'intermédiaire d'une série d'étapes métaboliques catalysée par une série de 4 enzymes (Fig. 1, Boutin *et al.*, 2005a), dont

l'étape limitante est l'arylalkyl N-acétyltransférase (AANAT, EC 2.3.1.87) (Ferry *et al.*, 2000). Elle partage les premières étapes de cette transformation avec la sérotonine.

La mélatonine a un rythme circadien très marqué, puisque sa synthèse n'intervient que la nuit. En effet,

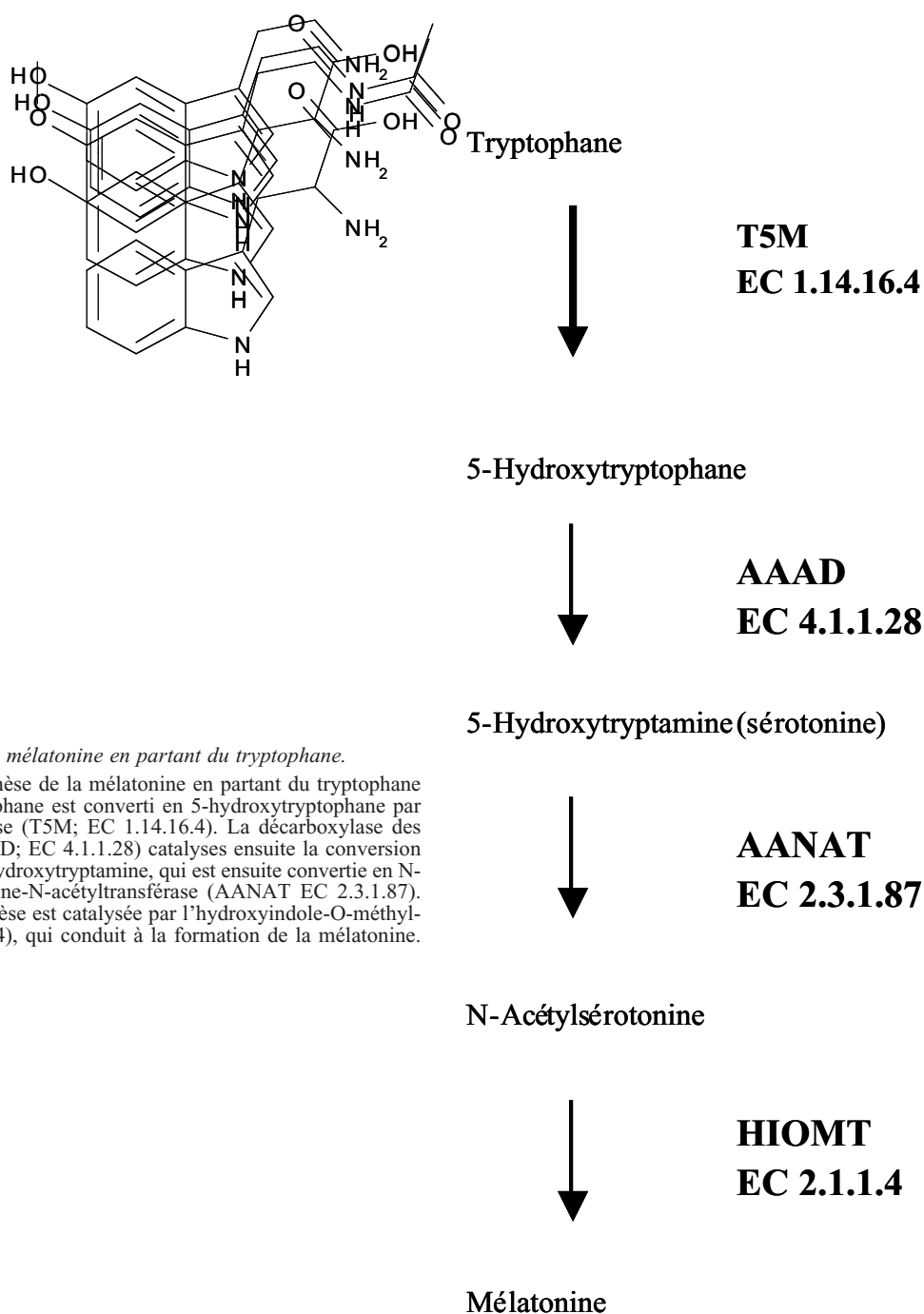


FIG. 1. – *Synthèse de la mélatonine en partant du tryptophane.*

Les quatre étapes de la synthèse de la mélatonine en partant du tryptophane sont successivement : le tryptophane est converti en 5-hydroxytryptophane par la tryptophane 5-mono-oxygénase (T5M; EC 1.14.16.4). La décarboxylase des aminoacides aromatiques (AAAD; EC 4.1.1.28) catalyse ensuite la conversion du 5-hydroxytryptophane en 5-hydroxytryptamine, qui est ensuite convertie en N-acétylsérotonine par la sérotonine-N-acétyltransférase (AANAT EC 2.3.1.87). La dernière étape de la biosynthèse est catalysée par l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT; EC 2.1.1.4), qui conduit à la formation de la mélatonine.

pendant le jour, la lumière, par l'intermédiaire de l'œil, entraîne, chez l'Homme, l'inhibition de la AANAT au niveau de la glande pinéale. La concentration circulante de la mélatonine pendant la nuit ne dépasse pas les quelques nanomolaires. Il est possible, néanmoins que dans certaines conditions, cette concentration soit plus élevée localement, atteignant quelques centaines de nanomolaires. La littérature comprend plusieurs milliers de références sur les actions de la mélatonine, en parti-

culier en liaison soit avec le rythme circadien dont elle serait le relais entre le noyau suprachiasmatique et les organes périphériques, soit avec ses propriétés anti-oxydantes. Ces propriétés sont largement controversées puisque les observations à leur base sont souvent issues d'expériences utilisant des concentrations dites pharmacologiques de mélatonine, c'est-à-dire, dans les micromolaires et au-delà. Il est néanmoins certains qu'à ces concentrations, la mélatonine est capable de ralentir ou

TABLEAU I. – Effets de la mélatonine récemment rapportés dans la littérature.

- Elle corrige les rythmes circadiens défectueux ou pathologiques
- Elle module l'activité neuronale de l'hippocampe chez le rat
- Elle possède des activités anti-convulsives
- Elle régule le flux sanguin cérébral chez le rat
- Elle est hypotensive chez le rat
- Elle potentialise la vasoconstriction noradrénergique (par le biais de MT₁) et est vasodilatatrice (par le biais de MT₂ dans l'artère caudale de rat)
- Elle inhibe la le phénomène de "rolling" des leucocytes dans la micro-circulation chez le rat
- Elle inhibe la tolérance aux nitrates dans les artères de rat
- Elle a un effet protecteur dans l'infarctus du myocarde chez le rat
- En pré-traitement, elle prévient la nécrose cellulaire et le dysfonctionnement rénal après ischémie-reperfusion
- Elle réduit le gain de poids corporel chez le rat obèse
- Elle inhibe la potentialisation synaptique dans la moelle épinière
- Elle inhibe les effets des œstrogènes
- Elle stimule la prolifération cellulaire chez le zébrafish
- Elle augmente la sécrétion de bicarbonate dans le duodénum de rat
- Elle augmente la prolifération des lymphocytes
- Elle est analgésique

d'inhiber des processus oxydatifs. La liste des processus physio-pathologiques dans lesquels la mélatonine a montré des actions est extrêmement longue (voir pour un résumé le tableau I).

LES CIBLES MOLÉCULAIRES DE LA MÉLATONINE

L'intérêt thérapeutique de la mélatonine a fait l'objet de nombreuses communications et n'est plus à démontrer (*cf.* par exemple Delagrangé & Boutin, 2006). Pour médier ses nombreuses activités, il n'a été rapporté dans la littérature « que » 4 cibles protéiques de la mélatonine : deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G (MT₁ & MT₂), un site de liaison avec des propriétés très particulières (MT₃) et le très controversé site nucléaire pour lequel aucune expérience n'a pu être reproduite en dehors du laboratoire d'origine (Beck-Andre *et al.*, 1994 ; Steinhilber *et al.*, 1995) et auquel aucune allusion ne sera faite dans la présente revue. Les caractéristiques comparées des 3 premiers sites de fixations (MT₁, MT₂ & MT₃) sont résumées dans le tableau II.

TABLEAU II. – Comparaison de quelques caractéristiques des trois sites de fixation de la mélatonine.

	MT ₁	MT ₂	MT ₃
	Clonés		
Localisation tissulaire (principales)	Cerveau	Rétine	Cerveau, rein
t _{1/2} association	1 à 2 h	1 à 2 h	2 secondes
K _d iodomélatonine	20 pM	160 pM	200 pM
K _i mélatonine	120 pM	310 pM	57 nM
K _i MCA-NAT	667 nM	3,5 µM	65 nM
Rôles présumés (à démontrer)	Rythmes circadiens	Sensibilité à la lumière	??

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires

Les deux premiers récepteurs de la mélatonine ont été décrits puis clonés par le groupe de Stephen Reppert (Reppert *et al.*, 1994, 1995). Ces récepteurs ont été clonés dans de nombreuses espèces. La caractérisation pharmacologique de ces récepteurs, outre celle reportée sur le tableau II a aussi été rapportée dans quelques espèces, en particulier l'Homme (Audinot *et al.*, 2003) et l'ovin (Mailliet *et al.*, 2004a), puisque cette dernière espèce, diurne, est le modèle animal le plus proche de l'Homme, pour un système mélatoninergique régulé de façon comparable. Rappelons qu'à ce titre, chez les animaux de laboratoires, essentiellement nocturnes, le pic de production de mélatonine est également nocturne, bien que les animaux soient en pleine activité, démontrant, s'il en était besoin, que la mélatonine n'est pas une substance hypnotique ; elle ne régite pas le sommeil, mais la succession des phases diurne et nocturne.

Le « récepteur » MT₃

Dès 1990, plusieurs groupes documentaient l'existence d'un site de fixation de la mélatonine présentant une faible affinité pour la mélatonine comparée aux autres récepteurs dans plusieurs tissus, particulièrement le cerveau et le rein de hamster (Pickering & Niles, 1990 ; Molinari *et al.*, 1996). Ce site de fixation présentait la particularité de lier la mélatonine à des températures non-physiologiques et avec un temps de demi-association extrêmement rapide de l'ordre de la seconde, par opposition aux dizaines de minutes des récepteurs MT₁ et MT₂. D'autre part, la pharmacologie de ce site se trouvait être très différente de celles de ces récepteurs (Paul *et al.*, 1999 ; Nosjean *et al.*, 2001) avec des composés relativement spécifiques de MT₃ (en comparaison de MT₁ et MT₂, sinon dans l'absolu, comme le prazosin ou le cibacron bleu – voir Paul *et al.*, 1999). D'autre part, Molinari *et al.* (1996) ont décrit un composé inspiré de la mélatonine, la MCA-NAT (5-méthoxycarbonylamino-N-acétyltryptamine), qui reconnaît avec une affinité nano-molaire le site MT₃ mais ni MT₁, ni MT₂.

Ces observations nous ont amenés à tenter de purifier ce site de fixation. En partant de membranes de reins de hamster, nous avons effectué une solubilisation modérée à l'aide d'un détergent doux, en ayant pris soin de vérifier que les caractéristiques de liaison du site étaient restées inchangées dans ces conditions de solubilisation. Le solubilisé a été ensuite chromatographié sur une phase ionique, puis sur une colonne d'affinité sur laquelle nous avons immobilisé un dérivé de la MCA-NAT. Cette étape très puissante de purification nous a permis de récupérer dans l'éluat une seule protéine migrant en électrophorèse sous conditions dénaturantes. Cette protéine a été excisée du gel et soumise après une digestion limitée à la trypsine, à une analyse en spectrométrie de masse (voir figure 2, un résumé de cette stratégie). Cette analyse a montré que les peptides identifiés appartenaient à une enzyme connue depuis 1960 sous le nom de quinone réductase 2 (Nosjean *et al.*, 2000). Cette enzyme a ensuite

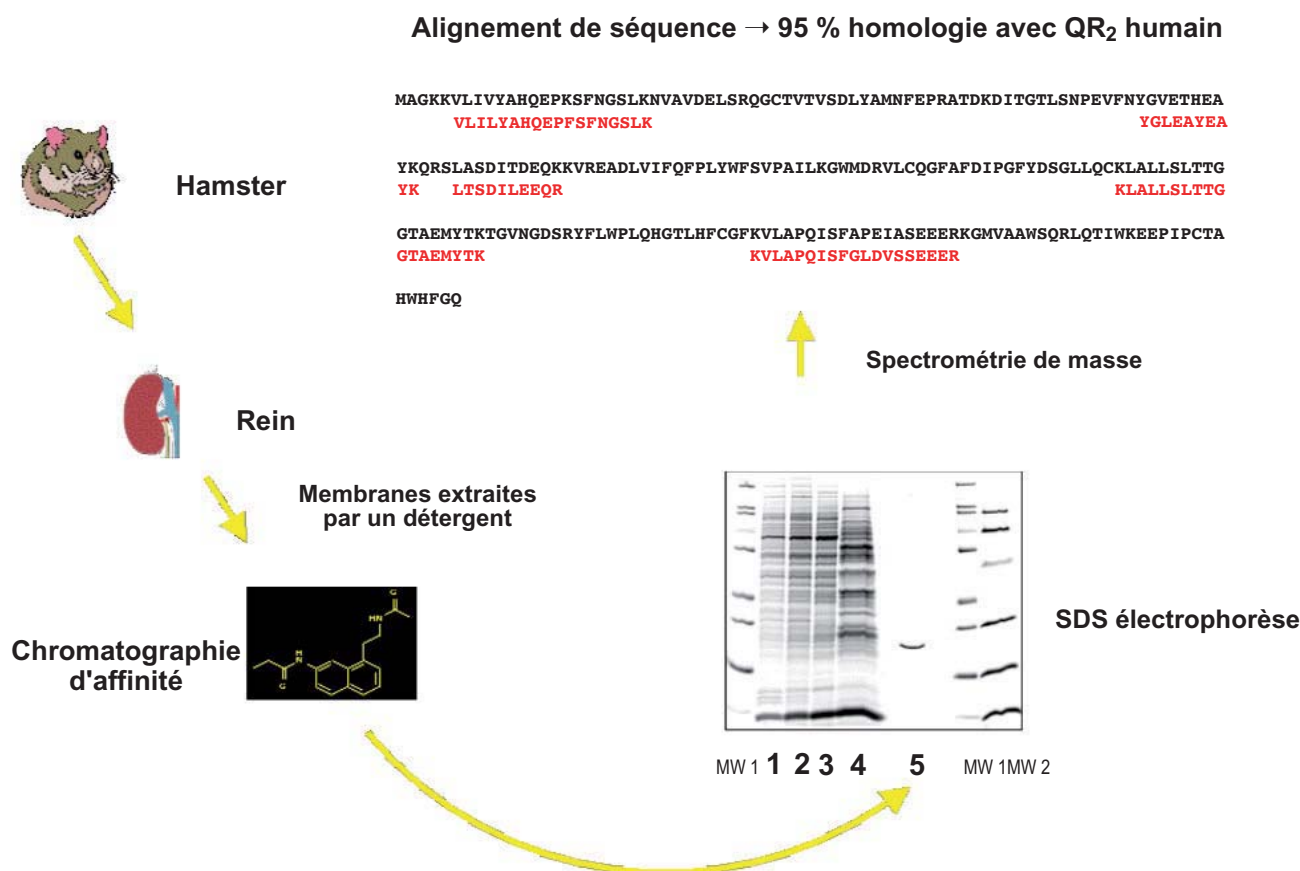


FIG. 2. – Identification du site de fixation de la mélatonine MT₃ : quinone réductase 2.

Représentation schématique de la purification et de l'identification du site MT₃. Insert de séquence : les séquences en rouge sont celles des peptides issus de la digestion de la protéine de rein de hamster purifiée (adapté de Nosjean *et al.*, 2000).

été clonée au laboratoire, et exprimée dans des cellules CHO ne comportant pas de quantité significative de sites de fixation MT₃. L'expression de QR2 dans cette cellule a entraîné l'apparition d'un site de fixation comparable en tous points au site MT₃. D'autre part, nous avons pu également montrer que dans tous les tissus où une activité catalytique significative de QR2 était mesurable, nous étions à même de mesurer le site MT₃ (Nosjean *et al.*, 2000).

La quinone réductase 2 est une enzyme assez complexe. Découverte et décrite au début des années 1960, elle a été clonée comme une isoforme de la quinone réductase 1. Sa principale caractéristique, et une des plus troublantes, est que cette enzyme ne reconnaît aucun des donneurs d'hydrure classiques tel que les NADH ou NADPH. Elle n'est capable de catalyser sa réaction d'oxydoréduction qu'en présence de dérivés plus simples de la nicotinamide, tels que ses dérivés N-méthyl, N-rinosyl ou N-benzyl. D'autre part, nous ne lui connaissons aucun substrat naturel. La quinone réductase 2 est une enzyme de 231 aminoacides chez l'homme. Son gène est porté par le chromosome 6. Elle est relativement ubiquitaire. C'est une enzyme à FAD et à zinc. Elle fonc-

tionne sous forme de dimère. Elle a été cristallisée par Foster *et al.* (1999).

Utilisant des membranes de CHO sur-exprimant la QR2 (CHO-QR2), nous avons vérifié que les données de liaison avec les deux ligands radio-marqués disponibles (2-iodomélatonine et 2-iodo-MCA-NAT) étaient conformes aux données publiées sur les sources biologiques rapportées dans la littérature. Un aperçu de ces comparaisons est présenté dans le tableau III. Grâce aux nombreux composés originaux décrits dans la littérature, nous avons ensuite vérifié que les données obtenues avec les deux radio-ligands ne conduisaient pas à des données ininterprétables. Effectivement, la représentation des données donne une corrélation de l'ordre de 0,9, suggérant fortement que ces radio-traceurs marquent le même site (pour une liste complète, voir Mailliet *et al.*, 2005).

Dans le même esprit de vérification, nous avons ensuite évalué la capacité de la mélatonine à inhiber l'activité catalytique de QR2. Les premières données avaient été obtenues en utilisant un co-substrat artificiel, le BNAH, extrêmement stable, et conduisaient à des mesures d'IC₅₀ de l'ordre de la cinquantaine de micromoles. Nous avons répété ces expériences avec un co-substrat naturel de

TABLEAU III. – Comparaison des Kd des radioligands 2-iodo-mélatonine et 2-iodo-MCANAT pour le site de fixation MT₃.

Sources biologiques	2-iodo-mélatonine	2-iodo-MCANAT	Auteurs
Hamster	2 nM	–	Pickering & Niles, 1990
Hamster	400 pM	200 pM	Molinari <i>et al.</i> , 1996
Hamster	2 nM	2 nM	Paul <i>et al.</i> , 1999
Hamster	–	600 pM	Nosjean <i>et al.</i> , 2001
Hamster	1 nM	–	Mailliet <i>et al.</i> , 2005
Human QR2	4 nM	–	Mailliet <i>et al.</i> , 2005
Hamster	–	430 pM	Ferry, Jaslowiak & Boutin, 2006 (en préparation)

l'enzyme, le NRH (N-ribosyl nicotinamide), et obtenu une IC₅₀ de 600 nM, plus en rapport avec la forte affinité de MT₃ avec la mélatonine. Ces données nous ont permis également de montrer que la mélatonine était un inhibiteur compétitif du co-substrat, et non compétitif du substrat. Continuant notre description de QR2 dans le contexte de MT₃, nous avons également mesuré les capacités inhibitrices d'une série de composés soit originaux soit de référence, comme les flavonoïdes resveratrol et chrysoeriol (Buryanovskyy *et al.*, 2004 ; Boutin *et al.*, 2005b, respectivement). Ces composés montrent, comme la mélatonine, des capacités inhibitrices de QR2 différentes, en fonction des couples co-substrat/substrat avec lesquels l'activité enzymatique est mesurée (Ferry, Hecht & Boutin, non publiés). Ces composés ont toujours une affinité mesurable pour le site MT₃ (membranes de rein ou de cerveau de hamster, de souris ou homogénats de cellules CHO-QR2).

Une des preuves absolues qui peut être obtenue dans ce genre de découverte (de la nature protéique d'un nouveau site de fixation) est la construction de souris dont le gène pour la QR2 est invalidée. Ces souris, QR2^{-/-}, qui sont viables comme l'avait démontré dans d'autres circonstances le groupe de Jaiswal (Long *et al.*, 2002), nous ont permis de montrer sans ambiguïté l'absence de site MT₃ dans tous les organes connus pour posséder, chez la souris sauvage, ce site (Mailliet *et al.*, 2004b). Enfin, la communication personnelle transmise par Mesecar et Calamini (UIC, Chicago) de l'obtention d'un co-cristal de QR2 avec la mélatonine apporte une preuve de plus que QR2 serait bien MT₃ (Calamini *et al.*, manuscrit en préparation).

Néanmoins, il s'avère que plusieurs observations à ce propos restent incompréhensibles. Parmi elles, le fait que QR2 a toujours été décrite comme une enzyme soluble, cytosolique. Nous avons fait une série d'expériences sur nos cellules CHO-QR2, et nous avons observé, à l'aide d'un anticorps spécifique, qu'une portion non-négligeable de QR2 dans ces cellules était associée à la membrane plasmique. Cette observation pose cependant une autre question : pour quelles raisons et par quel mécanisme QR2 – ou une partie de QR2 – s'associe-t-elle avec la membrane ?

Les études rapportées dans la littérature sur le rôle en physiopathologie de MT₃ sont peu nombreuses. Elles concernent toutes les deux des études entreprises avec des composés ayant une affinité pour MT₃. D'une part l'équipe de Pintor a rapporté un effet hypotenseur de la MCA-NAT au niveau oculaire mais dont les résultats restent partiels et peut-être pas lié au MT₃ (Pintor *et al.*, 2003) et d'autre part des composés originaux et brevetés ainsi que la MCA-

NAT, présentant une activité protectrice vis-à-vis d'un modèle d'ischémie-reperfusion de cœur isolé de rat (Lagneux *et al.*, 2000). Ces deux études ouvrent la voie, l'une vers un rapport œil/mélatonine déjà soupçonné dans la littérature mais peu étayé, et d'autre part sur les effets protecteurs et anti-oxydants de la mélatonine. Cette dernière voie trouve peut-être son chaînon manquant dans notre découverte de l'unicité du site MT₃ et de la QR2. En effet, cette dernière enzyme a vu son rôle en physio-pathologie éclairé d'un jour très nouveau quand Long *et al.* (2002) ont montré que chez la souris QR2^{-/-}, l'injection intra-péritonéale de 20 mg/kg de ménadione était sans conséquence, alors que chez la souris sauvage, ce traitement entraînait une létalité chez 100 % des animaux. Cet effet était encore aggravé (toxicité sévère à plus basse dose) quand le co-substrat de QR2, NRH, était co-administré.

Sur un modèle différent, nous avons répété des expériences similaires montrant que la toxicité de la ménadione sur un modèle cellulaire (les cellules d'hippocampe de souris HT22) était réduite quand les cellules n'exprimaient plus de QR2 (knock-out cellulaire par siRNA). De même cette toxicité de la ménadione sur des cellules HT22 sauvages était diminuée par le co-traitement de 10 µM de mélatonine (Chomarat *et al.*, en préparation). Ces expériences cellulaires nous avaient été inspirées par le travail de Buryanovskyy *et al.* (2004) qui décrivait un même effet protecteur par suppression de l'expression de QR2 dans des cellules K562, effet mimé par le puissant inhibiteur de QR2, le resveratrol.

Ces récentes observations ouvrent un champ d'investigation très large dans deux directions : d'abord la consolidation de ces observations par des laboratoires indépendants (à ce titre, des études phénotypiques sont en cours sur notre colonie de souris QR2^{-/-}) et la recherche du mécanisme par lequel la QR2 pourrait avoir une action activatrice de certains processus durant des stress oxydatifs de nature diverse. L'obtention au laboratoire de nombreux outils (anticorps, siRNA, cellules recombinantes, mutants de QR2, souris KO) permettra d'explorer plus facilement ces voies.

Les hypothèses

Il est hasardeux et non conventionnel de livrer une série d'hypothèses à ce stade de nos connaissances. Néanmoins, il est clair qu'expliquer les multiples actions de la mélatonine dans de très nombreuses situations tant physiologiques que pathologiques est nécessaire pour mieux comprendre le domaine.

Les connaissances actuelles sur QR2, que nous avons résumées dans une revue récente (Vella *et al.*, 2005) montrent que cette enzyme pourrait avoir un rôle plus universel que supposé à ce jour. En effet, après avoir étudié pendant quelques années les kinases, et plus particulièrement les tyrosines protéines kinases (Boutin, 1994, 1996), il est tentant de faire un parallèle entre cette modification post-traductionnelle (la phosphorylation) et le rôle de QR2 dans différents processus cellulaires. Knox *et al.* (2000) ont rapporté que QR2 avait la capacité, au moins *in cellulo*, de catalyser une activité de nitroréductase [R-NO $\rightarrow$ R-NH₂]. Cette activité n'est pas connue chez les mammifères (par opposition aux bactéries). D'autre part la régulation de certaines activités enzymatiques par la nitrosylation de tyrosine est un phénomène largement décrit (*cf.* par exemple Gow *et al.*, 2004 ; Bian *et al.*, 2006). QR2 aurait-elle la capacité de réduire la nitrotyrosine en aminotyrosine, ouvrant alors la possibilité d'ubiquitination, un phénomène bien connu pour le NH₂ des lysines mais mal connu en dehors de cet aminoacide ? D'autant que le rapport entre la toxicité de la ménadione (un substrat de la QR2), le coenzyme Q (également un substrat de la QR2) et une activité nitroréductase a déjà été suggérée par Grimaldi *et al.* (2005), au moins chez les procaryotes. Ce mécanisme, suggéré ou espéré, dans la présente revue serait d'autant plus fin que le co-substrat de la QR2 est rare et peu décrit (NRH), et qu'il est possible d'envisager une régulation très exceptionnelle de l'activité de QR2, en modulant dans des circonstances très particulières (stress oxydatif, état pré-apoptotique ?) la présence de ce co-substrat, dans le meilleur cas issu de la dégradation du NAD(P)H.

Remerciements. – Ces travaux sont le fruit du travail acharné de mes collègues de la division de pharmacologie moléculaire et cellulaire : les post-doctorants Drs Pascal PAUL, Olivier NOSJEAN, Fanny VELLA, François MAILLIET, Florence CHATELAIN-EGGER ; les étudiants Julien MOZO, Sabrina HECHT, Carine SAUNIER, Anne-Laure JASKOWIAK et les chefs de groupe : Drs Gilles FERRY, Natacha MOULHARAT, Valérie AUDINOT, Pascale CHOMARAT, Francis COGÉ, Philippe BEAUVERGER et Jean-Paul NICOLAS, ainsi que le Dr Philippe DELAGRANGE. Les collaborations pour ce sujet des Professeurs Françoise NEPVEU (Toulouse), Benoît MALPAUX (Tours), Andy MESACAR et Barbara CALAMINI (Chicago), Luc PÉNICAUD et Louis CASTELLA (Toulouse) sont profondément appréciées. Les travaux de chimie des groupes de François LEFOULON (Orléans), Michel WIERZBICKI (Suresnes), des Professeurs Daniel LESIEUR & Saïd YOUS (Lille), Gérard GUILLAUMET (Orléans) et Marie-Claude VIAUD (Tours) sont aussi à l'origine de la découverte de nombreux composés MT₃. Cette revue a fait l'objet d'une présentation au Melatonin meeting de Chicago, en septembre 2006.

BIBLIOGRAPHIE

- Audinot V., Mailliet F., Lahaye-Brasseur C., Bonnaud A., Le Gall A., Amossé C., Dromaint S., Rodriguez M., Nagel N., Galizzi J. P., Malpau B., Guillaumet G., Lesieur D., Lefoulon F., Renard P., Delagrange P. & Boutin J. A., New selective ligands of human cloned melatonin MT₁ and MT₂ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 2003, 367, 553-561.
- Beck-Andre M., Wiesenburg I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J. H. & Carlberg C., Pineal gland melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor subfamily. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 28531-28534.
- Bian K., Ke Y., Kamisaki Y. & Murad F., Proteomic modification by nitric oxide., *J. Pharmacol. Sci.*, 2006, 101, 271-279.
- Boutin J. A., Tyrosine protein kinase inhibition and cancer. *Int. J. Biochem.*, 1994, 26, 1203-1226.
- Boutin J. A., Tyrosine protein kinase assays. *J. Chromatog.*, 1996, 684, 179-199.
- Boutin J. A., Audinot V., Ferry G. & Delagrange P., Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 2005a, 26, 412-419.
- Boutin J. A., Chatelain-Egger F., Vella F., Delagrange P. & Ferry G., Quinone reductase 2 substrate specificity and inhibition pharmacology. *Chem. Biol. Inter.*, 2005b, 151, 213-228.
- Buryanovskyy L., Fu Y., Boyd M., Ma Y., Hsieh T.C., Wu J. M. & Zhang Z., Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. *Biochemistry* 2004, 43, 11417-11426.
- Delagrange P., Boutin J. A., Therapeutic potential of melatonin ligands. *Chronobiol. Int.*, 2006, 23, 413-418.
- Ferry G., Loynel A., Kucharczyk N., Bertin S., Rodriguez M., Delagrange P., Galizzi J. P., Jacoby E., Volland J. P., Lesieur D., Renard P., Canet E., Fauchère J. L. & Boutin J. A., Substrate specificity and inhibition studies of human serotonin N-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 8794-8805.
- Foster C. E., Bianchet M. A., Talalay P., Zhao Q. & Amzel L. M., Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein. *Biochemistry*, 1999, 38, 9881-9886.
- Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A. & Ischidopoulos H., Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2004, 287, L262-268.
- Grimaldi S., Lanciano P., Bertrand P., Blasco F. & Guigliarelli B., Evidence for an EPR-detectable semiquinone intermediate stabilized in the membrane-bound subunit NarI of nitrate reductase A (NarGHI) from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2005, 44, 1300-1308.
- Knox R. J., Jenkins T. C., Hobbs S. M., Chen S., Melton R. G. & Burke P. J., Bioactivation of 5-(azirin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: a novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy. *Cancer Res.*, 2000, 60, 4179-4186.
- Lagneux C., Joyeux M., Demenge P., Ribuot C. & Godin-Ribuot D., Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life sci.*, 2000, 66, 503-509.
- Long D. J., Iskander K., Gaikwad A., Arin M., Roop D. R., Knox R., Barrios R. & Jaiswal A. K., Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 46131-46139.
- Mailliet F., Audinot V., Malpau B., Bonnaud A., Delagrange P., Migaud M., Barrett P., Viaud-Massuard M.C., Lesieur D., Lefoulon F., Renard P. & Boutin J. A., Molecular pharmacology of ovine melatonin receptor. Comparison with recombinant human MT₁ and MT₂. *Biochem. Pharmacol.*, 2004a, 67, 667-677.
- Mailliet F., Ferry G., Vella F., Thiam K., Delagrange P. & Boutin J. A., Organs from mice deleted for NRH: Quinone oxydo-reductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT₃. *FEBS Lett.*, 2004b, 578, 116-120.
- Mailliet F., Ferry G., Vella F., Berger S., Cogé F., Chomar P., Mallet C., Guénin S. P., Guillaumet G., Viaud-Massard M. C., Yous S., Delagrange P. & Boutin J. A., Characterization of melatonergic MT₃ binding site as the NRH:quinone oxidoreductase 2 catalytic site. *Biochem. Pharmacol.*, 2005, 71, 74-88.
- Molinari E. J., North P. C., Dubocovich M. L., 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, 301, 159-168.

- Nosjean O., Ferro M., Cogé F., Beauverger P., Henlin J. M., Lefouillon F., Fauchère J. L., Delagrangé 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.
- Nosjean O., Nicolas J. P., Klupsch F., Delagrangé P., Canet E. & Boutin J. A., Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT₁, MT₂ and MT₃/QR2. Tissue distribution of MT₃/QR2. *Biochem. Pharmacol.*, 2001, 61, 1369-1379.
- Paul P., Lahaye C., Delagrangé P., Nicolas J. P., Canet E. & Boutin J. A., Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, 290, 334-340.
- Pickering D. S. & Niles L. P., Pharmacological characterization of melatonin binding sites in Syrian hamster hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.*, 1990, 175, 71-77.
- Pintor J., Pelaez T., Hoyle C. H. V. & Peral A., Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit further evidence for an MT₃ receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 138, 831-836.
- Reiter R. J., Melchiorri D., Sewerynek E., Poeggeler B., Barlow-Walden L., Chuang J., Ortiz G. G. & Acuna-Castroviejo D., A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, 1995, 18, 1-11.
- 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*, 1995, 92, 8734-8738.
- Steinhilber D., Brungs M., Werz O., Wiesenberg I., Danielsson C., Kahlen J. P., Nayeri S., Schröder M. & Carlberg C., The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 7037-7040.
- Vella F., Ferry G., Delagrangé P. & Boutin J. A., NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries. *Biochem. Pharmacol.*, 2005, 71, 1-12.
-