

**Implication des récepteurs de la mélatonine dans les troubles
neurologiques et le diabète de type 2 et identification de régions clés du
récepteur MT₁ responsables de sa sélectivité fonctionnelle**

par Alan HÉGRON

École doctorale 568 Signalisation et réseaux intégratifs en biologie

Sciences de la vie et de la santé

Université Paris Saclay

Et

Département de Biologie moléculaire

Université de Montréal

**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur
de l'Université Paris Saclay et de l'Université de Montréal**

22 Octobre 2018

Directeur de thèse : Dr. Ralf JOCKERS

Co-Directeur de thèse : Dr. Michel BOUVIER

**Implication des récepteurs de la mélatonine dans les troubles
neurologiques et le diabète de type 2 et identification de régions clés du
récepteur MT₁ responsables de sa sélectivité fonctionnelle**

par Alan HÉGRON

École doctorale 568 Signalisation et réseaux intégratifs en biologie

Sciences de la vie et de la santé

Université Paris Saclay

Et

Département de Biologie moléculaire

Université de Montréal

**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur
de l'Université Paris Saclay et de l'Université de Montréal**

12 Décembre 2018

Directeur de thèse : Dr. Ralf JOCKERS

Co-Directeur de thèse : Dr. Michel BOUVIER

I. Résumé

La mélatonine est une neurohormone produite principalement par la glande pinéale de manière circadienne et agissant par l'activation de deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) appelés MT₁ et MT₂. La mélatonine régule de nombreuses fonctions physiologiques importantes. La régulation des niveaux de dopamine (DA) et de glucose en font partie mais nous ne savons pas clairement comment la mélatonine les régule.

Les niveaux de DA extracellulaire sont principalement régulés par son transporteur (DAT) responsable de sa recapture dans les neurones présynaptiques afin de prévenir d'une hyperactivation des récepteurs dopaminergiques. Par conséquent, nous avons vérifié le rôle de DAT dans la régulation du système dopaminergique par le système mélatoninergique. Nous avons montré qu'en interagissant avec la forme immature non-glycosylée de DAT, MT₁ et MT₂ le retiennent dans le réticulum endoplasmique régulant ainsi son expression à la surface cellulaire et donc la recapture de la DA. De la même manière, les souris déficientes en MT₁ ou MT₂ ont montré une augmentation de la recapture de la DA dans les synaptosomes de striatum et une baisse de l'hypermotilité induite par l'amphétamine. Dans ce projet nous avons ainsi révélé un nouveau lien entre les systèmes mélatoninergiques et dopaminergiques basé sur la formation de complexes moléculaires entre les récepteurs de la mélatonine et DAT.

Afin de mieux comprendre le rôle de la mélatonine dans la régulation des niveaux de glucose, nous avons ensuite étudié l'implication de variants génétiques de MT₂ dans le développement du diabète de type 2 (DT2). Des études antérieures avaient montré que des variants naturels défectueux fonctionnellement étaient associés à un risque de développer le DT2. Afin de déterminer plus précisément les propriétés défectueuses en lien avec le DT2, nous avons mesuré l'activation spontanée et celle induite par la mélatonine de 40 variants MT₂. Nous avons ainsi montré que des défauts d'activation des protéines G α i et G α z induite par la mélatonine et de recrutement spontané de la β arrestine-2 sont significativement reliés à un risque de développer le DT2. Les résultats expérimentaux corrélaient avec les prédictions de l'analyse sur le score d'évolution. Ce travail permettra de nouvelles avancées dans la recherche de traitements personnalisés pour les personnes portant les mutations sur MT₂ afin qu'il retrouve une réponse non défectueuse.

Le séquençage du gène codant pour MT₁ chez 9393 personnes a permis l'identification de 32 variants naturels de ce récepteur. Le récepteur MT₁ sauvage et les variants ont ainsi été

caractérisés grâce aux techniques de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET). Nous avons montré que MT₁ active les protéines G α i/o, G α 12 et G α 15 et recrute la β arrestine-2. L'analyse des résultats par factorisation matricielle non linéaire a révélé l'existence de 5 clusters caractérisés par différents profils de signalisation. La modélisation 3D par homologie de MT₁ a permis de déterminer l'impact de chaque variant sur l'activation du récepteur et ses interactions avec les protéines G et la β arrestine-2. Ce projet a ainsi permis de démontrer que des variants naturels sont très intéressants afin de comprendre les mécanismes d'action des RCPGs.

En résumé, ce travail contribue à la compréhension des fonctions des récepteurs à la mélatonine et souligne leur importance dans la régulation du système dopaminergique et de l'homéostasie glucidique. Nos résultats offrent de nouvelles perspectives dans la recherche de nouveaux traitements personnalisés pour les patients souffrant d'un dérèglement du système dopaminergique ou de DT2.

Mots-clés : Mélatonine, récepteurs couplés aux protéines G, dopamine, transporteur, neurobiologie, diabète de type 2, variant génétique, structure, signalisation

II. Abstract

Melatonin is a neurohormone mainly released from the pineal gland in a circadian manner acting through two G protein-coupled receptors (GPCRs) called MT₁ and MT₂. Melatonin regulates many important physiological functions. Regulation of dopamine (DA) and glucose levels are two of them but how they do this is not clear.

Extracellular DA levels are mainly regulated by its transporter (DAT) which mediates DA re-uptake into presynaptic nerve termini to prevent DA receptor hyperactivation in the presynaptic cleft. Consequently, we verified the role of DAT in the regulation of the DA system by melatonin. We showed that MT₁ and MT₂, by interacting with the immature non-glycosylated form of DAT retain DAT in the endoplasmic reticulum thus regulating DAT cell surface expression and DA reuptake. Consistently, mice with targeted deletion of MT₁ and MT₂ show markedly enhanced DA uptake in striatal synaptosomes and decreased amphetamine-induced locomotor activity. Collectively, we revealed here a molecular link between the melatonin and DA systems, which is based on the formation of a molecular complex between melatonin receptors and DAT.

To better understand the role of melatonin on the regulation of glucose levels, we studied the involvement of genetic variants of MT₂ in the development of type 2 diabetes (T2D). Previous studies showed that natural loss-of-function variants of MT₂ associate with T2D risk. To determine more precisely the defective properties linked to T2D risk we monitored spontaneous and melatonin-induced activation of different signaling pathways by 40 MT₂ variants. We show that defects in melatonin-induced G α i and G α z activation and spontaneous β arrestin-2 recruitment are most significantly associated to T2D risk. Experimental results correlated well with those predicted by evolutionary lineage analysis. This work will help to propose personalized treatments for MT₂ variant carriers to recover their defective responses.

Sequencing of MT₁ gene of 9393 individuals resulted in the identification of 32 natural MT₁ variants. MT₁ wild-type and variants were functionally characterized in bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays. We showed that MT₁ activates G α i/o, G α 12 and G α 15 proteins and recruits β arrestin-2. Analyzes of results by non-linear matrix factorization revealed the existence of 5 clusters characterized by different signaling profiles. Computational homology modeling of the 3D model of MT₁ helped to determine the impact of each variant on receptor activation and interaction with G proteins and β arrestin-2.

Collectively, our data illustrate that natural variants are powerful tools to understand the molecular basis of GPCR function.

Overall, this work contributes to our understanding of the function of melatonin receptors and highlights their importance in the regulation of the DA system and glucose homeostasis. Our results will open new, personalized therapeutic options for patient suffering from a defective DA system or T2D.

Keywords : Melatonin, G protein-coupled receptors, dopamine, transporter, neurobiology, type 2 diabetes, genetic variant, structure, signaling

III. Table des matières

I. Résumé.....	2
II. Abstract.....	4
III. Table des matières.....	6
IV. Liste des tableaux.....	10
V. Liste des figures	11
VI. Liste des abréviations.....	14
VII. Remerciements.....	18
Chapitre 1.....	20
I. Le système mélatoninergique	21
A. La mélatonine.....	21
1. Historique de la mélatonine	21
2. Synthèse et régulation de la mélatonine.....	21
a. Synthèse et libération de la mélatonine	21
b. Le métabolisme de la mélatonine	23
B. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	24
1. Introduction des récepteurs couplés aux protéines G	24
2. Structure et classification des RCPGs.....	26
3. Signalisations protéines G dépendantes et indépendantes	27
4. Mécanismes d'internalisation et de trafic	28
5. Signalisation biaisée.....	31
C. Les récepteurs de la mélatonine	31
1. Découverte des récepteurs de la mélatonine	31
2. Structure des récepteurs de la mélatonine.....	32
3. Localisation tissulaire des MTRs.....	34
a. Les MTRs dans la rétine	34
b. Les MTRs dans le cerveau.....	35
c. Les MTRs dans le pancréas	37
d. Les MTRs dans le système immunitaire.....	38
4. Régulation de l'expression des MTRs	39
5. Signalisation des MTRs	40
a. Signalisation du récepteur MT ₁	40

b.	Signalisation du récepteur MT ₂	40
c.	Signalisation des MTRs dans le pancréas murin	42
II.	Rôles et implications de la mélatonine	42
A.	Propriétés chronobiotiques et régulation saisonnière de la mélatonine	42
1.	Rôle de la mélatonine endogène	42
2.	Rôle de la mélatonine exogène	43
B.	Implication de la MLT dans les maladies métaboliques.....	44
1.	Introduction au métabolisme du glucose	44
2.	Introduction sur le diabète	44
a.	Le diabète de type 1	45
b.	Le diabète de type 2	45
3.	Les facteurs génétiques du diabète de type 2.....	45
4.	Le diabète de type 2 en lien avec la mélatonine	46
C.	Implication du système mélatoninergique dans les maladies neurologiques et les troubles du comportement.....	47
D.	Lien entre systèmes mélatoninergiques et dopaminergiques.....	49
III.	Le système dopaminergique	51
A.	Historique de la dopamine	51
B.	Synthèse et métabolisme de la dopamine	51
C.	Les récepteurs de la dopamine.....	52
D.	Localisation du système dopaminergique.....	53
1.	Le système dopaminergique dans la rétine	53
2.	Le système dopaminergique dans le système nerveux central.....	53
3.	Le système dopaminergique dans le système sanguin.....	54
4.	Le système dopaminergique dans le pancréas	55
5.	Le système dopaminergique dans le système immunitaire.....	55
6.	Le système dopaminergique dans le rein	56
E.	Introduction aux transporteurs neuronaux plasmiques	56
F.	Le transporteur de la dopamine.....	56
G.	Effet neurotoxique de la dopamine cytosolique.....	59
H.	Implication dans les maladies neurologiques et les troubles du comportement	60
1.	Implication dans la maladie de Parkinson	60
2.	Implication dans le trouble de déficit d'attention avec hyperactivité	60

3. Implication dans la dépression.....	61
4. Les drogues psychostimulantes.....	61
IV. Objectifs de la thèse	63
Chapitre 2.....	65
Abstract.....	68
Introduction.....	69
Results.....	76
Figures.....	92
Résumé du chapitre 2 – Article 1.....	102
Chapitre 3.....	103
Abstract.....	105
Introduction.....	106
Results.....	109
Figures.....	139
Résumé du chapitre 3 – Article 2.....	159
Chapitre 4.....	160
Abstract.....	164
Introduction.....	165
Results.....	171
Supplementary material	183
Résumé du chapitre 4 – Article 3.....	190
Chapitre 5.....	191
I. Discussion sur le premier projet de la thèse.....	192
A. Discussion sur les interactions entre DAT et les MTRs	192
B. Discussion sur les effets <i>in vivo</i> des interactions entre DAT et les MTRs	194
C. Intérêt de cette découverte pour le traitement de la MP	194
D. Discussion sur la régulation des interactions entre DAT et les MTRs dans le corps ..	195
.....	195
E. Utilisation de nouveaux anticorps anti-MTRs de souris.....	195
II. Discussion sur le second projet de la thèse	196
A. Caractérisation du récepteur sauvage MT ₂	196
B. Caractérisation des variants naturels MT ₂ et lien avec le DT2.....	196
III. Discussion sur le troisième projet de la thèse	197

A.	Caractérisation du récepteur sauvage MT ₁	197
B.	Caractérisation des variants naturels MT ₁	198
C.	Discussion sur les limites de l'analyse de corrélation entre effets phénotypiques et prédictions informatiques.....	199
IV.	Discussion sur les liens entre les projets 2 et 3	199
A.	Discussion sur la comparaison des profils de signalisation des récepteurs MT ₁ et MT ₂	199
B.	Discussion sur la comparaison des mécanismes d'activation des récepteurs MT ₁ et MT ₂	200
V.	Conclusion générale.....	202
VI.	Bibliographie.....	203

IV. Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I. Présence des récepteurs de la mélatonine dans différentes parties du cerveau de mammifères.....	36
--	----

Chapitre 3

Table S1. Summary of the functional profiling of $G\alpha_{i1}$ activation by WT-MT ₂ and MT ₂ variants.....	154
--	-----

Table S2. Summary of the functional profiling of $G\alpha_z$ activation by WT-MT ₂ and MT ₂ variants.....	155
---	-----

Table S3. Summary of the functional profiling of β -arrestin2 recruitment to WT-MT ₂ and MT ₂ variants.....	156
---	-----

Table S4. Summary of the functional profiling of cAMP inhibition by WT-MT ₂ and MT ₂ variants.....	157
--	-----

Table S5. Summary of the functional profiling of ERK activation by WT-MT ₂ and MT ₂ variants.....	158
---	-----

Chapitre 4

Supplementary table 1. Data from the functional characterization of variants.	189
--	-----

V. Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.	Synthèse de la mélatonine.....	22
Figure 2.	Amplitude de sécrétion de la mélatonine selon l'âge	23
Figure 3.	Métabolisme de la MLT.....	24
Figure 4.	La grande diversité des ligands des RCPGs et des voies de signalisation associées	25
Figure 5.	Modèle d'un récepteur couplé aux protéines G	26
Figure 6.	Classification GRAFS des RCPGs.	27
Figure 7.	Exemples de signalisations dépendantes et indépendantes des protéines G....	29
Figure 8.	Internalisation des RCPGs par la voie dépendante des β -arrestines et leur trafic dans la cellule.....	30
Figure 9.	Superposition des récepteurs MT ₁ et MT ₂ et leur séquence en acides aminés.	32
Figure 10.	Signalisation des MTRs et leur rôle dans les cellules β -pancréatiques murines	41
Figure 11.	Inhibition de la libération de dopamine par la mélatonine	50
Figure 12.	Synthèse et dégradation de la dopamine	52
Figure 13.	Mécanisme d'action du transporteur de la dopamine	57
Figure 14.	Effets de la cocaïne et de l'amphétamine sur le système dopaminergique..	62

Chapitre 2

Figure 1:	DAT is expressed in the striatum, hypothalamus and cortex and interacts with MT ₁ and MT ₂ in mice striatal synaptosomes.	92
Figure 2.	DAT interacts and colocalizes with MT ₁ and MT ₂ in transfected cells.	93
Figure 3.	MT ₁ and MT ₂ constitutively decrease DA uptake in HEK293T cells and striatal synaptosomes.	94
Figure 4.	MT ₁ and MT ₂ do not affect the affinity of DAT for DA but decrease DAT cell surface expression.	95
Figure 5.	Melatonin receptor KO mice are less sensitive to amphetamine than wild type mice.	96
Supplementary Figure 1.	Melatonin receptors decrease DA uptake.....	98

Supplementary Figure 2. DAT does not colocalizes with Golgi marker proteins in the presence of melatonin receptors..... 100

Supplementary Figure 3. Presence of 58K and calnexine in synaptosome preparation. ... 101

Chapitre 3

Fig. 1. Functional profiling of MT₂ variants for spontaneous receptor activity. 139

Fig. 2. MLT concentration-response curves for the MT₂-mediated signaling of variants representing each signaling profile. 140

Fig. 3. Relationships between spontaneous and MLT-induced MT₂ variant activation, between G protein– and β-arrestin2–dependent events, and between different G protein signaling events..... 141

Fig. 4. Graphical representation of the signaling signatures of MT₂ variants. 142

Fig. 5. Evolutionary Action analysis of MT₂ variants and correlation with signaling impairment. 143

Fig. S1. Screening for G proteins and detection of pathways activated by WT-MT₂. 145

Fig. S2. Predicted topology and distribution of the 40 MT₂ variants. 146

Fig. S3. Detection of MT₂ variants at the cell surface. 147

Fig. S4. MLT dose-response curves for Gαi1 and Gαz activation, β-arrestin2 recruitment, cAMP inhibition, and ERK activation by MT₂ variants..... 151

Fig. S5. G protein–dependent but β-arrestin–independent MLT-mediated ERK phosphorylation by MT₂. 152

Fig. S6. Correlations between the effects of the mutations on spontaneous and agonist-promoted activity for G proteins and β-arrestin signaling parameters performed pairwise. 153

Chapitre 4

Figure 1. WT-MT₁ activates Gαi/o, Gα12, Gα15 and recruits βarrestin-2. 171

Figure 2. MT₁ receptors cell surface expression. 172

Figure 3. Melatonin concentration-response curves for G protein activations and βarrestin-2 recruitment of the WT and representative receptor variants with distinct signaling profiles. 173

Figure 4. Radial graph representation of the different variant profiles compiled in 5 clusters. 175

Figure 5. MT₁ variant receptors bind to melatonin as well as the WT-MT₁, except P80L. 175

Figure 6. Evolutionary Action of MT ₁ variants and correlation with signaling impairment.	176
Figure 7. Three-dimensional representation of residues of interest within MT ₁ and β arrestin-2.	180
Supplementary figure 1. Melatonin concentration-response curves for G protein activations and β -arrestin 2 recruitment of the WT and the different variant profiles grouped in 5 clusters.	184
Supplementary figure 2. Radial graph representation of the different variant profiles grouped in 5 clusters.	186
Supplementary Figure 3. Snake plot representation of WT-MT ₁ with the position of the different variants.	187

Chapitre 5

Figure 1. Modèle de régulation du système dopaminergique par les récepteurs de la mélatonine.	193
Figure 2. Score d'effet phénotypique en fonction du score d'action d'évolution.	199
Figure 3. Variants MT ₁ et MT ₂ ayant un défaut de recrutement de la β arrestine-2.	201

VI. Liste des abréviations

3D : 3 Dimensions

3-MT : 3-méthoxytyramine

4P-PDOT : Cis-4-Phenyl-2-propionamidotetralin

AA-DC : Décarboxylase des acides aminés aromatiques

AA-NAT : Sérotonine N-acétyl transférase

AC : Adénylate cyclase

AD : Aldéhyde déhydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AMPH : Amphétamine

AP2 : Protéine adaptatrice 2

Arg : Arginine

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASMT : Acétyl sérotonine O-méthyltransférase

ATP : Adénosine triphosphate

ATV : Aire tegmentale ventrale

β arr : β arrestine

BRET : Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence

Ca : Calcium

CaMK : Protéine kinase Calcium/Calmoduline dépendante

CHO : Ovaires de hamster de Chine

Cl : Chlore

COMT : Catéchol-O-méthyltransférase

CREB : Protéine se fixant à l'élément de réponse à l'AMPc

CRISPR : Courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées

D1 : Récepteur 1 à la dopamine

D2 : Récepteur 2 à la dopamine

D3 : Récepteur 3 à la dopamine

D4 : Récepteur 4 à la dopamine

D5 : Récepteur 5 à la dopamine

DAG : Diacylglycérol

DAT : Transporteur de la dopamine
DBH : Dopamine bêta-hydroxylase
DDC : Dopa décarboxylase
DT2 : Diabète de type 2
DOPAC : Acide 3,4-dihydrophénylacétique
DOPAL : 3,4-Dihydroxyphényl-acétaldéhyde
DRD1 : Gène codant pour le récepteur 1 à la dopamine
DRD2 : Gène codant pour le récepteur 2 à la dopamine
DRD3 : Gène codant pour le récepteur 3 à la dopamine
DRD4 : Gène codant pour le récepteur 4 à la dopamine
DRD5 : Gène codant pour le récepteur 5 à la dopamine
EA : Action d'évolution
EC50 : Concentration efficace médiane
ECL : Boucle extracellulaire
ERK : Kinase régulée par des signaux extracellulaires
GDP : Guanosine diphosphate
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GTP : Guanosine triphosphate
GRAFS : Système de classification basé sur 5 familles nommées glutamate, rhodopsine, adhésion, "frizzled/taste2" et sécrétine
GRK : Kinases de RCPGs
H8 : Hélice 8
HEK : Cellules de rein d'embryon humain
HeLa : Lignée cellulaire issue de métastase prélevée chez Henrietta Lacks atteinte d'un cancer du col de l'utérus
HTRF : Fluorescence en temps résolu
HVA : Acide homovanillique
ICL : Boucle intracellulaire
IGF-R : Récepteur au facteur de croissance ressemblant à l'insuline
insulin growth factor receptor
INS1 : Lignée cellulaire dérivée des cellules β pancréatiques sécrétant l'insuline
IL-2 : Interleukine 2
IP3 : Inositol 1, 4, 5-triphosphate

IUPHAR : International Union of Basic and Clinical Pharmacology Database

K : Potassium

L-DOPA : Levodopa

MA : Maladie d'Alzheimer

MAO : Monoamine-oxydase

MAPK : Protéine Kinase activée par les mitogènes

MDMA : 3,4-Méthylènedioxy-N-méthylamphétamine

MEK : MAPK-kinase régulée par un signal extracellulaire

Mell1a : Gène codant pour le récepteur MT₁

Mell1b : Gène codant pour le récepteur MT₂

Mell1c : Gène codant pour le récepteur Mell1c

METH : Métamphétamine

MHPA : Méthoxy-4-hydroxyphénylacétaldéhyde

MLT : Mélatonine

MT₁ : Récepteur à la mélatonine de type 1

MT₂ : Récepteur à la mélatonine de type 2

MT₃ : Récepteur à la mélatonine de type 3

MTR : Récepteur à la mélatonine

MP : Maladie de Parkinson

Na : Sodium

NAc : Noyau accumbens

NIH3T3 : Lignée cellulaire de fibroblastes d'embryon de souris

NSC : Noyau suprachiasmatique

PDZ : Protéine de densité postsynaptique 95/Disque large/ Zona occludens 1

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PICK-1 : Protéine interagissant avec la kinase C 1

PKA : Protéine kinase A

PKB : Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PTX : Toxine Pertussis

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RE : Réticulum endoplasmique

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse

siARN : Petit acide ribonucléique interférent

SNC : Système nerveux central

TDAH : Trouble de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité

TH : Tyrosine hydroxylase

TPH : tryptophane hydroxylase

TM : Domaine transmembranaire

UVB : Ultraviolet B

VMAT : Transporteur vésiculaire des monoamines

VII. Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux Docteurs Ralf Jockers et Michel Bouvier pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et pour les conseils qu'ils m'ont prodigués au cours de ces quatre années de thèse. Ils m'ont permis de voir deux environnements de recherche différents mais liés par leur qualité d'exception. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon plus grand respect.

Je remercie le Docteur Mohammed Taouis qui me fait l'honneur de présider mon jury.

Toute ma gratitude au Docteur Jacques Pantel pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de mon jury.

Je remercie les Docteurs Stéphane Doly et Sylvain Chemtob d'avoir accepté d'être examinateurs au sein de mon jury.

Je remercie tout particulièrement la Docteure Angélique Levoye qui m'a enseigné la biologie moléculaire durant mon Master et qui m'a fait confiance en me mettant en contact avec les Docteurs Michel Bouvier et Ralf Jockers afin de mener cette thèse dans deux remarquables laboratoires. Merci également d'avoir accepté de juger ce travail et de siéger parmi les membres de mon jury.

Mes vifs remerciements à la Docteure Bianca Plouffe qui m'a énormément appris, conseillé et encouragé pendant mes deux années à Montréal. Nous avons traversé de nombreuses situations oppressantes et stressantes, mais tu m'as toujours permis de les traverser de la meilleure façon qui soit.

Je remercie l'ensemble des membres de mon équipe de Cochin, notamment mon voisin de bureau, Romain, qui a le chic pour prendre les mauvaises photos au mauvais moment, Clara (dit BritBrit) et Johanna les reines des larmes, Marine la Franco-Allemande, Atsuro et nos innombrables dimanches au labo avec le lunch "poulet rôti", Flo la mouk ma voisine et la reine du zouk, Delphine la chef des souris, Arturo le spanish, Julie mon acolyte du Québec, Angeliki et nos voisines de palier et partenaires de rock, Aurore et Cécile.

Je remercie de la même manière les membres de mon équipe de l'IRIC, et particulièrement Charlotte, Pierre et Justine pour comprendre les références françaises de mes blagues, Badr, Khadija, Nick, Ruth, Diego, Shane et Franziska pour nos nombreuses soirées animées afin de découvrir les charmes de Montréal, Christian, Mireille et André pour leurs conseils et bien sûr Monique pour avoir fait en sorte que tout se passe bien pendant mes deux années à Montréal malgré les déboires de l'immigration et de l'université; sans oublier Albert le mousquetaire et la troupe brésiliano-espagnole de l'IRIC.

Bien évidemment, je remercie ma famille, mes parents et mes 2 frères pour avoir soutenu mes ambitions, pour leurs encouragements et leur affection, nécessaires afin de ne pas craquer sous la pression de ces années de travail intense. Ma réussite vous revient en partie.

Chapitre 1

Introduction générale

I. Le système mélatonnergique

A. La mélatonine

1. Historique de la mélatonine

La mélatonine (MLT) fut découverte et isolée en 1958 par le dermatologue Aaron Lerner (1) lorsqu'il travaillait sur le vitiligo et qu'il tentait d'inhiber l'hyperpigmentation. Elle fut alors identifiée comme N-acétyl-5-méthoxytryptamine (2, 3). Les chercheurs ont ensuite découvert qu'elle permettait l'agrégation des granules de mélanine sur les mélanophores dermiques de la grenouille et qu'elle était sécrétée principalement pendant la nuit et provoquait la fatigue et le sommeil chez certains mammifères.

2. Synthèse et régulation de la mélatonine

a. Synthèse et libération de la mélatonine

La MLT, également appelée hormone du sommeil, est principalement synthétisée par les pinéaloctes localisés dans la glande pinéale des mammifères. Ces cellules utilisent l'acide aminé tryptophane pour le transformer dans un premier temps en 5-hydroxytryptophane par l'enzyme tryptophane hydroxylase (TH) puis en sérotonine grâce à l'enzyme décarboxylase des acides aminés aromatiques (AA-DC). Cette sérotonine est produite de manière constitutive dans le cerveau et transformée dans la glande pinéale pendant la nuit, en N-acétyl sérotonine (ou N-acétyl-5 hydroxytryptamine) par l'enzyme sérotonine N-acétyl transférase (AA-NAT). L'acétyl sérotonine O-méthyltransférase (ASMT) transforme finalement ce composé en MLT (ou N-acétyl-5 méthoxytryptamine) (Figure 1).

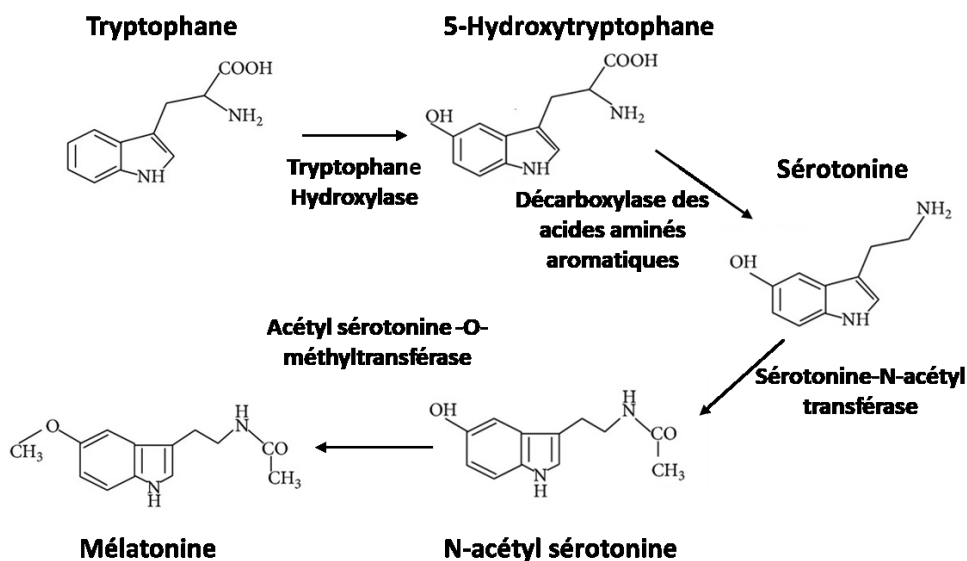


Figure 1. Synthèse de la mélatonine

Il est intéressant de noter que la synthèse de la MLT est faible durant la journée et élevée durant la nuit et se déroule de la même manière indépendamment si l'organisme est nocturne ou diurne. Ce rythme est imposé par l'alternance de lumière et d'obscurité, l'exposition à la lumière pendant la nuit supprimant sa production. Par ailleurs, il est observé que la durée et l'amplitude de la sécrétion par la glande pinéale sont directement liées à la durée de la période obscure (4). Aussitôt après sa synthèse, la MLT n'est pas stockée mais sécrétée dans le sang et le liquide céphalorachidien (5). La lumière perçue par la rétine déclenche un signal transmis au noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus (l'horloge biologique), lequel inhibe la transmission du signal à la glande pinéale. Durant la phase obscure, il y a levée de l'inhibition et libération de noradrénaline activant la synthèse de l'AA-NAT et générant ainsi le rythme nyctéméral (6-8).

Chez les personnes jeunes et d'âge moyen, la MLT est sécrétée de manière circadienne avec une grande amplitude et un pic maximal durant la nuit. Cette amplitude diminue néanmoins avec l'âge (Figure 2). La concentration en MLT sécrétée par les sites extrapinéaux oscille souvent avec de plus faibles amplitudes. Certains de ces sites sont très importants en terme de quantité, comme le tract gastrointestinal contenant plusieurs centaines de fois plus de MLT que la glande pinéale (9, 10), certaines parties du système nerveux central (SNC) (9, 11) ou encore les leucocytes (9).

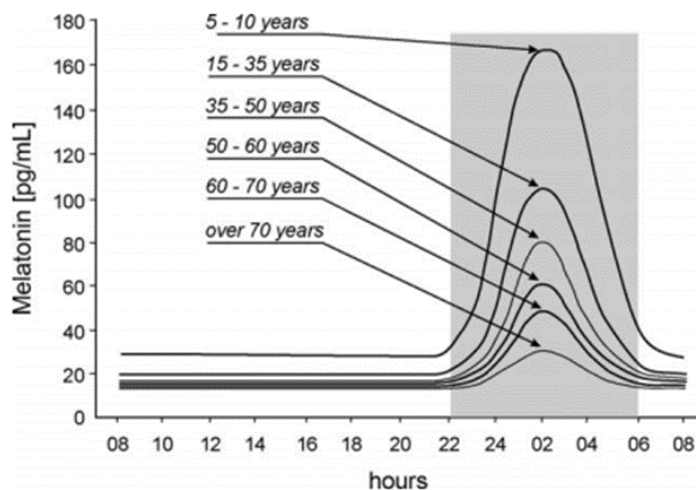


Figure 2. Amplitude de sécrétion de la mélatonine selon l'âge (D'après Karasek, 2004 (12)).

b. Le métabolisme de la mélatonine

Il existe plusieurs voies pour le métabolisme de la MLT (Figure 3).

La première est la voie principale qui a lieu dans le foie et élimine environ 80% de la MLT circulante. Dans les hépatocytes, la MLT est hydroxylée par le cytochrome P450 pour conduire à la 6-hydroxymélatonine qui est ensuite éliminée dans les urines par les reins après sulfo ou glucuroconjugaison (13) par la sulfotransférase ou l'UDP-glucuronosyl-transférase respectivement.

La deuxième voie est la voie kynurique. Elle consiste en l'ouverture du cycle indolique par des processus oxydatifs. Cette voie peut être spontanée sans nécessiter l'intervention d'une enzyme mais implique l'action de radicaux libres ou d'ultraviolet B (UVB) (14-17). Elle peut également se produire dans le cerveau et être due à l'action de l'indoléamine-2,3-dioxygénase qui permet la déformylation du composé par la myéloperoxydase pour donner le catabolite N-acétyl-5-méthoxykynurénamine (18, 19).

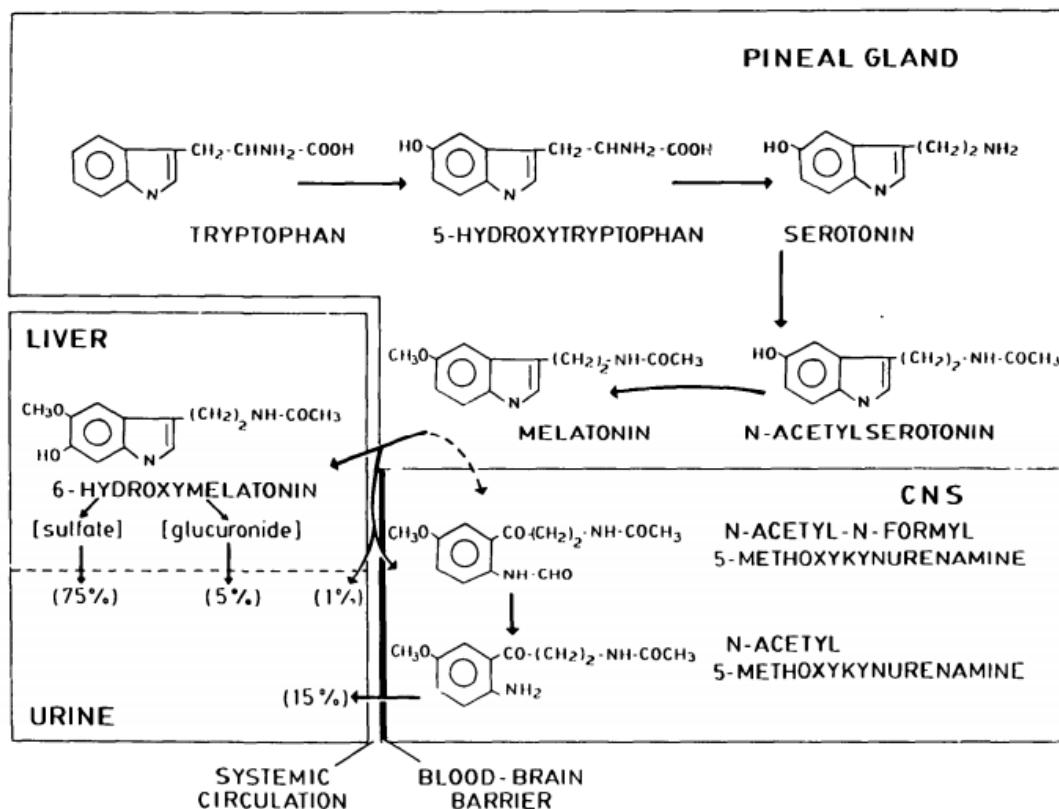


Figure 3. Métabolisme de la MLT (D'après Cardinali, 1981 (20))

B. Les récepteurs couplés aux protéines G

La majorité des actions et des effets de la MLT est transmise par ses récepteurs membranaires exprimés à la surface cellulaire et faisant partie de la superfamille des RCPGs.

1. Introduction des récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) forment le plus grand et le plus varié des groupes de récepteurs membranaires chez les eucaryotes. Ces récepteurs de surface cellulaire permettent la réception de nombreux messagers comme la lumière, des peptides, des lipides, des sucres ou encore des protéines. Ce genre de messager informe les cellules sur la présence ou l'absence de lumière et de nutriments nécessaires à la vie dans l'environnement ou alors transmettent des informations envoyées par d'autres cellules.

Les RCPGs jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques dans le corps humain et la compréhension de ces récepteurs a beaucoup affecté la médecine moderne. En effet, environ 30% des médicaments sur le marché sont des molécules liant les RCPGs.

Les RCPGs lient une grande variété de molécules de signalisation (Figure 4) mais ils partagent une architecture commune conservée tout au long de l'évolution. De nombreux eucaryotes actuels, incluant les animaux, les plantes, les champignons et les protozoaires, utilisent ces récepteurs afin de recevoir les informations de leur environnement. Par exemple, de simples eucaryotes comme les levures ont des RCPGs détectant le glucose et des facteurs de reproduction. Les RCPGs sont également impliqués dans de nombreuses autres fonctions dans les organismes pluricellulaires. Les humains à eux seuls ont environ 1000 RCPGs différents.

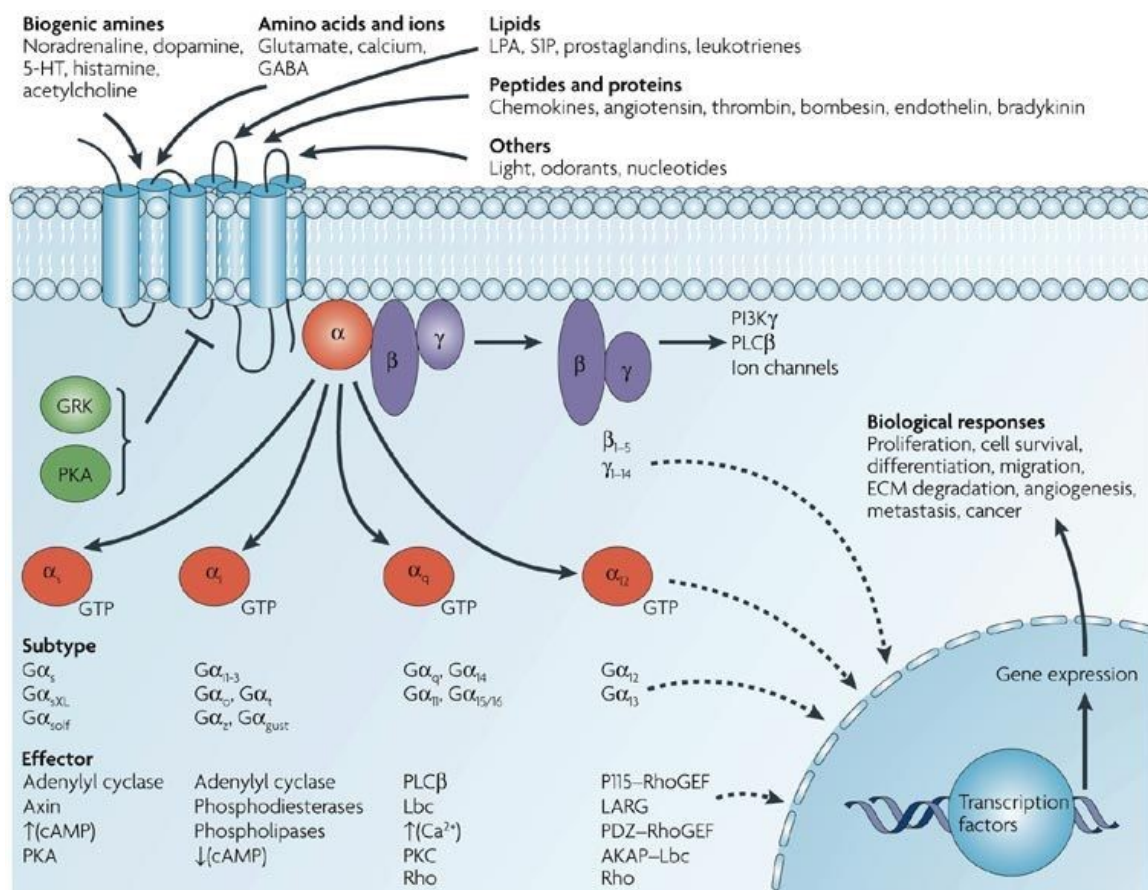


Figure 4. La grande diversité des ligands des RCPGs et des voies de signalisation associées. (D'après Dorsam, 2007 (21))

2. Structure et classification des RCPGs

Les RCPGs sont des polypeptides en conformation globulaire incrustés dans la membrane plasmique. Sept segments de ces protéines traversent entièrement la membrane (Figure 5), expliquant pourquoi les RCPGs sont également appelés ‘‘récepteurs à 7 domaines transmembranaires’’ qui sont reliés entre eux par des boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3) et extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3). Les boucles extracellulaires et les domaines transmembranaires forment la poche liant les ligands. Les RCPGs modulent une grande diversité de processus physiologiques et les mutations dans les gènes codant pour ces récepteurs sont impliquées dans de très nombreuses maladies.

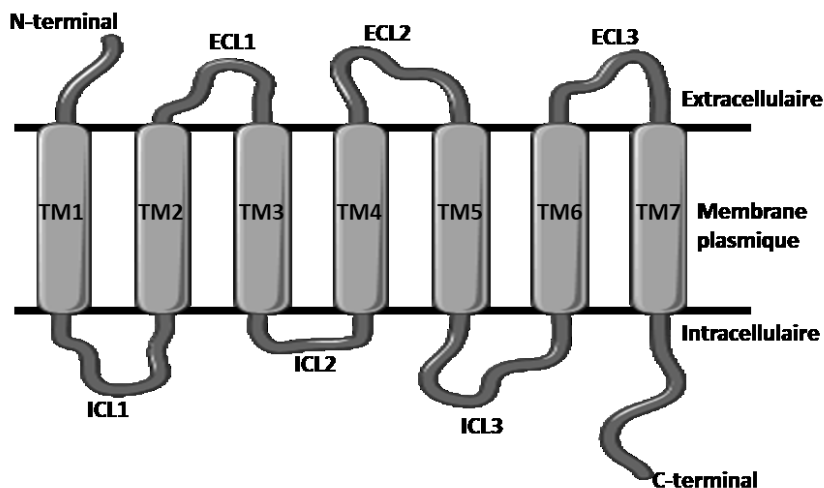


Figure 5. Modèle d'un récepteur couplé aux protéines G

Plusieurs systèmes de classification ont été utilisés afin de décomposer cette superfamille. Certains systèmes ont regroupé les récepteurs selon la manière dont le ligand lie son récepteur et d'autres ont utilisé leurs caractéristiques physiologiques et structurales. Un des systèmes les plus fréquents est le système utilisant les classes A, B, C, D, E et F avec des sous-classes utilisant les chiffres romains (22, 23). Ce système couvre l'ensemble des RCPGs à la fois chez les vertébrés et chez les invertébrés. Plus tard, Robert Fredriksson classifia les différents RCPGs en 5 familles nommées glutamate, rhodopsine, adhésion, ‘‘frizzled/taste2’’ et sécrétine formant le système de classification GRAFS (24), la famille de la rhodopsine étant la plus grande et comprenant les récepteurs MT₁ et MT₂ (Figure 6).

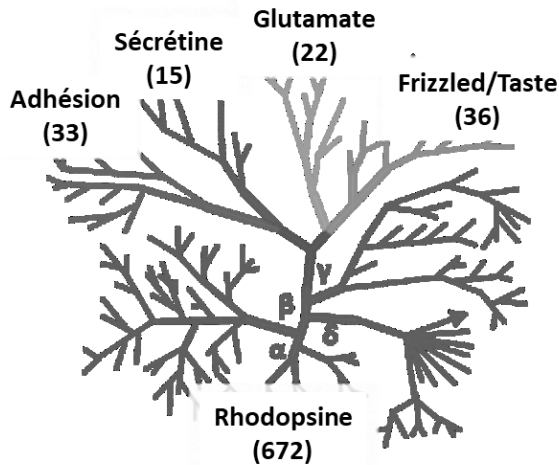


Figure 6. Classification GRAFS des RCPGs.

3. Signalisations protéines G dépendantes et indépendantes

Comme leur nom l'indique, les RCPGs interagissent avec les protéines G au niveau de la membrane plasmique. Lorsqu'un agoniste se lie à un RCPG, cela entraîne un changement conformationnel du récepteur entraînant des interactions avec les protéines G à proximité. Les protéines G sont des protéines spécialisées avec la capacité de lier la guanosine triphosphate (GTP) et la guanosine diphosphate (GDP). Les protéines G s'associent avec les RCPGs sont hétérotrimériques et contiennent donc trois sous unités différentes : une sous unité alpha, une bêta et une gamma (Figure 4). Les sous unités alpha et gamma sont liées à la membrane plasmique par des ancrages au niveau des lipides. La sous unité alpha peut lier le GTP ou le GDP dépendamment de sa conformation active (GTP) ou inactive (GDP) (25). En absence de signal, le GDP est lié à la sous unité alpha et ce complexe est lui-même lié au RCPG. Cette conformation persiste jusqu'à ce qu'une molécule de signalisation se lie au RCPG. A ce moment, un changement conformationnel du récepteur active la protéine G et le GDP de la sous unité alpha est physiquement remplacé par le GTP entraînant la dissociation du complexe hétérotrimérique en deux parties : la sous unité alpha liée au GTP et le dimer bêta-gamma (26). Ces deux parties restent ancrées à la membrane plasmique mais elles ne sont plus liées au RCPG leur permettant d'interagir avec d'autres protéines membranaires. Les protéines restent actives tant que la sous unité est liée au GTP. Néanmoins, lorsque ce GTP est hydrolysé en GDP, les sous unités reprennent leur forme inactive de trimère et le complexe se réassocie au RCPG devenu lui aussi inactif (27). De

cette manière, les protéines G fonctionnent à la manière d'un interrupteur qui s'active et se désactive à la réception de molécules de signalisation interagissant avec le RCPG.

Quel que soit le moment, une sous unité alpha liée au GTP ou encore un dimer bêta-gamma peuvent activer d'autres protéines membranaires impliquées dans la voie de signalisation. Les cibles spécifiques des protéines G incluent différentes enzymes qui produisent différents messagers secondaires comme certains canaux ioniques qui permettent aux ions d'agir en tant que messagers secondaires. Certaines protéines G stimulent l'activité de ces cibles, alors que d'autres vont les inhiber (28, 29).

L'activation d'une seule protéine G peut affecter la production de centaines de seconds messagers comme l'AMP cyclique (AMPc), le diacylglycérol (DAG), l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP3), qui coordonnent les voies de signalisation intracellulaires (28, 29). Une cible fréquente des protéines G activées est l'adénylate cyclase, une enzyme associée à la membrane qui, lorsqu'elle est activée, catalyse la synthèse du second messenger AMPc à partir d'ATP. Chez l'être humain, l'AMPc est notamment impliqué dans la réponse aux stimuli sensoriels, aux hormones ou encore à la transmission nerveuse.

La phospholipase C est une autre cible courante des protéines G activées. Cette enzyme associée à la membrane catalyse la synthèse de deux messagers secondaires, le DAG et l'IP3 à partir du phosphatidyl inositol (30). Cette voie particulière est nécessaire dans de nombreux processus du corps humain.

4. Mécanismes d'internalisation et de trafic

La capacité à réguler les interactions entre les cellules et leur environnement extracellulaire est essentielle pour la maintenance des fonctions physiologiques appropriées. Pour les RCPGs, cette régulation se produit à travers de multiples mécanismes permettant un contrôle spatial et temporel de la transduction du signal (31). Un des mécanismes principaux de la régulation des RCPGs implique le trafic endocytaire qui permet l'internalisation des récepteurs depuis la membrane plasmique atténuant ainsi la signalisation dépendante des protéines G (32, 33). Il y a de plus en plus de preuves que les RCPGs peuvent signaler de manière indépendante aux protéines G (Figure 7) et depuis les compartiments intracellulaires, dont les endosomes (34, 35). Dans ce contexte, l'internalisation des récepteurs et le trafic intracellulaire attirent de plus en plus l'intérêt des chercheurs.

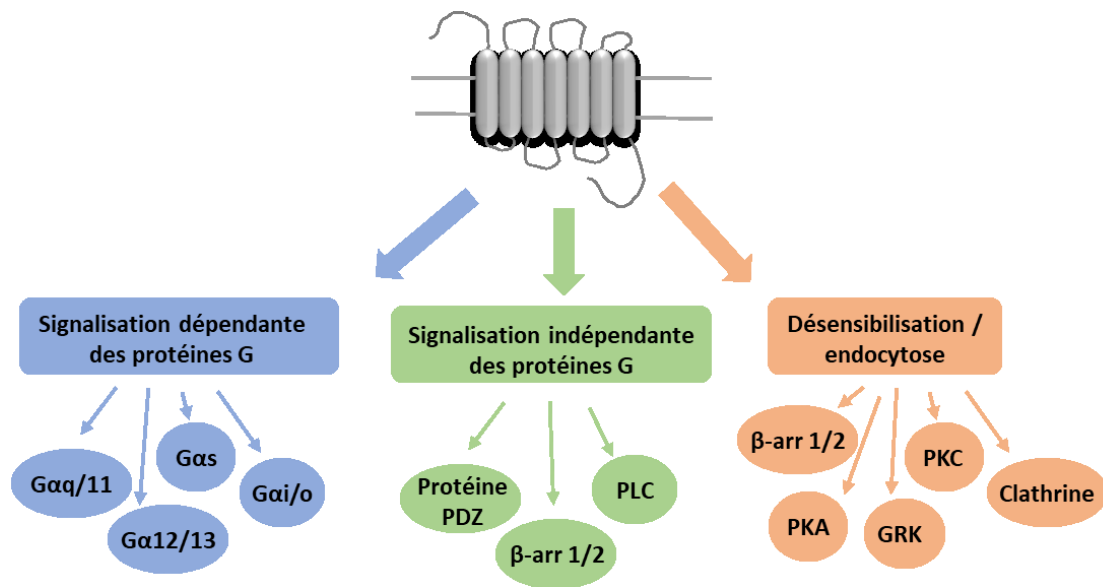


Figure 7. Exemples de signalisations dépendantes et indépendantes des protéines G

Le modèle principal de la signalisation des RCPGs postule que, suite à la stimulation par l'agoniste du RCPG et à la génération du second messager, la protéine G est physiquement découplée du récepteur afin d'éviter les effets négatifs d'une stimulation prolongée du récepteur dans la cellule. Ce processus de désensibilisation du RCPG est principalement initié par les kinases de RCPGs (GRKs) (36) et d'autres kinases qui phosphorylent les résidus sérine et thréonine situés dans les boucles intracellulaires et au niveau C-terminal des récepteurs activés (Figure 8). Les récepteurs phosphorylés vont alors recruter les protéines β -arrestines situées dans le cytoplasme vers la membrane plasmique, entraînant la fin de la signalisation dépendante des protéines G. A son tour, la β -arrestine peut agir comme protéine d'échafaudage pour recruter de nouvelles protéines qui vont médier d'autres cascades de signalisation comme celles impliquées dans la signalisation des kinases comme ERK1/2, ou encore celles impliquées dans l'internalisation du récepteur par l'endocytose.

La voie la mieux décrite pour l'internalisation des RCPGs implique la liaison de la clathrine et de sa protéine adaptatrice (AP2) au récepteur lié à la β arrestine (37-41). Les récepteurs sont alors internalisés via des vésicules entourées de clathrine vers les endosomes, d'où ils seront dirigés vers les lysosomes pour la dégradation ou recyclés vers la membrane plasmique (42, 43). Ces études ont engendré un système de classification basé sur les différences d'affinités pour les isoformes d'arrestines (44). D'après ce système, les RCPGs

de classe A lient préférentiellement et de manière transitoire la β arrestine-2 et sont rapidement déphosphorylés et recyclés. Au contraire, les récepteurs de classe B lient les β arrestines-1 et -2 avec une affinité similaire et forment des complexes stables entraînant leur rétention, leur recyclage et leur dégradation (45).

Étant donné la taille de la famille des RCPGs, il n'est pas étonnant que certains récepteurs ne suivent pas la voie d'endocytose classique de β arrestine-AP2-clathrine. Par exemple, certains récepteurs interagissent directement avec AP2 par leur partie C-terminale, ce qui permet leur interaction directe avec les puits recouverts de clathrine (46-49). D'autres récepteurs peuvent également être internalisés via des voies d'endocytose alternatives (50). Ces mécanismes impliquent des microdomaines spécifiques de la membrane, comme les radeaux lipidiques ou les cavéoles. Bien que ces voies d'endocytose soient moins bien comprises, de nombreux récepteurs ont été reportés comme étant associés aux cavéolines (51-54). Plus récemment, une nouvelle voie d'endocytose a été identifiée comme étant dépendante de la protéine endophiline (55, 56).

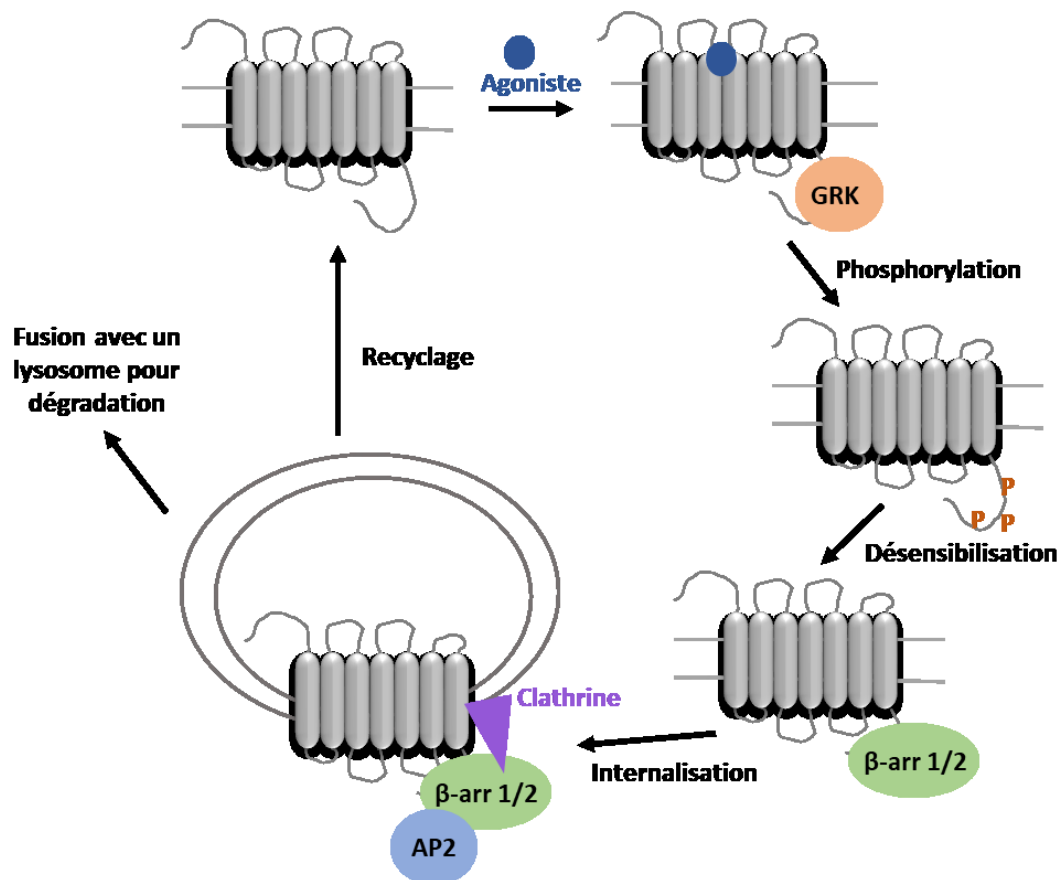


Figure 8. Internalisation des RCPGs par la voie dépendante des β -arrestines et leur trafic dans la cellule.

5. Signalisation biaisée

La reconnaissance que les RCPGs puissent signaler via des voies dépendantes ou indépendantes des protéines G a été importante. Dans la continuité de ce concept, la capacité d'un ligand à activer préférentiellement une voie de signalisation plutôt qu'une autre est de plus en plus étudiée. C'est ce qu'on appelle la signalisation biaisée (57) ou la sélectivité fonctionnelle. Avec la perspective attrayante de favoriser l'activation de voies de signalisation favorables plutôt que non favorables ou nocives, les agonistes biaisés pourraient s'avérer être des molécules thérapeutiques prometteuses. En effet, des composés biaisés ont déjà été développés par exemple pour le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (58) ou le récepteur μ -opioïde (59). Cette voie de recherche reste très prometteuse pour l'avenir dans le domaine des RCPGs (60).

C. Les récepteurs de la mélatonine

1. Découverte des récepteurs de la mélatonine

La majorité des actions de la MLT sur la cellule sont exercées grâce à ses 2 récepteurs membranaires MT₁ et MT₂. Ces 2 récepteurs partagent 55% d'homologie et 70% dans les domaines transmembranaires (Figure 9) et sont exprimés en faible quantité dans de nombreux organes et types cellulaires (61) excepté dans l'hypophyse pars tuberalis, impliqué dans la transmission des effets saisonniers, où le récepteur MT₁ est présent en plus grande quantité (62, 63).

Initialement, les études de caractérisation des sites de liaison de la MLT utilisaient la forme tritiée ([³H]-MLT) comme radioligand marqué permettant ainsi de localiser des sites de liaison dans de nombreux tissus notamment au niveau du cerveau de bovin (64) ou de la rétine du lapin (65). L'introduction en 1984 d'un nouveau ligand radioactif, la 2-[¹²⁵I]-iodo MLT (66), qui présente par rapport à la [³H]-MLT une meilleure stabilité a permis de localiser et de caractériser divers sites mélatoninergiques dans des tissus neuronaux et non neuronaux (67). Deux types de sites ont été découverts : un de forte affinité (pM) appelé ML1 et un de faible affinité (nM) appelé ML2 (68).

En 1994, l'équipe de Reppert a cloné le premier récepteur mélatoninergique de type ML1 chez le Xénope (69). Deux autres sous types de ML1 furent clonés chez l'homme. Les

récepteurs humains sont alors appelés Mel1a, Mel1b alors que le récepteur du Xénope est appelé Mel1c (7, 8). En 1998 la nomenclature internationale IUPHAR désigne Mel1a par MT₁ et Mel1b par MT₂. Le site de faible affinité ML2 prend le nom de MT₃ alors que le site Mel1c qui n'a pour l'instant pas été mis en évidence chez les mammifères conserve son appellation originale (70).

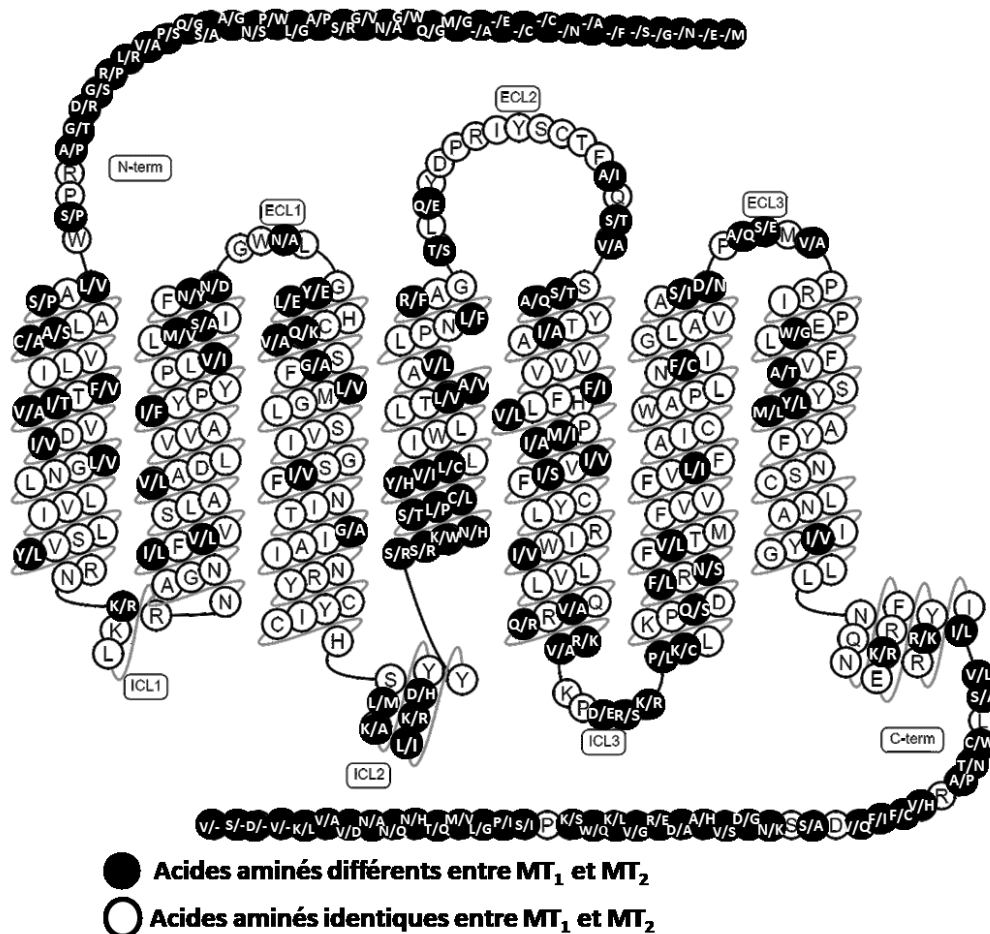


Figure 9. Superposition des récepteurs MT₁ et MT₂ et leur séquence en acides aminés.

2. Structure des récepteurs de la mélatonine

La prédiction de la structure tridimensionnelle (3D) des récepteurs de la MLT (MTRs) représente une issue complexe, notamment avec le manque de modèles de structure ou le

manque de motifs validés d'interactions entre le ligand et le récepteur. La première issue est relative aux disparités entre le nombre de séquences de RCPGs et le nombre de structures validées. Les structures des RCPGs découvertes par les rayons X couvrent seulement une faible partie des 800 séquences de RCPGs identifiées dans le génome humain. Comme conséquence, des modèles proches sont disponibles seulement pour un petit groupe de récepteurs, alors que la majorité des RCPGs doit encore être modélisée de manière personnalisée en assemblant différentes parties de modèles validés. Des études récentes sur l'homologie des modèles de RCPGs montrent clairement que la ressemblance entre un modèle de récepteur et le récepteur d'intérêt dépend fortement de leur degré d'identité. Par conséquent, lorsque la structure d'un RCPG est déterminée par modélisation par rapport à une séquence identique entre 30% et 35%, elle est considérée comme étant fiable. Les récepteurs MT₁ et MT₂ partagent une homologie de séquence inférieure à 30% avec les RCPGs cristallisés, ce qui rend leur modélisation possible mais difficile. Plusieurs modèles 3D de MT₁ et MT₂ ont déjà été proposés et différents modes de liaison à différents ligands ont été proposés. La plupart de ces modèles de récepteurs ont été construits avant 2007 lorsque la première structure rayons-X du RCPG activé β 2-adrénérique fut découverte. En conséquence, la majorité de ces modèles ont été construits à partir de la structure de la rhodopsine bovine qui était le seul modèle validé. Seulement récemment, des modèles par homologie ont été construits basés sur les nouvelles structures aux rayons X de récepteurs aminergiques ou de structures de RCPGs cristallisés dans leur forme activée. Les avancées récentes en informatique ainsi que le nombre croissant d'informations sur les différents ligands permettent de prédire les relations entre structure et activité. De plus, les modèles de récepteurs basés sur les mutations ont été appliqués à la fois pour décrire la liaison du ligand au niveau moléculaire ou pour évaluer la sélectivité de certains ligands (71, 72).

Malgré de grands progrès ces dernières années dans le domaine de la biologie structurale des RCPGs, la modélisation des MTRs est toujours considérée comme un challenge (73-75). Néanmoins, les simulations de modélisation sur de plus longues périodes ont montré leur intérêt dans les systèmes membrane-récepteurs, permettant un raffinement supplémentaire de la structure modélisée du récepteur et apportant la possibilité de décrire les changements conformationnels se produisant lors de la liaison du ligand (76).

3. Localisation tissulaire des MTRs

a. Les MTRs dans la rétine

Chez les mammifères le système de régulation du rythme circadien facilite l'adaptation de l'organisme aux changements environnementaux à travers la régulation des processus physiologiques. La synchronisation de l'horloge circadienne endogène à la période de 24h est possible grâce à la combinaison des actions internes, comme la production de la MLT et des stimuli externes comme la lumière (77) qui est perçue par la rétine puis transmise au noyau suprachiasmatique (78). Chez les mammifères, la rétine produit de la MLT localement et exprime les récepteurs MT₁ et MT₂ (79, 80). Il a notamment été montré que même après une pinéalectomie, la rétine de rat continue de produire de la MLT de manière circadienne (81). La mélatonine influence également l'électrorétinogramme lui suggérant un rôle dans la régulation du rythme jour/nuit de l'activité de la rétine (82, 83).

Outre son implication dans la régulation de l'horloge circadienne rétinienne, un des rôles majeurs de la MLT dans la rétine est son action sur le système dopaminergique. Plusieurs études ont montré que la MLT et la dopamine avaient des rôles opposés sur la physiologie de la rétine (84). La MLT permet l'adaptation de la rétine à la nuit, alors que la dopamine lui permet de s'adapter à la lumière. La MLT inhibe la libération de la dopamine de manière dépendante au calcium par l'activation de ses récepteurs au niveau présynaptique (85). Dubocovich a également montré que le luzindole et d'autres inhibiteurs sélectifs du récepteur MT₂ bloquaient l'inhibition de la libération de la dopamine causée par la MLT démontrant l'implication du récepteur MT₂ dans ce processus (85). Le rythme circadien de la libération de la dopamine semble ainsi être dépendant du système mélatoninergique.

Les ligands ciblant les MTRs n'étant pas très spécifiques de l'un ou l'autre des récepteurs, une des techniques utilisées afin de connaître le rôle d'un récepteur sur le phénotype des souris est d'utiliser des modèles murins génétiquement modifiés n'exprimant pas le récepteur d'intérêt. Dans le cadre des MTRs, plusieurs études ont déjà utilisé ces modèles déficients en MT₁ et/ou MT₂ afin de connaître les effets sur la physiologie de la souris.

Au niveau de la rétine, des études ont montré que les souris déficientes en MT₁ ou en MT₂ avaient les mêmes effets dans cet organe, à savoir, son activité ne suit plus un rythme

circadien (86, 87). En plus de ce dérèglement, les ganglions rétiniens et les photorécepteurs des souris déficientes en MT₁ se dégraderaient plus rapidement avec l'âge (88).

b. Les MTRs dans le cerveau

Grace à son caractère amphiphile, la mélatonine peut facilement traverser la barrière hémato-encéphalique (89) lui permettant ainsi de pénétrer dans le cerveau. Mais il reste difficile de connaître à quel point la MLT exogène est importante pour le cerveau puisque celui-ci produit également de la mélatonine. En effet, l'enzyme limitante à la synthèse de mélatonine, l'AA-NAT, est également exprimée dans plusieurs parties du cerveau comme l'hypothalamus, le cervelet, le bulbe olfactif, le cortex préfrontal, l'hippocampe ou encore le striatum. Mais s'il est clair que l'hypothalamus produit la mélatonine, il n'est pas encore évident que tous les autres sites soient réellement capables de produire cette hormone. Il a également été reporté que les MTRs sont présents en plus ou moins grandes quantités dans de nombreuses parties du cerveau de mammifères (Tableau 1). Dans le noyau suprachiasmatique (NSC) par exemple, situé dans l'hypothalamus, ces récepteurs sont très exprimés. La grande sensibilité du NSC à la signalisation mélatoninergique est d'une grande importance physiologique puisqu'il s'agit de la base pour le réajustement du rythme circadien par le signal jour/nuit, un effet qui a ensuite de grandes répercussions dans le corps et est également responsable de la diminution d'activité des neurones en réponse à la MLT. Il a notamment été démontré que, chez les souris déficientes en MT₁, la MLT n'induisait plus de diminution d'activité neuronale mais elle permettait toujours de réguler le rythme circadien (90), suggérant que MT₂ serait responsable de ce phénomène. Au contraire, les souris déficientes en MT₂ ont montré une activité neuronale induite par la MLT normale (91). Quelques études ont également rapporté la présence de MTRs dans le cortex, notamment MT₁ qui serait présent en plus grande quantité que MT₂ (92). Néanmoins, le rôle des MTRs dans le cortex n'est pas clair. Dans le mésencéphale, MT₁ et MT₂ ont été identifiés dans le striatum et la substance noire (92-94) qui jouent des rôles importants pour les mouvements du corps. Ces 2 régions sont connectées par la voie nigro-striée, l'une des voies dopaminergiques les plus importantes du cerveau. La présence des MTRs dans ces régions suggère ainsi un rôle dans le mouvement, notamment en agissant sur le système dopaminergique (95). Cet aspect est renforcé par le fait que la sous-expression des MTRs a pu être observée chez des patients parkinsoniens (96) ayant par conséquent des troubles du mouvement.

Brain regions	Type of melatonin receptor	Origin and references
Retina	MT1, MT2	Rat (Fujieda et al. 1999; Sallinen et al. 2005; Yang et al. 2011) Guinea pig (Fujieda et al. 2000) Human (Meyer et al. 2002; Reppert et al. 1995; Savaskan et al. 2002b, 2007; Scher et al. 2002)
Cerebral cortex	MT1, MT2	Mouse (Adamah-Biassi et al. 2014) Rat (Lacoste et al. 2015; Musshoff et al. 2002) Human (Mazzucchelli et al. 1996; Uz et al. 2005; Savaskan et al. 2002a, 2005)
Reticular thalamic nucleus	MT2	Rat (Lacoste et al. 2015)
Habenula	MT1	Mouse (Adamah-Biassi et al. 2014) Rat (Lacoste et al. 2015)
Hypothalamus	MT1, MT2	Rat (Hunt et al. 2001; Lacoste et al. 2015; Neu and Niles 1997; Poirel et al. 2002; Sallinen et al. 2005; Sugden et al. 1999; Waly and Hallworth 2015) Human (Weaver and Reppert 1996; Weaver et al. 1993; Wu et al. 2006, 2013)
Pituitary gland	MT1	Rat (Lacoste et al. 2015; Klosen et al. 2002) Human (Weaver et al. 1993; Wu et al. 2006)
Periaqueductal gray	MT1, MT2	Mouse (Adamah-Biassi et al. 2014) Rat (Lacoste et al. 2015; Lopez-Canul et al. 2015b)
Dorsal raphe nucleus	MT1	Rat (Lacoste et al. 2015)
Midbrain	MT1, MT2	Rat (Lacoste et al. 2015) Human (Uz et al. 2005; Adi et al. 2010; Uz et al. 2003)
Cerebellum	MT1, MT2	Mouse (Adamah-Biassi et al. 2014) Rat (Lacoste et al. 2015) Human (Mazzucchelli et al. 1996; Al-Ghoul et al. 1998)

Tableau I. Présence des récepteurs de la mélatonine dans différentes parties du cerveau de mammifères (D'après Ng et al. 2017 (97)).

Néanmoins, chacune des méthodes utilisées pour détecter les MTRs a ses propres limites. En effet, dans les années 90 la principale technique utilisée était la liaison non sélective du radioligand 2-[125I]Iodomélatonine aux récepteurs MT₁ et MT₂ (98, 99). Mais cette technique n'est pas très sensible et incapable de dissocier le récepteur MT₁ du MT₂. Plus récemment, d'autres techniques ont été développées, notamment l'immunodétection, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) ou encore l'hybridation in-situ qui s'avèrent être plus précises, même si le développement d'anticorps fiables et spécifiques reste crucial pour la détection de ces 2 récepteurs.

De manière générale, les MTRs présents dans le cerveau (100) régulent le cycle circadien, inhibent l'activité cérébrale en initiant le sommeil et agissent sur le système dopaminergique. De plus, dans le SNC, la mélatonine a également un effet neuroprotecteur grâce à son caractère anti-oxydant et agit contre la neurodégénérescence, l'apoptose et l'ischémie (101), favorise la formation de dendrites (102) et stimule la neurogénèse (103).

c. Les MTRs dans le pancréas

Les premières informations concernant la présence du récepteur MT₁ dans les ilots pancréatiques de rats nouveaux-nés ont été publiées en 2000 (104) puis en 2002 (105, 106). Certains des effets biologiques de la MLT sont réalisés grâce à ses 2 récepteurs spécifiques et de haute affinité présents dans les ilots pancréatiques et qui peuvent être bloqués par le luzindole. Afin de localiser de potentiels MTRs dans les ilots du pancréas, des études autoradiographiques ont été réalisées. Ces investigations ont montré une liaison spécifique de la 2-[125I]iodomélatonine dans les ilots pouvant être inhibée en présence de MLT non radiomarquée (104). De la même manière, les résultats de RT-PCR utilisant des amorces spécifiques du récepteur MT₁ de rat ont révélé la présence d'ARNm de ce récepteur dans les tissus pancréatiques de rats nouveaux nés (104) et dans des cellules INS1 d'insulinome de rat (105). Plusieurs années plus tard, le récepteur MT₂ fut également détecté dans les ilots pancréatiques de rat et dans les cellules β (107, 108). Il a également été montré que les niveaux d'ARNm de ces récepteurs étaient plus élevés chez les patients DT2 (108). Bien que la MLT soit considérée comme une molécule lipophile, les chercheurs s'accordent à dire que cette molécule médie ses effets en activant les récepteurs exprimés à la surface des cellules de mammifères (7, 8). Alors que la présence d'ARNm de MT₁ dans les ilots pancréatiques de rats ait été établie relativement tôt, la présence d'ARNm de MT₂ est devenue évidente que bien plus tard, due à ses faibles quantités produites (107-112).

Depuis quelques années, plusieurs études d'associations pangénomiques dans plusieurs populations ont révélé que des variations génétiques des récepteurs MT₁ et MT₂ sont associées à un plus grand risque de développer des perturbations du métabolisme du glucose (109, 110, 112-114). Cette association peut être expliquée par l'inhibition de la production d'insuline par la MLT et ses récepteurs, mais également par l'augmentation de la sécrétion du glucagon par la MLT dans les cellules α pancréatiques (115).

La MLT est sécrétée durant la nuit chez tous les mammifères, ce qui conduit à quelques incertitudes sur son rôle sur la sécrétion d'insuline ou de glucagon chez les animaux diurnes et nocturnes. Mais comme la MLT augmente les effets du glucagon dans les ilots de rat, de souris et d'humain (115-118), cela semble indiquer que la MLT joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie glucidique chez les mammifères. Globalement, les données existantes montrent clairement que la MLT agit de manière stimulante à la fois sur la sécrétion du

glucagon par les cellules α pancréatiques et sur l'action du glucagon hépatique. De plus, les données sur les rats atteints de diabète de type 2 (DT2) indiquent des modifications de ces effets lors du développement du diabète (118). Il est bien connu que des problèmes de rythme circadien causés par des problèmes de sommeil ou de travail à horaires décalés sont associés à un risque accru de tolérance au glucose et de développement de DT2 (119, 120). De plus, il a été observé que des patients diabétiques ont également des niveaux faibles de MLT pouvant affecter la fonction du pancréas (121, 122). Les cellules des îlots pancréatiques humains et murins ont également une activité circadienne (123-125). Ce concept donne de l'importance à la présence d'une régulation circadienne des fonctions du pancréas. L'analyse de la MLT sur les îlots pancréatiques par immunoprécipitation et immunotransfert ont montré que la MLT régule la croissance et la différenciation des cellules pancréatiques en stimulant la phosphorylation du récepteur IGF-R (insulin growth factor receptor) et des récepteurs à l'insuline (126). Ces actions activent deux voies de signalisation intracellulaires : PI3K/AKT, impliquée dans le métabolisme cellulaire, et MEK/ERK, impliquée dans la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaires (126). De plus, la baisse des niveaux de MLT augmente la sécrétion d'insuline chez le rat pendant la journée alors que pendant la nuit, des bas niveaux en insuline ainsi que des hauts niveaux de glucose ont été enregistrés lorsque les niveaux de MLT étaient élevés (127, 128).

Quelques études utilisant des souris déficientes en MTRs ont également été utilisées afin de mieux comprendre le rôle de la mélatonine sur la sécrétion d'insuline et du glucagon régulant l'homéostasie glucidique. Les études ont ainsi montré que les souris déficientes en MT_1 souffraient d'hyperglycémie, d'intolérance au glucose et de résistance à l'insuline comparativement aux souris sauvages et déficientes en MT_2 (114) (129). En revanche, ce sont les îlots pancréatiques de souris déficientes en MT_2 et $MT_{1/2}$ qui ont une diminution de la sécrétion basale de glucagon en présence de MLT comparativement aux souris sauvages et déficientes en MT_1 (130).

d. Les MTRs dans le système immunitaire

En 1975 Csaba et Barath (131) ont montré que la pinéalectomie entraînait une involution thymique et supprimait l'immunité. Ils établissaient alors une relation entre la glande pinéale et le système immunitaire. Chez certains mammifères les fonctions immunitaires suivent des rythmes saisonniers avec une augmentation durant les jours courts, au moins au laboratoire, concordant avec les durées de sécrétion de la MLT (132). La MLT est synthétisée dans les

lymphocytes humains suggérant un rôle autocrine et/ou paracrine de ces cellules (133). De plus, la MLT exogène semble stimuler le système immunitaire à la fois lors d'expériences *in vitro* et *in vivo* (134). Les récepteurs membranaires de la MLT sont exprimés dans les cellules lymphoïdes et sont impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (134, 135). L'antagoniste des MTRs, le luzindole, a été capable de diminuer significativement l'augmentation de la prolifération des lymphocytes de souris médiée par la MLT (136). La MLT réduit l'inflammation chez le rat en inhibant les leucocytes dans la microvasculature à travers l'activation des récepteurs MT₂ (137). Chez l'humain, la MLT produite par les lymphocytes régule la réponse immunitaire en induisant la production d'IL-2 et de récepteurs à l'IL-2 (133, 138). De manière intéressante, les rythmes journaliers de production de MLT et d'IL-2 sont perdus chez l'homme dans des conditions inflammatoires non infectieuses puis, lors du retour à la normale du rythme de la MLT, le rythme de l'IL-2 revient à la normale à son tour (139).

4. Régulation de l'expression des MTRs

L'étude de Gerdin (140) démontre que des concentrations physiologiques de MLT imitant la hausse nocturne *in vivo*, désensibilisent les récepteurs MT₂ endogènes exprimés dans le NSC de rat ainsi que dans des cellules CHO exprimant les récepteurs MT₂, possiblement par leur internalisation. Suite à la liaison de la MLT, cette internalisation des récepteurs MT₂ exprimés dans les cellules de mammifère est dépendante de la durée et de la concentration en MLT contribuant ainsi à la spécificité temporelle de cette hormone à réguler les rythmes circadiens. Cette diminution du nombre de récepteurs MT₂ est compensée en partie par les nouveaux récepteurs synthétisés par la cellule suggérant que certains des récepteurs internalisés sont ciblés pour la dégradation alors qu'une autre portion est dirigée vers la voie de recyclage.

En plus de désensibiliser les récepteurs MT₂, il a également été observé qu'un prétraitement à la MLT désensibilisait les récepteurs MT₁ dans les cellules pars tuberalis (141), dans les cellules CHO (142, 143) ou dans les cellules NIH3T3 (144) transfectées avec le récepteur MT₁ humain.

Ainsi, ces études suggèrent qu'à la suite de la production nocturne de MLT et donc à la stimulation de ses récepteurs, ces derniers sont internalisés entraînant une désensibilisation

à cette hormone. Le nombre de récepteurs à la surface cellulaire revient graduellement à la normale au fur et à mesure que les récepteurs sont recyclés et synthétisés par la cellule.

5. Signalisation des MTRs

a. Signalisation du récepteur MT₁

Par l'activation du récepteur MT₁, la MLT provoque de multiples réponses cellulaires grâce à l'activation des protéines G sensibles (G α i2 et G α i3) ou insensibles au PTX (G α q/11) (Figure 10) (145, 146). L'activation du récepteur MT₁ inhibe la formation d'AMPc stimulée par la forskoline (7, 146, 147), l'activité de la PKA (Protéine kinase A) et la phosphorylation de CREB (C-AMP Response Element-binding protein) (143). L'activation du récepteur MT₁ augmente la phosphorylation des protéines MEK1 et MEK2 (Mitogen-activated protein kinase ou extracellular signal-regulated kinase kinase 1 et 2) et de ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase kinase 1 et 2). Le récepteur MT₁ peut également activer une signalisation par le complexe des sous-unités $\beta\gamma$ (148). Plusieurs réponses fonctionnelles de la MLT sont également obtenues par la régulation de canaux ioniques (Figure 10). Par exemple, la MLT augmente la quantité de calcium intracellulaire par l'activation des protéines G insensibles au PTX dans les cellules du pars tuberalis exprimant le récepteur endogène MT₁ (146) mais inhibe l'entrée de calcium dans la cellule grâce à l'activation des protéines G sensibles au PTX (149, 150). Des effets qui peuvent sembler contradictoires mais qui suggèrent une régulation contextuelle des fonctions de la MLT.

b. Signalisation du récepteur MT₂

Les niveaux à la fois d'AMPc et de guanosine 3'-5' monophosphate (GMPc) peuvent être modulés par l'activation des récepteurs MT₂ (Figure 10). De la même manière que le récepteur MT₁, l'activation du récepteur MT₂ par la MLT inhibe la formation d'AMPc stimulée par la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (8, 147) mais, contrairement à la réponse du récepteur MT₁, son activation entraîne l'inhibition de la formation de GMPc (147). Dans le SNC, la MLT augmente l'activité de la protéine kinase C (PKC) par l'activation du récepteur MT₂; réponse bloquée par l'antagoniste spécifique de MT₂, le 4P-PDOT (151), suggérant que le récepteur MT₂ puisse stimuler la voie de la phospholipase C et du diacylglycérol (DAG).

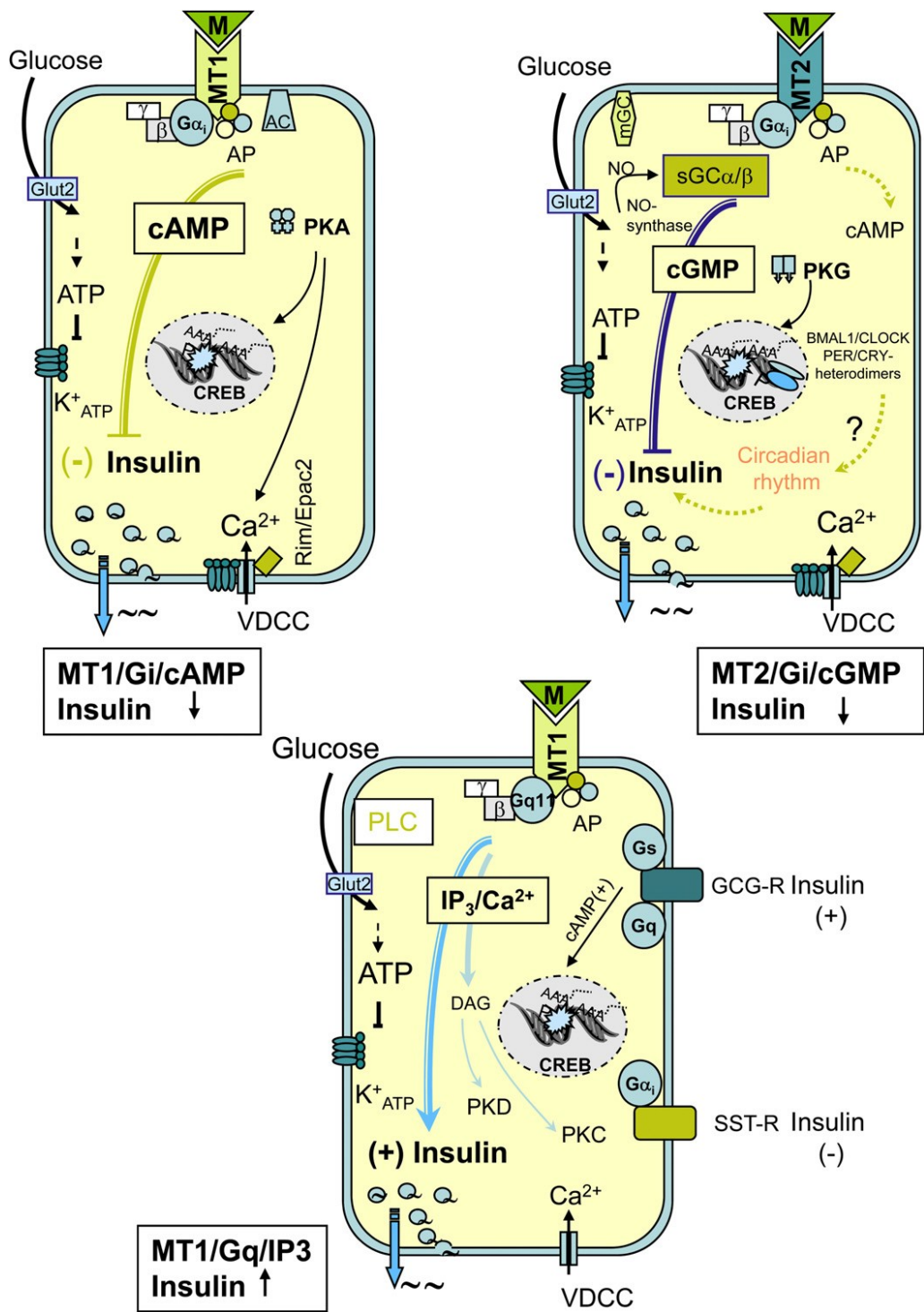


Figure 10. Signalisation des MTRs et leur rôle dans les cellules β -pancréatiques murines (D'après Peschke et al. 2010 (152))

c. Signalisation des MTRs dans le pancréas murin

Les voies de signalisation intracellulaires dans les cellules β -pancréatiques influencées par les récepteurs MT_1 et MT_2 incluent les voies de signalisation AMPc, GMPc et IP3 comme indiquées dans la figure 10. La MLT entraîne une réduction de la production d'AMPc dans les îlots pancréatiques et dans les cellules β INS1 d'insulinomes de rats (104-106). Les niveaux d'insuline et d'AMPc sont augmentés lors d'ajout de forskoline (105) mais diminués par le luzindole (104). L'inhibiteur de protéines G α_i , le PTX, abolit lui aussi l'effet de la MLT sur les niveaux d'AMPc et d'insuline (105) démontrant l'implication de cette voie de signalisation dans la régulation des niveaux d'insuline. La MLT active également le récepteur MT_2 qui inhibe le second messenger GMPc et stoppe la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (130, 153).

De plus, lors d'expériences sur des cellules INS1, la libération d'IP3 (154) induite par la MLT entraîne l'entrée de CA^{2+} dans la cellule depuis les compartiments intracellulaires la stockant (154), un mécanisme connu pour déclencher la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques (146, 148, 155).

II. Rôles et implications de la mélatonine

A. Propriétés chronobiotiques et régulation saisonnière de la mélatonine

Un agent chronobiotique permet l'ajustement de l'horloge biologique. Ainsi, cet agent permet de remettre à l'heure le rythme circadien désynchronisé des mammifères ou de prévenir sa perturbation, par exemple lors de voyages rapides à travers différents fuseaux horaires, en agissant directement sur cette horloge ou sur d'autres systèmes biologiques participant à son contrôle.

1. Rôle de la mélatonine endogène

La relation entre la production circadienne de la MLT endogène et le cycle sommeil-veille est telle que durant les 16h de la journée, un niveau stable de fonctions neurocomportementales est maintenu grâce à l'horloge biologique qui oppose la diminution de ces fonctions conduisant au sommeil et un état d'éveil soutenu. Une extension de la

période d'éveil au niveau de la nuit biologique est associée à une baisse des fonctions neurocomportementales car l'horloge biologique privilégie le sommeil dans cette phase circadienne (156). Ainsi, après l'heure habituelle du coucher, une nette augmentation de somnolence et de ses effets physiologiques se fait ressentir (157). En parallèle, la cascade thermorégulatrice (baisse de production de chaleur et augmentation de perte de chaleur conduisant à la baisse de température corporelle) commence avec l'augmentation des niveaux de MLT endogène durant la nuit (158). Ainsi, la MLT semble être le signal hormonal indiquant le début du sommeil. L'association du sommeil avec le rythme de la MLT fut confirmée chez des personnes aveugles et chez qui l'horloge biologique n'est pas synchronisée (159, 160) et n'a pas de cycle de 24h alternant sommeil et éveil (161, 162).

La MLT est également le signal principal du système circadien des mammifères fœtaux et néonataux (163). Des expositions quotidiennes à la MLT circulante endogène permet aux fœtus d'être synchronisés avec la mère bien avant de pouvoir directement percevoir le cycle jour/nuit de l'environnement par eux-mêmes.

2. Rôle de la mélatonine exogène

La MLT exogène induit tous les effets physiologiques ayant lieu durant la nuit, pendant la sécrétion de la MLT endogène comme les effets soporifiques (164) et hypothermiques avec une augmentation de la perte de chaleur (165, 166).

De manière intéressante, il a été montré que l'exposition à la lumière pendant la nuit empêchait la diminution de la température corporelle, le sommeil et la sécrétion de MLT et que cette inhibition pouvait être levée par la prise de 5mg de MLT exogène (167, 168).

Dans de nombreuses espèces animales la MLT est un "zeitgeber" induisant un décalage horaire de l'horloge circadienne sous-jacent l'expression des rythmes de 24h (169). En condition de vie normale, la MLT exogène ne serait pas capable d'annuler l'effet du plus important "zeitgeber", la lumière. Une approche intéressante afin d'élaborer la capacité de décalage de phase de la MLT a été d'étudier des personnes totalement aveugles chez qui l'information jour/nuit est défaillante et ne peut donc pas réguler l'horloge circadienne. Leurs rythmes circadiens ne sont donc pas synchronisés sur l'environnement et elles ont souvent une période supérieure à 24h. Néanmoins, il a été montré qu'un traitement à des

temps appropriés de 0.5 à 10mg de MLT permettait parfois de resynchroniser leur système circadien (170, 171).

B. Implication de la MLT dans les maladies métaboliques

1. Introduction au métabolisme du glucose

Le métabolisme du glucose est régulé par l'interaction des hormones des îlots cellulaires pancréatiques avec le foie, les muscles et les tissus adipeux. Une altération par des facteurs génétiques et/ou environnementaux dans la fonction d'un seul de ces éléments participant à ce système complexe d'homéostasie glucidique entraîne une réponse compensatrice des autres éléments afin de conserver l'homéostasie du système. Les éléments clés régulant ce système sont l'insuline et le glucagon qui sont deux hormones pancréatiques régulées par les niveaux de nutriments et par les incrétines, des hormones gastrointestinales. L'insuline promeut la capture du glucose hépatique, stimule la glycogénèse dans les muscles, le métabolisme et la capture du glucose dans les tissus adipeux afin de diminuer la concentration sanguine en glucose. Le glucagon stimule quant à lui la glycogénolyse et la gluconéogenèse hépatiques afin d'augmenter la concentration sanguine en glucose.

Le maintien de la concentration normale de glucose dans le sang requiert une coordination précise entre l'utilisation du glucose, la production de glucose endogène et son apport par l'alimentation. Par exemple, en période de jeûne, les concentrations de glucose dans le sang sont relativement stables, indiquant que la quantité de glucose produite et son utilisation sont égales. Après un repas, l'absorption du glucose résulte en une augmentation de sa concentration dans le sang. Comme le glucose est absorbé, la production de glucose endogène est supprimée et l'utilisation du glucose par le foie, les muscles et la graisse est accélérée (172), notamment par l'insuline (173). Ainsi, le glucose exogène est assimilé et la concentration du glucose sanguin retourne au niveau de la période de jeûne.

2. Introduction sur le diabète

Le diabète est un trouble de l'organisme dû soit à un déficit en insuline, soit à une résistance anormale à cette hormone entraînant une hausse de la glycémie. Toute personne ayant une glycémie supérieure à 1,26g par litre de sang (7mmol/L) est considérée comme diabétique. Le type de diabète sera alors à confirmer par des examens complémentaires.

a. Le diabète de type 1

Le diabète de type 1, aussi appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile. Ce diabète apparaît le plus souvent pendant l'enfance, à l'adolescence ou au début de l'âge adulte, rarement chez les personnes plus âgées. Il touche environ 10 % des personnes diabétiques et est dû à la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans par le système immunitaire entraînant une absence totale de production d'insuline par le pancréas nécessaire au fonctionnement cellulaire, d'où une augmentation de sucre dans le sang. Le processus de destruction évolue habituellement sur plusieurs années. Il débute bien avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie.

b. Le diabète de type 2

Le DT2 ou non insulino-dépendant. Ce diabète est découvert le plus souvent à l'âge adulte, après 40 ans, et sa prévalence augmente avec l'âge. Il touche environ 90% des personnes diabétiques et est dû à une sécrétion d'insuline normale mais peu active. Les personnes à risque sont les personnes obèses, présentant une anomalie du métabolisme glucidique, ayant des antécédents familiaux de DT2. L'insulinorésistance se caractérise par l'incapacité de l'insuline à obtenir une réponse maximale au niveau de ses organes cibles. Par exemple au niveau du muscle, lors de la charge en glucose, cette résistance aboutit à un défaut de captation musculaire du glucose, ou encore au niveau hépatique où apparaît un accroissement de la production hépatique de glucose, à l'origine de l'hyperglycémie à jeun. Il existe également une insulinorésistance adipocytaire. L'insulinopénie relative est caractérisée par une insuffisance de sécrétion d'insuline, compte tenu du niveau de la glycémie. Ce trouble, qui est présent dès le début de la maladie, est évolutif, inéluctable et s'aggrave avec l'âge et la durée du diabète, jusqu'à conduire finalement au diabète insulino-dépendant.

3. Les facteurs génétiques du diabète de type 2

Actuellement, nous ne connaissons que peu de choses sur les causes génétiques du DT2. Toutefois, il est couramment admis que les facteurs génétiques jouent un rôle important dans son développement (174) mais sa base génétique est complexe. En effet, les causes génétiques des diabètes monogéniques sont relativement bien établies. En revanche, les

causes polygénétiques du DT2 rendent les recherches beaucoup plus complexes à cause de l'hétérogénéité phénotypique de cette pathologie.

La définition de sous-groupes à l'aide de la génétique moléculaire reste très compliquée à cause de la prédisposition polygénique et du fait que le phénotype clinique dépend autant de la génétique que de l'environnement du patient (175). Il serait possible de définir des sous-groupes en se basant sur certains traits physiologiques comme la résistance à l'insuline ou encore l'incapacité des cellules β à produire de l'insuline, mais ces caractéristiques changent au cours de la pathologie (176). Il est important de noter que l'incapacité à définir clairement des sous-groupes dans le DT2 a un impact majeur sur l'optimisation des traitements.

4. Le diabète de type 2 en lien avec la mélatonine

En 1939 Constantin Parhon publia le premier texte faisant un lien entre la glande pinéale et les carbohydrates (177). S'ensuivit plusieurs années d'études faisant état de rôles contradictoires d'extraits de glandes pinéales sur le métabolisme du glucose (178-183). Même après l'isolement (184) et l'identification de la structure moléculaire de la MLT (5-methoxy-*N*-acetyltryptamine) par Aron Lerner (2), cette discussion controversée a continué. Les résultats de l'équipe de Parhon a ainsi montré qu'un peptide pinéal, nommé "pinéaline" décrit comme étant similaire à l'insuline car ayant des caractéristiques hypoglycémiantes, anaboliques et anti-cholestérolémiques (181). La pinéaline augmente la tolérance au glucose alors que la pinéalectomie diminue la sécrétion d'insuline et la tolérance au glucose (182, 185, 186). Ces résultats concordent avec les découvertes faites plus tard par l'équipe de Blásques (187-189) qui ont découvert que la pinéalectomie réduit significativement les niveaux d'insuline et augmente les niveaux de glucose dans le sang (190-193). Ils ont également observé que ces effets pouvaient être annulés par l'ajout de MLT exogène (194). Plus tard, d'autres observations ont indiqué que la MLT prévient le diabète de type 1 alors que la pinéalectomie entraîne le développement de maladies métaboliques (195, 196). En revanche, plusieurs études ont montré par la suite que des hauts niveaux de MLT, dus à la cécité (197) ou à l'ajout de MLT, augmentent les niveaux de glucose dans le sang (198), alors qu'une diminution des niveaux sanguins de glucose (131, 199) et une augmentation des niveaux d'insuline ont été observés après pinéalectomie (177-179). Néanmoins, la majorité des auteurs s'accordent sur le fait que la glande pinéale a un effet suppressif sur la production d'insuline des cellules β -pancréatiques parce que la MLT réduit les niveaux

d'insuline (180-182) et la tolérance au glucose chez le rat (200, 201). Les résultats montrent ainsi un antagonisme fonctionnel entre l'insuline et la MLT puisqu'une augmentation des niveaux d'insuline entraîne un effet inhibiteur sur la synthèse de MLT par la glande pinéale (202, 203). Cet antagonisme est concordant avec le fait que chez l'homme, les faibles niveaux d'insuline durant la nuit et hauts niveaux durant la journée coïncident avec les niveaux élevés de MLT durant la nuit et réduits durant la journée (204). De plus, les patients diabétiques ont un rythme circadien très perturbé (122, 205). En résumé, ces découvertes indiquent clairement que les interactions MLT-insuline (206-212) jouent un rôle important dans le métabolisme du glucose.

Plusieurs études dans lesquelles les gènes codant pour les MTRs ont été séquencés chez un grand nombre de patients diabétiques ou normoglycémiques ont tenté de lier des variations génétiques de ces gènes au DT2. Il a notamment été trouvé un lien entre des variations du gène *MTNR1B* codant pour le récepteur MT_2 à la MLT (213) ou encore un variant du gène *MTNR1A* (114) et un risque accru de développer le DT2 mettant en avant un premier lien génétique entre le système mélatoninergique et le DT2.

Le DT2 est une pathologie multifactorielle et l'environnement joue un rôle important dans son développement. Il a ainsi été démontré que le travail à horaires décalés (214), l'exposition à la lumière pendant la nuit (215), des dérèglements du rythme circadien (216) ou encore un sommeil insuffisant (217) augmentent le risque de développer le DT2. Ce rapport entre MLT et DT2 est à double sens puisqu'une personne développant le DT2 aura à son tour des risques d'avoir une surexpression des récepteurs MT_1 et MT_2 dans le pancréas (108), une baisse de la sécrétion de la MLT (202) ou encore un dérèglement des cycles de sécrétion de la MLT (122).

C. Implication du système mélatoninergique dans les maladies neurologiques et les troubles du comportement

Une altération de la production de MLT et de l'expression des MTRs a été fréquemment reportée dans les maladies neurodégénératives et les troubles psychiatriques comme la maladie d'Alzheimer (MA) (218), la maladie de Parkinson (MP) (96), ou encore la dépression (219). Chez les patients MA, l'expression du récepteur MT_1 dans le SNC et l'expression du récepteur MT_2 dans l'hippocampe est réduite (218), mais curieusement, des

concentrations plus élevées en MT₁ ont été détectées dans l'hippocampe (220), suggérant une réponse compensatrice à la faible quantité de MT₂ dans cette région du cerveau et de MLT circulante chez ces patients (221). Ces observations suggèrent que l'expression des MTRs sous certaines conditions pathologiques peut être régulée différemment dépendamment de la région du cerveau. Chez les patients MP, il a été observé une baisse de l'expression des récepteurs MT₁ et MT₂ dans la substance noire et l'amygdale, deux des régions les plus touchées lors du développement de la MP (96). Une étude a également montré une surexpression du récepteur MT₁ chez des patients souffrant de dépression, suggérant l'implication de ce récepteur dans la pathogénèse de cette maladie (219). Néanmoins, des études menées chez la souris ont montré que les souris déficientes en MTRs, notamment MT₁, avaient un comportement dépressif (222, 223), posant un doute sur le rôle des MTRs dans le développement de la dépression.

De plus en plus d'évidences confirment que des dysfonctions des MTRs favorisent le développement et la progression des maladies neurodégénératives. L'effet neuroprotecteur de la MLT endogène ou exogène a été démontrée dans différents systèmes (224). Dans un modèle neuroinflammatoire murin, la mort neuronale a été observée seulement chez les souris traitées avec du luzindole, un antagoniste des MTRs (225). De manière similaire, la déplétion de la MLT endogène par pinéalectomie entraîne une perte neuronale spontanée dans l'hippocampe qui peut être évitée par traitement à l'agomélatonine, un agoniste des MTRs (226). La nécessité des MTRs pour l'action neuroprotectrice de la MLT a également été montré lors d'expériences in-vitro au cours desquelles un traitement au luzindole ou l'utilisation de siARN pour engendrer une sous-expression de MT₁ ont augmenté la mort cellulaire des neurones (94).

Plusieurs études ont tenté d'identifier le rôle de la MLT sur la cognition et l'apprentissage en utilisant des souris déficientes en MTRs. Néanmoins, même si toutes s'accordent à dire que la MLT est importante dans cette fonction, les résultats démontrent des effets contradictoires. En effet Moffit (227) a pu observer que les souris déficientes en MTRs avaient des facultés cognitives augmentées comparativement aux souris sauvages, alors que d'autres chercheurs comme Wang (228), Larson (229) ou Comai (230) ont montré une diminution de ces facultés chez les souris déficientes en MT₂ mais pas MT₁. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de clarifier le rôle du système mélatoninergique dans les fonctions cognitives.

L'utilisation de la MLT en tant que traitement thérapeutique a été proposée et testée chez plusieurs modèles murins et lors d'essais cliniques dans des conditions de neurodégénérescence sévère, notamment chez des patients MP (231, 232). L'utilisation thérapeutique de la MLT est associée à une amélioration du sommeil, un meilleur alignement des paramètres circadiens et ses effets bénéfiques sur la neuroprotection commencent à être reconnus (233, 234).

En résumé, la localisation cellulaire et le rôle des MTRs dans les fonctions neuronales et leur participation dans les maladies neurodégénératives commencent à être comprises et suggèrent un rôle de modulation de la MLT dans les fonctions, la plasticité et le développement neuronaux. Néanmoins, son rôle exact n'est pas clairement défini.

D. Lien entre systèmes mélatoninergiques et dopaminergiques

Des observations ont indiqué que la dopamine n'est pas seulement le précurseur de la norépinephrine mais est également un neurotransmetteur pinéal avec la découverte de fibres dopaminergiques dans la glande pinéale (235). De plus, les concentrations en dopamine varient selon un rythme journalier avec des concentrations plus élevées pendant le jour chez plusieurs mammifères (236-239). La présence des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans la glande pinéale bovine suggère un rôle important de la dopamine dans la régulation de l'activité pinéale (240, 241). Des études biochimiques sur cette glande ont également révélé un effet inhibiteur de la dopamine à faible concentration et un effet stimulateur à plus forte concentration sur l'activité de la AA-NAT et sur la sécrétion de MLT (237, 242) probablement grâce à la présence de ses deux récepteurs dopaminergiques. La dopamine semble ainsi être un neurotransmetteur pinéal mais son rôle physiologique reste toujours à établir.

En plus de l'effet de la dopamine sur la sécrétion de la MLT, cette dernière exerce également un effet inhibiteur sur la libération de la dopamine dans l'hippocampe ventral, le bulbe rachidien, l'aire préoptique médiane et l'hypothalamus postérieur (243), sites déjà connus pour l'effet de la MLT sur la modulation des fonctions neuroendocrines (244-246). En revanche, la MLT n'a aucun effet sur la libération de la dopamine dans le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe dorsal et le striatum (243) (Figure 11).

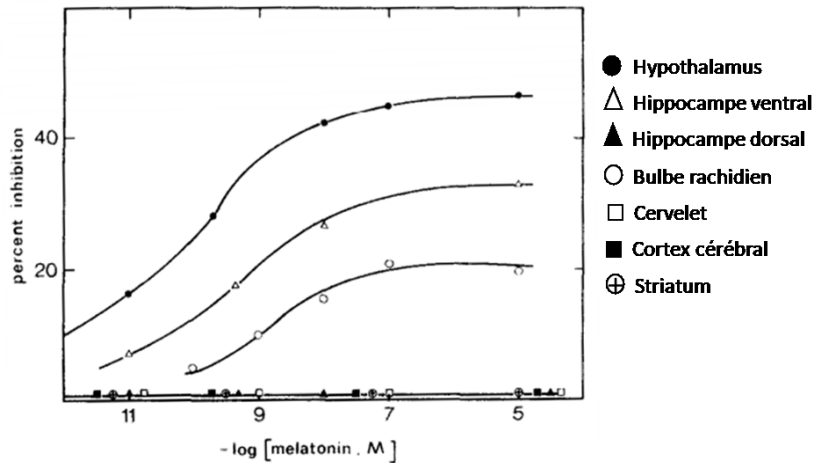


Figure 11. Inhibition de la libération de dopamine par la mélatonine (D'après Zisapel et al. 1982 (243))

Les interactions entre les systèmes dopaminergiques et mélatoninergiques peuvent également s'observer de manière plus indirecte par les maladies et troubles que leurs dysfonctionnements engendrent. En effet, des liens entre ces deux systèmes et le développement de troubles neurodégénératifs et neuropsychiatriques ont déjà été établis comme pour la maladie de Parkinson (96, 247, 248), la schizophrénie (249-251), le trouble du déficit d'attention avec hyperactivité (TDAH) (252, 253) ou encore la dépression (219, 254).

III. Le système dopaminergique

A. Historique de la dopamine

En 1958, Carlsson a découvert le rôle de la dopamine en tant que neuromédiateur et sa participation à un grand nombre de fonctions du système nerveux telles que l'activité motrice, l'éveil, les fonctions d'apprentissage et de mémoire, les émotions et les processus de récompense. Des perturbations du système dopaminergique sont à l'origine de la MP et ont également été observées ou présumées dans des maladies psychiatriques telles que la schizophrénie, le TDAH, la dépression et la dépendance aux drogues.

B. Synthèse et métabolisme de la dopamine

La dopamine appartient à la famille des catécholamines qui comprend également la noradrénaline et l'adrénaline et comme tous les neuromédiateurs, elle ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique. En revanche, ses précurseurs, les acides aminés phénylalanine et tyrosine la traversent. La synthèse neuronale de la dopamine se déroule dans le cytoplasme, essentiellement au niveau des terminaisons axonales, mais aussi au niveau des corps cellulaires et des dendrites. La L-tyrosine captée par le neurone est transformée en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de cette voie de synthèse, puis en dopamine par la DOPA décarboxylase (Figure 12). La dopamine synthétisée est alors concentrée dans des vésicules présynaptiques au niveau des terminaisons neuronales grâce au transporteur vésiculaire des monoamines VMAT-2. Ce stockage protège la dopamine de la dégradation enzymatique intracellulaire réalisée par les monoamine-oxydases (MAO), au sein des mitochondries et de l'oxydation générant des radicaux libres, toxiques pour la cellule. La dopamine libérée dans l'espace synaptique est catabolisée par une enzyme gliale, la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et par la MAO, aboutissant aux métabolites finaux : acide 3,4-dihydrophénylacétique (DOPAC), 3-méthoxytyramine (3-MT) et acide homovanillique (HVA).

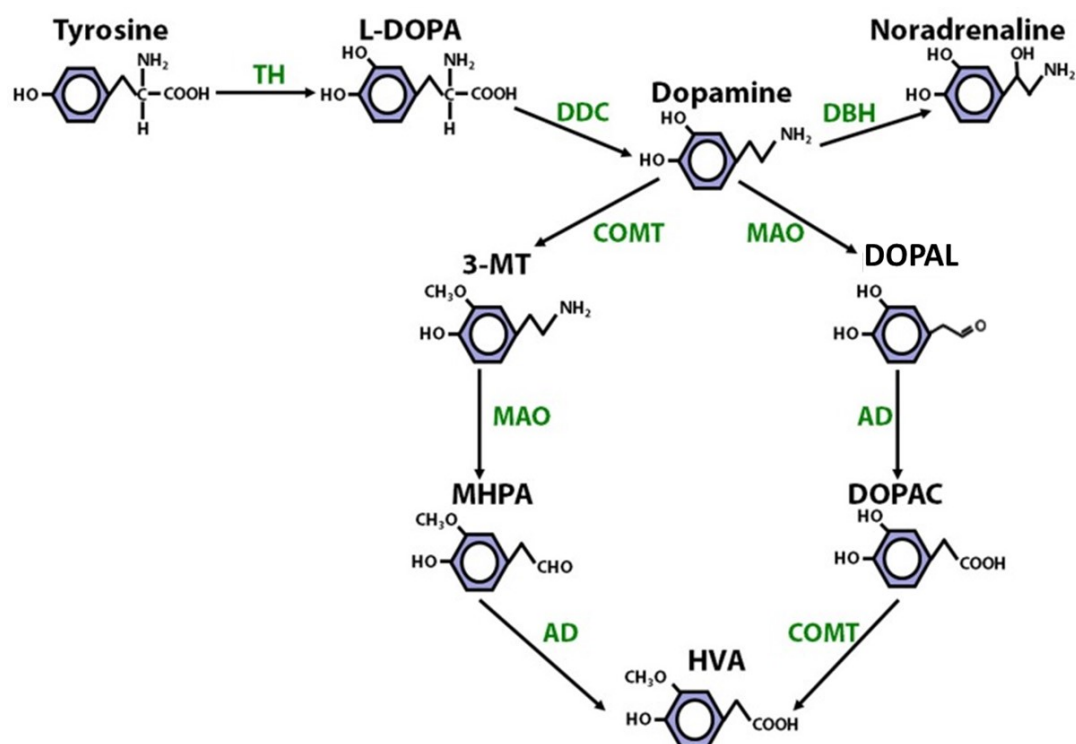


Figure 12. Synthèse et dégradation de la dopamine (Modifié de Laatikainen et al., 2013 (255))

C. Les récepteurs de la dopamine

Cinq sous-types de récepteurs à la dopamine (les récepteurs D1, D2, D3, D4 et D5 codés par leurs gènes respectifs *DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* et *DRD5*) sont connus pour médier l'ensemble des fonctions physiologiques de la dopamine, notamment les mouvements volontaires, la récompense, la régulation du sommeil, l'émotion, l'attention, les fonctions cognitives, la vision et la régulation hormonale. De tous les sous-types de récepteurs à la dopamine, les sous-types D1 et D2 sont les plus abondants dans le cerveau (256, 257). Les récepteurs de la dopamine sont également connus pour influencer le système immunitaire ainsi que les fonctions cardiovasculaires, rénales et gastrointestinales. En tant que membre de la superfamille des RCPGs, les récepteurs de la dopamine signalent grâce à des voies dépendantes et indépendantes des protéines G. Les récepteurs de la dopamine sont classés en deux catégories : les récepteurs de la classe D1 (D1 et D5) et de la classe D2 (D2, D3 et D4) selon leur capacité à activer les protéines *G α s/olf* ou *G α i/o* respectivement (258, 259).

Les récepteurs de la dopamine sont des cibles bien établies des composés pharmacologiques lors de nombreux troubles et conditions comme la schizophrénie, la MP, les troubles de

bipolarité, la dépression ou encore l'hypertension. C'est pourquoi un grand intérêt est porté sur le système dopaminergique et des efforts considérables ont été fait afin de développer des méthodes afin de mesurer les niveaux de dopamine cérébrale dans les différents compartiments du cerveau, ainsi que la libération de la dopamine dans le striatum, la substance noire, les régions limbiques et le cortex.

D. Localisation du système dopaminergique

1. Le système dopaminergique dans la rétine

La présence des récepteurs à la dopamine dans la rétine a été bien établie (260-262). La dopamine représente la catécholamine majeure de la rétine des vertébrés.

Plusieurs études ont montré des perturbations des neurones dopaminergiques dans la rétine chez des patients atteints de MP (263, 264) et donc que la rétine pourrait contribuer aux symptômes visuels des patients. Ainsi, la compréhension du rôle joué par la dopamine de la rétine saine dans la vision est clé pour comprendre les mécanismes pathophysiologiques des dysfonctions de la rétine malade. Malgré la découverte des cellules dopaminergiques de la rétine il y a environ 30 ans, de nombreux aspects sur leur fonction dans cet organe restent énigmatiques. Certains chercheurs pensent que la dopamine est un messager chimique pour l'adaptation de la rétine à la lumière (262) mais cette hypothèse n'a jamais été testée.

La dopamine remplit la plupart des critères nécessaires pour être considérée comme étant un neurotransmetteur dans la rétine. Elle est présente en forte concentration dans certains neurones de la rétine qui ont une forte activité tyrosine hydroxylase et un système de recapture de haute affinité pour la dopamine afin de terminer sa transmission. Ces neurones libèrent la dopamine pendant la dépolarisation ou en réponse à certains stimuli, dont la lumière.

2. Le système dopaminergique dans le système nerveux central

L'élément majeur du circuit dopaminergique dans le système nerveux central consiste en des projections depuis l'aire tegmentale ventrale (ATV) et la substance noire jusqu'au striatum ventral, au noyau accumbens (NAc), à l'amygdale, au tubercule olfactif et au cortex frontal et limbique (265). L'intégrité de ces voies spécifiques est cruciale afin de fournir une réponse adéquate aux stimuli internes et externes. Le NAc comporte deux régions distinctes : le cœur (partie dorsale) et la coquille (partie ventrale) qui sont innervées par des neurones

dopaminergiques provenant de l'ATV (266, 267). Alors que le striatum ventral est impliqué dans la motivation et la récompense, le striatum dorsal quant à lui joue un rôle majeur dans la formation des habitudes. La recapture de la dopamine nécessite la présence de DAT à la membrane plasmique et donc le trafic et la localisation corrects de ce transporteur sont primordiaux pour sa fonction.

3. Le système dopaminergique dans le système sanguin

En dehors du système nerveux central, la dopamine fonctionne en tant que messager chimique local. Dans les vaisseaux sanguins, la dopamine inhibe la libération de la norépinéphrine qui agit comme vasodilatateur.

La dopamine ne passe pas la barrière hémato-encéphalique, donc sa synthèse et ses fonctions dans les différentes zones périphériques sont indépendantes de celles dans le cerveau. Une quantité considérable de dopamine circule dans le système sanguin, mais sa fonction n'est pas totalement claire (268). La dopamine a été trouvée dans le plasma sanguin à des niveaux comparables à ceux de l'épinéphrine. Mais chez l'homme, plus de 95% de la dopamine dans le plasma est sous la forme de sulfate de dopamine, un conjugué produit par l'enzyme sulfotransférase et agissant comme de la dopamine libre (268). La majorité de ce sulfate de dopamine est produite dans le mésentère qui entoure une partie du système digestif (268). La production du sulfate de dopamine servirait à détoxifier le corps de la dopamine qui est ingérée dans la nourriture ou produite lors de la digestion avec des niveaux dans le plasma étant jusqu'à 50 fois supérieurs après les repas (268). La fonction du sulfate de dopamine n'est néanmoins pas encore bien définie.

La faible quantité de dopamine non conjuguée dans le sang pourrait être produite par le système nerveux sympathique, le système digestif ou encore d'autres organes (268). Elle pourrait agir sur les récepteurs situés dans des tissus périphériques ou encore être métabolisée ou convertie en norépinéphrine. Les récepteurs à la dopamine sont également présents sur les parois des artères où ils agissent comme vasodilatateurs et inhibiteurs de la libération de norépinéphrine (269).

En dehors de ses rôles sur la modulation du flux sanguin, la dopamine circule dans d'autres systèmes périphériques ou elle agit dans une zone restreinte en ayant des fonctions exocrines ou paracrines (268). Parmi ces systèmes, la dopamine joue un rôle important dans l'immunité,

les reins et le pancréas, trois systèmes dans lesquels la MLT joue un rôle important et a ses récepteurs.

4. Le système dopaminergique dans le pancréas

Le traitement de personnes par le précurseur de la dopamine, la L-dopa, entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline lors de la consommation de glucose (270). Chez la souris, une simple injection de L-dopa entraîne une accumulation de dopamine dans les cellules β -pancréatiques ainsi que l'inhibition de la sécrétion d'insuline (271, 272).

Néanmoins, la littérature contient des rapports contradictoires à propos des effets d'analogues de la dopamine sur la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans des îlots isolés. Certains chercheurs ont remarqué que des analogues de la dopamine inhibaient la libération d'insuline (273), alors que d'autres ont rapporté une augmentation de la sécrétion d'insuline lors de l'accumulation de dopamine (274). Ces contradictions peuvent être expliquées par le fait que différentes doses de dopamine peuvent induire des effets opposés sur la sécrétion d'insuline (275).

Les cellules β pancréatiques contiennent les enzymes responsables de la synthèse, la dégradation et le stockage de la dopamine (TH, DOPA, MAO et VMAT-2) (276-279) suggérant que les cellules β elles-mêmes peuvent produire leur propre dopamine qui exercerait une régulation auto-paracrine de la sécrétion d'insuline dans ces cellules. Les cellules des îlots pancréatiques expriment les récepteurs dopaminergiques D2, D3 et D4 sur lesquels la dopamine agit et par lesquels elle pourrait exercer ces effets (280-284).

L'absence d'effet inhibiteur de la dopamine sur la sécrétion de l'insuline chez la souris déficiente en récepteurs D2 induit une réduction de la masse des cellules β pancréatiques et diminue leur réplication chez la souris (282) suggérant que la variation dopaminergique des cellules β pancréatiques peut moduler la prolifération cellulaire et/ou l'apoptose de ces cellules.

5. Le système dopaminergique dans le système immunitaire

Dans le système immunitaire, la dopamine agit grâce à ses récepteurs présents sur les cellules immunitaires, notamment les lymphocytes (285), la dopamine pouvant être elle-même être synthétisée et libérée par ces cellules (285). L'effet principal de la dopamine sur le système immunitaire est la réduction des niveaux d'activation des lymphocytes et pourrait donc jouer un rôle contre le développement des maladies auto-immunes (286).

6. Le système dopaminergique dans le rein

La dopamine remplit d'importantes fonctions physiologiques dans les reins de mammifères. Elle y augmente le débit sanguin et régule la concentration en sels et en eau dans l'urine (287). Les reins servent de source majeure de production de dopamine. La dopamine circulante est généralement de l'ordre du picomolaire alors que les niveaux de dopamine dans les reins peuvent atteindre des concentrations de l'ordre du nanomolaire (288). Le précurseur de la dopamine, la L-DOPA, est prélevé de la circulation sanguine et est ensuite converti en dopamine dans les reins où il va ensuite être métabolisé principalement par la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) et plus faiblement par la monoamine oxydase A.

Dans chacun de ces systèmes périphériques et à l'exception des vaisseaux sanguins, la dopamine est synthétisée localement et agit dans l'environnement proche des cellules la sécrétant.

E. Introduction aux transporteurs neuronaux plasmiques

Lors de la libération des neurotransmetteurs dans l'espace intersynaptique par un neurone, ceux-ci vont activer leurs récepteurs. Afin d'assurer une neurotransmission correcte, il est important que le signal soit bref. C'est pourquoi les transporteurs plasmiques présynaptiques ou gliaux jouent un rôle primordial en éliminant la majeure partie des neurotransmetteurs de l'espace intersynaptique afin que sa concentration retourne rapidement à son niveau basal, régulant ainsi la durée et l'amplitude du signal. Ces neurotransmetteurs recaptés seront alors recyclés et internalisés dans des vésicules afin de constituer un stock de neurotransmetteurs dans le neurone, ou bien dégradés par la monoamine oxydase. C'est pourquoi les transporteurs plasmiques des monoamines jouent un rôle prépondérant dans la régulation de la neurotransmission. Cette importance est notamment illustrée par le fait que toute molécule qui les cible en modifiant leur activité a des effets psychotropes majeurs (289).

F. Le transporteur de la dopamine

La biodisponibilité de la dopamine est régulée principalement par son transporteur (DAT), une protéine située à la membrane plasmique et qui transporte le transmetteur de l'espace intersynaptique vers la partie interne du neurone présynaptique. DAT est une cible de drogues

addictives comme la cocaïne, l'amphétamine (AMPH) et la méthamphétamine (METH) et de certains agents comme Adderall™, Ritalin™ et Wellbutrin™ prescrit pour le traitement du TDAH, de la dépression et d'autres problèmes de déséquilibre de la dopamine. Ces drogues affectent DAT de 2 manières; certaines inhibant le transport en se liant au transporteur, comme la cocaïne, d'autres en stimulant le transport inverse (efflux) de la dopamine comme l'AMPH et la METH. Ces 2 processus induisent un excédent de dopamine dans l'espace intersynaptique entraînant une suractivation de ses récepteurs lors de la prise de ces drogues.

Il existe deux familles de transporteurs plasmiques neuronaux à haute affinité : les transporteurs Na/Cl dépendants dont fait partie DAT et les transporteurs Na/K dépendants. Chacune de ces 2 familles inclue des transporteurs pour différents substrats. DAT est un symporteur qui nécessite une liaison séquentielle pour co-transporter 2 ions Na^+ et un ion Cl^- avec la dopamine (Figure 13). Le gradient de concentration des ions intracellulaires générés par la membrane plasmique guide la recapture de la dopamine (290-292). Dans un premier temps, le Na^+ se lie au transporteur puis la dopamine se lie à DAT suivi par le Cl^- . Les ions chlorure ne sont néanmoins pas nécessaires pour la liaison de la dopamine à DAT mais sont nécessaires pour que le transport s'initie. Le complexe dopamine, Na^+ et Cl^- crée un changement conformationnel de DAT. Le transporteur qui faisait alors face à l'extérieur va alors faire face à l'intérieur du neurone où le neurotransmetteur et les ions seront libérés. La dopamine sera ainsi libérée dans le cytoplasme de la cellule puis dégradée ou stockée dans des vésicules comme expliqué précédemment.

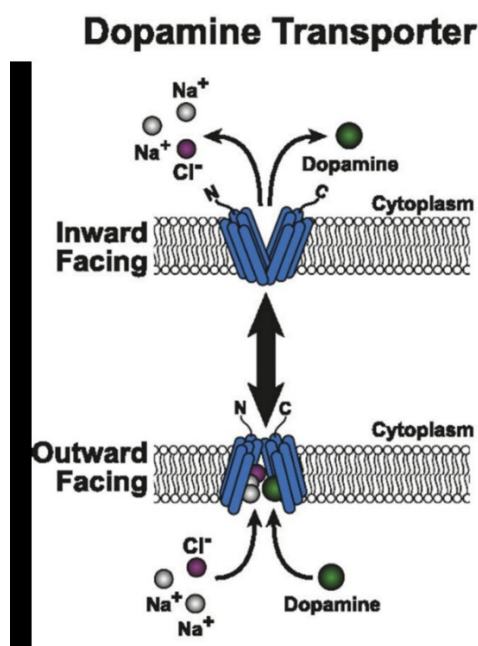


Figure 13. Mécanisme d'action du transporteur de la dopamine (D'après German et al., 2015 (293))

Il est maintenant bien établi que ces activités de transporteur sont régulées par des mécanismes qui permettent aux neurones de moduler les niveaux de recapture de la dopamine extracellulaire en réponse à des demandes physiologiques à court ou long terme (294, 295). Plusieurs de ces processus interagissent entre eux ou se chevauchent et sont affectés par des substrats ou des inhibiteurs. La régulation est achevée par des modifications post-traductionnelles. De plus en plus d'évidences indiquent que beaucoup de ces processus sont dérégulés dans les troubles de déséquilibre de dopamine, suggérant qu'ils sont des facteurs importants dans le développement de ces maladies et donc des cibles thérapeutiques potentielles.

DAT contient de long domaines N et C-terminaux du côté cytoplasmique de la cellule. Il s'agit de sites de modifications post-traductionnelles, d'interactions avec des partenaires de liaison et des motifs de régulation. Le domaine intracellulaire N-terminal contient le résidu Arg60 qui stabilise la conformation ouverte vers l'extérieure du transporteur et qui serait impliqué dans le contrôle du transport en influençant la conformation du domaine TM1 qui entraîne un réarrangement structural durant la transition de conformation extérieure/intérieure (296-298). Le domaine N-terminal subit de nombreuses modifications par phosphorylation et ubiquitylation. Les phosphorylations peuvent être catalysées par différentes classes de kinases. Par exemple les sérines en position 2, 4, 7, 12 et 13 sont phosphorylées par la protéine kinase C (PKC) ou lors de l'exposition à l'amphétamine ou à la méthamphétamine (299, 300).

Le domaine C-terminal subit également des modifications post-traductionnelles. Par exemple, la cystéine en position 580 est un site de palmitoylation (301). A proximité de ce site, plusieurs motifs permettent l'interaction avec d'autres protéines comme la Protéine Kinase Calcium/Calmoduline dépendante (CaMK) qui lie DAT en position 612 à 617 (302), l' α -synucléine qui lie les résidus 606 à 620 (303) ou la protéine Parkin (304).

Lors de sa maturation, DAT est également N-glycosylé sur 3 sites au niveau de la deuxième boucle extracellulaire (305, 306). Il est connu que les glycosylations, notamment les N-glycosylations, jouent un rôle déterminant dans le repliement, le trafic et l'expression à la surface cellulaire des protéines membranaires (307, 308). Des études in-vitro ont montré que l'activité de DAT dépend de ces glycosylations. Ainsi, la forme glycosylée de DAT transporte la dopamine plus efficacement que la forme non-glycosylée (309, 310).

DAT est régulé par plusieurs systèmes de signalisation, dont les voies PKC et ERK sont parmi les mieux caractérisées (295). De nombreux systèmes de réception de neurotransmetteurs dont

la dopamine, les opioïdes et le glutamate qui influencent la recapture de dopamine, la signalisation dopaminergique et les caractéristiques lors de la consommation de drogues pourraient passer par ces voies de signalisation (294, 311). Bien que la mécanistique des interactions ne soit pas toujours bien connue, des interactions fonctionnelles ont été identifiées notamment entre DAT et le récepteur D2 à la dopamine, ou encore avec les protéines G β et γ (312, 313). La régulation de DAT médiée par les systèmes de signalisation est complexe, avec certaines fonctions régulées par plusieurs voies de signalisation et certaines voies de signalisation régulant plusieurs fonctions à la fois.

G. Effet neurotoxique de la dopamine cytosolique

Plusieurs études ont montré que l'accumulation de dopamine dans l'espace cytosolique peut entraîner des conséquences délétères pour la cellule (314-317). Une étude de Mosharov a montré en 2009 que l'augmentation des niveaux cytosoliques de dopamine augmente la toxicité cellulaire alors que la diminution de ces niveaux par l'inhibition de la L-DOPA est protectrice et augmente la survie cellulaire (317). Cette étude suggère donc que les niveaux de dopamine cytosolique déterminent la toxicité des cellules dopaminergiques.

La dopamine cytosolique est très réactive et entraîne la toxicité par deux mécanismes : la déamination par des enzymes cytosoliques ou l'auto-oxydation. La dopamine peut être désaminée par la monoamine oxydase (MAO) qui convertit la dopamine cytosolique en DOPAL (Figure 12), un aldéhyde intermédiaire réactif, et en peroxyde d'hydrogène (268, 318, 319). Heureusement, la DOPAL est généralement convertie en DOPAC, un métabolite bénin, par l'aldéhyde déshydrogénase. Néanmoins, la DOPAL peut être oxydée, créant des dérivés réactifs de l'oxygène (268). La DOPAL serait toxique pour les neurones in-vitro mais également dans un modèle de souris déficientes en aldéhyde déshydrogénase (319-322). De plus, la quantité de DOPAL est augmentée dans le cerveau d'individus MP, suggérant son implication dans cette maladie (323).

La dopamine cytosolique peut également être auto-oxydée formant ainsi des dérivés réactifs de l'oxygène comme des radicaux hydroxylés, du superoxyde ou encore du peroxyde d'hydrogène (324, 325).

H. Implication dans les maladies neurologiques et les troubles du comportement

1. Implication dans la maladie de Parkinson

La maladie neurodégénérative la plus répandue chez l'homme est la maladie de Parkinson. Les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson sont caractérisés par une rigidité musculaire, une posture instable, un tremblement de repos et une bradykinésie (326). Ces troubles moteurs sont causés par une dégénérescence des neurones dopaminergiques nigrostriataux entraînant la réduction du tonus dopaminergique (327). Malheureusement, il n'y pas encore de réelles preuves concrètes de lien entre des mutations de DAT et la maladie de Parkinson, probablement parce qu'il s'agit d'une maladie à l'étiologie multifactorielle et que des mutations génétiques ne sont retrouvées que dans très peu de cas (5 à 10%) (327). Le rôle potentiel de DAT dans l'augmentation de la vulnérabilité des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson pourrait être d'augmenter la quantité de dopamine cytosolique qui est très réactive. L'activité de DAT pourrait ainsi sensibiliser les neurones dopaminergiques au stress oxydatif intrinsèque.

2. Implication dans le trouble de déficit d'attention avec hyperactivité

Depuis plus de 20 ans, le dysfonctionnement de DAT a été beaucoup étudié lors de recherches sur le TDAH (328). En 1995, Cook et ses collègues ont rapporté qu'un polymorphisme sur la partie non codante du gène de DAT entraînait un risque accru de développer le TDAH (329). Par la suite, d'autres études ont confirmé ces résultats (329-331). Alors que les bases moléculaires de cette association ne sont pas claires, il a été démontré que ce polymorphisme peut impacter l'expression du gène de DAT (332, 333). Mise à part les polymorphismes sur la partie non codante de DAT, des mutations de la séquence codante du gène de DAT ont également été découvertes chez des patients atteints de TDAH. Certaines de ces mutations ont pour conséquence in-vitro un efflux de dopamine à travers DAT (334) entraînant une augmentation de dopamine extracellulaire chez la souris portant ces mutations (335) et par conséquent une hyperactivité de celles-ci. D'autres mutations entraînent quant à elles un recyclage constitutif de DAT (336) perturbant fortement sa localisation et son trafic.

En résumé, ces études ont montré qu'une altération dans l'expression ou la fonction de DAT peut entraîner un risque accru de développement du TDAH, un trouble lié à une signalisation aberrante de la dopamine (337, 338).

3. Implication dans la dépression

Généralement, c'est la sérotonine qui est tenue responsable de la dépression et qui est ciblée par les traitements pharmacologiques actuels contre cette pathologie. Néanmoins, de plus en plus d'études révèlent des liens entre des dérégulations du système dopaminergique et la pathophysiologie de la dépression. En effet, plusieurs symptômes observés chez des patients et des animaux souffrant de dépression, comme l'anhédonie ou l'amotivation, ont été associés à des dysfonctions du système dopaminergique (339-341).

Les modèles animaux utilisés pour étudier la dépression sont basés sur la présentation de facteurs de stress (342). La durée d'action du facteur de stress impacte sur la magnitude et la durée de la réponse dépressive (343, 344).

L'activation aigue du système dopaminergique par l'amphétamine ou par l'activation des neurones dopaminergiques induite par le stress est suivie par une période de dépression (345). De plus, si ces facteurs sont présentés sur une période plus longue, l'état dépressif observé est également maintenu plus longtemps. Des expériences *in vivo* ont également révélé que des rats rendu dépressifs pouvaient retrouver un état normal en suractivant les neurones dopaminergiques de l'ATV (346, 347).

Ainsi, la dopamine semble jouer un rôle important dans le développement de la dépression, mais les mécanismes cellulaires et moléculaires du système dopaminergique impliqués dans son développement restent peu connus.

4. Les drogues psychostimulantes

DAT est la cible principale de nombreux composés, notamment les psychostimulants, les médicaments et les substances neurotoxiques (290, 348). DAT étant le responsable majeur de la recapture de la dopamine, la manipulation pharmacologique de ce transporteur peut entraîner des effets majeurs sur la neurotransmission de la dopamine. Deux psychostimulants classiques qui opèrent en altérant la fonction de DAT sont la cocaïne et l'amphétamine (Figure 14). La cocaïne lie DAT et bloque le transport de la dopamine de l'espace extracellulaire vers le neurone présynaptique (349). La cocaïne est un inhibiteur par compétition du transport de la dopamine car son domaine de liaison chevauche celui de la dopamine (350) résultant au fait que la dopamine s'accumule alors dans l'espace intersynaptique et active de manière aberrante ses récepteurs. A l'inverse, les amphétamines (amphétamine, métamphétamine, MDMA) entrent en compétition avec la dopamine pour entrer dans les cellules dopaminergiques, agissant ainsi comme un substrat pour DAT (351). Une fois à l'intérieur de la cellule, l'amphétamine

perturbe le gradient de protons nécessaire pour le stockage de la dopamine dans les vésicules (352). Ceci entraîne alors une perte de la dopamine depuis les vésicules vers le cytoplasme des neurones présynaptiques. Finalement, l'accumulation de la dopamine cytosolique combinée avec les actions de l'amphétamine sur DAT entraîne un transport inversé de la dopamine, résultant en un efflux de la dopamine intracellulaire vers l'espace extracellulaire. Cette libération de la dopamine par DAT entraîne une augmentation de signalisation de la voie dopaminergique en réponse à l'amphétamine. Alors que la cocaïne et l'amphétamine peuvent occasionner d'autres effets sur le système nerveux central, c'est la perturbation des fonctions de DAT qui augmente la neurotransmission dopaminergique et qui est possiblement à la base des effets psychostimulants (353, 354).

Les drogues modulant l'activité de DAT sont également utilisées pour des usages thérapeutiques dans le traitement de maladies comme le TDAH (328, 355), la dépression (356) et la narcolepsie (357).

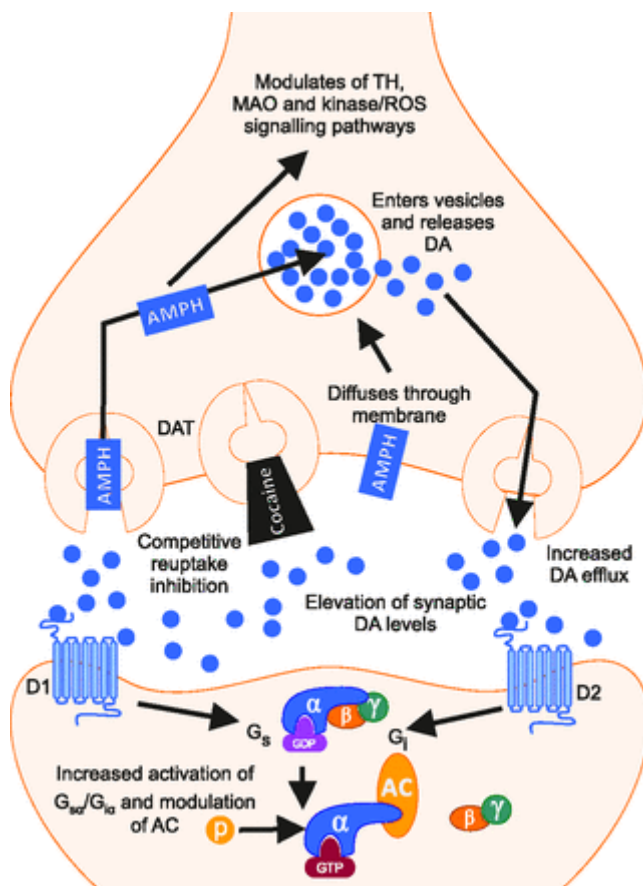


Figure 14. Effets de la cocaïne et de l'amphétamine sur le système dopaminergique (D'après Korpi et al. 2015 (358))

IV. Objectifs de la thèse

L'importance de la MLT n'est plus à démontrer tant elle a de fonctions dans le corps. Néanmoins, nombreux sont les mécanismes les régulant qui restent flous. C'est pourquoi l'objectif général de ma thèse était de préciser les mécanismes d'action du système mélatoninergique lui permettant de réguler les systèmes dopaminergiques et la glycémie.

Comme expliqué dans l'introduction de cette thèse, des liens existent déjà entre les systèmes mélatoninergiques et dopaminergiques mais ils sont mal compris. La mélatonine agissant principalement par l'activation de ses 2 récepteurs MT₁ et MT₂ et les niveaux de dopamine extracellulaire étant régulés en majorité par DAT, nous avons émis comme **première hypothèse** de cette thèse que le système mélatoninergique régule le système dopaminergique par l'interaction des récepteurs MT₁ et MT₂ avec le transporteur DAT.

Dans le but de dévoiler de nouveaux mécanismes d'action du système mélatoninergique nous nous sommes intéressés à sa capacité à réguler les niveaux glycémiques dans le sang. Un polymorphisme positionné au niveau de l'intron du gène *MTNR1B* codant pour MT₂ avait déjà été identifié comme responsable de la dérégulation de l'homéostasie glycémique, augmentant ainsi le risque de développer le DT2. Par conséquent notre groupe avait émis l'hypothèse que des variations de la partie codante pour le récepteur MT₂ pouvaient également entraîner un risque accru de développer le DT2. Le gène codant pour MT₂ chez des personnes normoglycémiques et DT2 avait alors été séquencé et différents variants génétiques de MT₂ avaient été découverts dont certains avaient été reliés avec un risque accru de développer le DT2 avant ma thèse (213). Cette découverte nous a alors mené à la **seconde hypothèse** de ma thèse que la défectuosité de certaines voies de signalisation spécifiques du récepteur MT₂ augmente le risque de développer le DT2.

Nous avons ensuite décidé de comprendre les mécanismes d'action du récepteur MT₁. En effet, les informations rapportées dans la littérature quant à son profil de signalisation sont parfois contradictoires et ses mécanismes d'action restent flous. Nous avons alors émis la **troisième hypothèse** de ma thèse que des variants génétiques naturels de MT₁ permettent de révéler ses mécanismes d'action.

Afin de tester ces 3 hypothèses, nous avons formulé les différents objectifs spécifiques suivants que nous traiterons dans cet ordre :

- 1) Révéler les interactions physiques entre les MTRs et DAT et étudier leur impact sur la fonction du transporteur et le comportement d'animaux.

- 2) Caractériser fonctionnellement les variants génétiques de MT_2 préalablement identifiés et relier la perte de certaines voies de signalisation à un risque accru de développer le DT2.
- 3) Identifier et caractériser des variants génétiques naturels de MT_1 afin de révéler des régions du récepteur spécifiques à l'activation de certaines voies de signalisation.

Chapitre 2

Article 1

**Melatonin receptors limit dopamine reuptake by regulating
dopamine transporter cell-surface exposure**

Abla Benleulmi-Chaachoua*, Alan Hegron*, Marine Le Boulch, Angeliki
Karamitri, Marta Wierzbicka, Victoria Wong, Igor Stagljär, Philippe
Delagrangé, Raise Ahmad, Ralf Jockers

Cellular and Molecular Life Sciences (2018)

Melatonin receptors limit dopamine reuptake by regulating dopamine transporter cell surface exposure

Abla Benleulmi-Chaachoua^{a,b,c,1}, Alan Hegron^{a,b,c,1}, Marine Le Boulch^{a,b,c}, Angeliki Karamitri^{a,b,c}, Marta Wierzbicka^d, Victoria Wong^d, Igor Stajlar^d, Philippe Delagrangé^e, Raise Ahmad^{a,b,c} and Ralf Jockers^{a,b,c,2}

^a Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 Rue Mechain, 75014 Paris, France

^b CNRS UMR 8104, 22 Rue Mechain, 75014 Paris, France

^c Univ. Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 12 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

^d Donnelly Centre, Department of Biochemistry, Department of Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Toronto, 160 College Street, University of Toronto, ON, Canada, M5S 3E1

^e Pôle d'Innovation Thérapeutique Neuropsychiatrie, Institut de Recherches Servier, 125 Chemin de Ronde, 78290 Croissy, France

¹ These authors contributed equally

² Correspondence should be addressed to:

Dr. Ralf Jockers, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris.

Phone: +331 40 51 64 34; Fax: +331 40 51 64 30; e-mail: ralf.jockers@inserm.fr

Running title

Melatonin receptors limit dopamine reuptake

Abstract

Melatonin, a neurohormone released by the pineal gland, has multiple effects in the central nervous system including the regulation of dopamine (DA) levels, but how melatonin accomplishes this task is not clear. Here, we show that melatonin MT₁ and MT₂ receptors co-immunoprecipitate with the DA transporter (DAT) in mouse striatal synaptosomes. Increased DA re-uptake and decreased amphetamine-induced locomotor activity was observed in the striatum of mice with targeted deletion of MT₁ or MT₂ receptors. In vitro experiments confirmed the interactions and recapitulated the inhibitory effect of melatonin receptors on DA re-uptake. Melatonin receptors retained DAT in the endoplasmic reticulum in its immature non-glycosylated form. In conclusion, we reveal one of the first molecular complexes between G protein-coupled receptors (MT₁ and MT₂) and transporters (DAT) in which melatonin receptors regulate the availability of DAT at the plasma membrane thus limiting the striatal DA re-uptake capacity in mice.

Keywords: melatonin/ dopamine/ melatonin receptor/ DAT/ synaptosome

Introduction

The dopamine (DA) transporter DAT is a key regulator of the extrasynaptic DA availability. This transporter mediates DA re-uptake into the nerve terminals, thus preventing dopaminergic hyperactivation. DAT is located on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area, the limbic system, in the prefrontal cortex, and highly expressed in substantia nigra projections ending in the striatum formation [1]. DAT is the unique transporter responsible of DA clearance from the synaptic cleft.

DAT is down-regulated by addictive compounds such as cocaine and amphetamine analogues that cause an over-activation of the dopaminergic circuit, accompanied by enhanced locomotion and reward feelings [2]. Moreover, disruptions of dopamine clearance is associated with a broad spectrum of neuropsychiatric disorders such as Parkinson's disease (PD), schizophrenia and attention-deficit hyperactivity disorder [3-5].

DAT surface expression is one of the limiting factors of the rate of DA uptake. At the level of nerve terminals, DAT expression is maintained in equilibrium between the cell surface and endosomal vesicles [6]. This equilibrium may be modulated by post-translational modifications as well as by protein-protein interactions [7]. Reduced DAT expression has been associated with schizophrenia [8] and is observed in the dopamine transporter deficiency syndrome that is characterized by early infantile-onset progressive parkinsonism dystonia [9].

DAT is known to be phosphorylated in response to the activation of several kinases such as PKC, PI3K, MEK1/2, and p38. DAT also undergoes ubiquitination prior to its down regulation via endocytosis downstream of PKC activation. The target residues of phosphorylation and ubiquitination are mainly located in the N-terminal domain of DAT, the main regulatory domain of the transporter [10-12]. Moreover, DAT activity can be reversed into DA efflux at the cell surface prior to endocytosis as a result of the phosphorylation of N-terminal serine

residues upon PKC activation [13], which can be mediated by amphetamine treatment [14] [15]. Furthermore, DAT was reported to interact with several membrane and cytosolic proteins [16] [17-19]. Some proteins such as GPR37 diminish DA uptake by decreasing the cell surface expression of DAT in mouse synaptosomes [20], others, like the Parkin protein and the DA D2 receptor and the kappa-opioid receptor, increase the uptake by enhancing the cell surface expression of DAT [21,22] [23].

The DA availability at the synaptic cleft is a result of a release and uptake process. Several studies report the role of the neurohormone melatonin in the regulation of DA availability at different regions in the brain [24,25]. Melatonin is a neuro-hormone synthesized by the pineal gland during the night phase and has been shown to regulate various processes including neuronal functions [26,27]. Most of these effects are mediated by two melatonin receptors MT₁ and MT₂ belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) super-family [28]. Melatonin deregulations either at the level of hormone secretion, receptor polymorphisms or expression are associated with a large spectrum of diseases and disorders such as circadian rhythm abnormalities, Parkinson's and Alzheimer's diseases [29,30], attention-deficit hyperactivity disorder [31], schizophrenia [32], and type 2 diabetes [33].

In this study, we evaluate the possible functional and physical interaction between the melatonin and the dopamine system on the level of two membrane-bound components of these systems, namely the melatonin receptors and DAT. Experiments were performed *in vitro* by transfection the different protein components and *in vivo* by detecting DA uptake in striatal synaptosomes and monitoring amphetamine-induced locomotor activity.

Materials and Methods

Compounds

Dihydroxyphenylethylamine-[2,5,6,7,8-3H]-dopamine (NET116000), [N-methyl-3H]WIN-35428 (NET10330) and 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin (NEX2360) were purchased from Perkin Elmer, S77834 was a generous gift from Servier, Nitrocefin (484400) and melatonin (CAS 73-31-4) from Calbiochem, dopamine (H8502) and Nomifensine (N1530) from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfection

HEK293T cells were grown in complete medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 4.5g/L glucose, 100 U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin and 1mM glutamine) (Invitrogen, CA). Transient transfections were performed using JetPEI (Polyplus Transfection, France), according to manufacturer's instructions.

DNA constructs

Myc- and Flag-hDAT were kindly donated from Dr M.E.A. Reith laboratory from New York University School of Medicine - USA [34]; ΔN1-55-Flag-hDAT and YFP-hDAT from Dr T.S. Shippenberg laboratory from the National Institute on Drug Abuse; Baltimore –USA [35]; and β-Lac-hDAT plasmid was from Dr A. Salahpour (University of Toronto) [36].

Membrane Yeast two-hybrid (MYTH) screen

The MYTH screens were done as outlined previously [37]. In short, baits were transformed into a *Saccharomyces cerevisiae* strain by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method as described by [38]. Subsequently, a prey cDNA library in the NubG-X orientation was transformed into these yeast strains containing MT₁ receptors by the same method. Putative interactors were selected by growth on synthetic dropout media

lacking the amino acids tryptophan, leucine, adenine and histidine (SD-WLAH). Prey plasmids were isolated using a commercial DNA isolation kit modified for yeast, followed by transformation and additional amplification in *Escherichia coli*. Final purified plasmids were subjected to sequencing and BLAST analysis, to identify specific interactors. To eliminate spurious interactors, the prey plasmids were once again transformed into yeast harboring MT₁ or an artificial bait (the transmembrane segment of the human T-cell surface glycoprotein CD4 linked to Cub-TF) and interaction was assessed. Any preys that also interacted with the artificial bait were deemed promiscuous and discarded.

Immunoprecipitation and Western blot

Striata from male mice (8-12 weeks old) were homogenized in 7 ml ice-cold 5 mM HEPES, 0.32 M sucrose, pH 7.4 supplemented with protease inhibitors: leupeptine (1 mg/ml), pepstatin (1 mg/ml), benzamidine (2 mg/ml), AEBSF (1 mg/ml); and phosphatase inhibitor: 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF (buffer H) and grind in a potter and centrifuged (800xg; 7 min; 4° C). The supernatant was then centrifuged (9,200xg; 10 min; 4° C). The resultant pellet was resuspended in and then centrifuged (10,000xg; 17 min; 4°C). The pellet obtained contained synaptosomes and was solubilised 4h in the same buffer with 0,5% Brij 96 (Sigma, P6136) at 4° C on wheel and centrifuged (14,000xg; 1h; 4°C). The soluble fraction was subjected to immunoprecipitation using G protein sepharose beads (Sigma) with monoclonal antibodies (2 µg/ml) raised against the carboxyl-terminal tail of mMT₁ or mMT₂ (manuscript in preparation). Pull-down experiments were performed with streptavidin beads (GE Healthcare Life Sciences) in IP buffer (TEM buffer supplemented with 75 mM Tris pH 7.5, 2mM EDTA, 12 mM MgCl₂ with protease inhibitors) overnight. Samples were denatured overnight at room temperature in SDS-PAGE loading buffer (62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, 5% SDS, 10% glycerol, 0.5% bromophenol blue) and the protein separated by SDS-PAGE. Immunoblot analysis were

performed with the indicated antibodies (rabbit anti-DAT antibody (1:800) (AB5802) Millipore preferentially recognizing the mature DAT form and rabbit (H-80) Santa-Cruz (SC14002) preferentially recognizing the immature form and immunoreactivity was revealed using secondary antibodies coupled to 680 or 800 nm fluorophores using the Odyssey LI-COR infrared fluorescent scanner (ScienceTec, France).

BRET measurement

For BRET donor saturation curves, 30000 HEK293T cells were seeded in 96-well white Optiplates (Perkin Elmer Life Sciences) with 0.125 ng of MT₁-Rluc or 1.25 ng of MT₂-Rluc or 0.083 ng of CCR5-Rluc and 0 to 125 ng of DAT-YFP plasmids. Cells were then incubated 48h at 37°C before BRET measurements. Luminescence and fluorescence were measured simultaneously using Plates were read on the Mithras LB 940 with 480±10 nm (Rluc) and 540±20 nm (YFP) emission filters and BRET ratios calculated as above.

Synaptosomal preparation

Synaptosomes from striatum, hypothalamus and cortex of male mice (8-12 weeks old) were prepared as described in [39]. Briefly, tissues were homogenized in a buffer containing 320 mM sucrose, 5 mM HEPES, and protease inhibitors. After centrifugation at 2,000xg for 8 minutes, the supernatant was centrifuged at 30,000 g for 30 minutes. The resulting synaptosomal pellet was kept at 4°C and used for subsequent analysis within 4 hours.

DA uptake and β-CFT binding

HEK293T cells were transfected in poly-L-Lysine coated 24 well plates. 48 h post-transfection, cells were washed with uptake buffer (5 mM Tris-HCl, 7.5 mM HEPES, 120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM D-glucose, and 1 mM ascorbic acid; pH 7.2)

and incubated for 5 minutes with 20 nM of [³H]-Dopamine. The uptake was terminated by two washes with ice-cold uptake buffer, and lysed in 0.5 ml of 1% SDS. Measurement was performed using scintillation counter. For synaptosomal DA uptake, 100 µg of proteins were subjected to DA uptake test for 5 min, Uptake was stopped by addition of 3 ml of ice-cold uptake buffer, followed by rapid filtration through Whatman filters and two additional rinses. The DA uptake kinetic test was performed in the presence of a fixed concentration of [³H]-dopamine (20 nM) and increasing DA concentrations as indicated. β-CFT binding was performed in the presence of 4 nM of [³H]WIN-35428 for 30 min at room temperature. Nonspecific binding was assessed with 25 nM of nomifensine.

β-lactamase assay

The β-lactamase assay was performed as previously described in (33) with minor modifications. Briefly, cells were plated into individual wells of a poly-D-lysine-coated 96-well plate. The assay was performed 24h after plating. Cells were treated or not with PMA (1µM) for 30min at 37°C and then incubated with the β-lactamase substrate nitrocefin. Absorbance at 492 nm was measured immediately and then every 5 minutes for 30 min in a microplate spectrophotometer. The reaction rate (slope of the curve in the linear range) was taken as the readout for this assay.

¹²⁵I-MLT binding

The assay was performed as previously described [40].

Homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF)-based cAMP assay

cAMP levels were determined in HEK293T cells by *HTRF* using the “cAMP femto2” kit (Cisbio, Bagnols-sur-Cèze, France) as previously described [41].

Hyperactivity induced by D-Amphetamine

Activity of male mice (8-12 weeks old) was measured in eight open-fields (actimeters) which are Plexiglas transparent open-box (42 cm L, 42 cm W, 40 cm H). The distance travelled (horizontal activity) was recorded with infrared photobeams detection systems (Acti-track, LSI Leticca, Panlab). Open-fields were placed in four independent compartments, under a dim light (10 Lux). Within each compartment, open-fields were visually isolated from the experimental room.

Animals were individually placed in the open-fields and allowed to move freely for a 90-min session. Their distance travelled was recorded all long and at T30 min, D-Amphetamine (3mg/kg) or vehicle were injected intraperitoneally to mice. The data collected was the spontaneous locomotor activity (SLA) taking in account the distance travelled during the 30 min period before the injection of D-Amphetamine or its vehicle and the distance travelled during the 60 min period following the injection.

Immunofluorescence

HeLa cells were fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. Cells were incubated with anti-myc rabbit polyclonal (Santa-Cruz sc-789) or anti-myc mouse monoclonal (Santa-Cruz sc-40) antibodies or anti-HA mouse monoclonal (Biolegend MMS-101P) or anti-HA rabbit polyclonal (Cell Signaling #3724) antibodies, followed by staining with TRITC or FITC-conjugated secondary antibodies (Biotium) in the presence of DAPI. Images were taken with a microscope ZEISS Observer Z1 with the lense PLAN FLUOR 100x and analysed by Image J software.

Statistical analysis

Results were analyzed by PRISM (GraphPad Software). Data are expressed as mean \pm SEM of at least 3 experiments. One sample t test and one way ANOVA test with Dunnett's multiple comparisons test were applied for statistical analysis.

Results

Identification of DAT/ melatonin MT₁ receptor complexes with MYTH

In order to identify proteins interacting with the human melatonin MT₁ receptor, we applied the recently modified split-ubiquitin Membrane Yeast Two-Hybrid (MYTH) technique [37]. Full-length receptors were N-terminally tagged with the yeast mating factor α to encourage plasma membrane localization and C-terminally tagged with half of ubiquitin (Cub) fused to an artificial transcription factor comprising LexA and VP16. Successful cell surface expression of melatonin receptors in yeast was monitored by immunofluorescence microscopy. Screens were performed in duplicate against recombinant NubG-prey of human fetal brain cDNA library, a tissue known to express MT₁ receptors [42]. Forty-seven high-quality interactions were retained after deleting false positive candidates interacting with an artificial bait, the transmembrane segment of the human T-cell surface glycoprotein CD4 linked to Cub-TF [43]. Among these proteins was DAT that interacted with MT₁ receptors (2 clones with 330/620 amino acids) (Table 1).

Melatonin MT₁ and MT₂ receptors interact with DAT in mouse striatum and HEK293T cells

To confirm the existence of DAT/melatonin receptor complexes in the mouse brain, we isolated the synaptosomal fraction of the hypothalamus, striatum and cortex from C57BL/6 mice. In agreement with previous reports, our pilot experiments showed highest DAT expression and

³H-DA uptake in the striatum followed by the cortex and hypothalamus (Figure 1A-B) [44]. Expression of melatonin receptors was monitored in 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin (¹²⁵I-MLT) binding experiments and found to be highest in the hypothalamic followed by the striatal and the cortical synaptosomes (Figure 1C). Based on these findings, the striatum was used for the following experiments. Immunoprecipitation of MT₁ and MT₂ from lysates of striatal synaptosomes with monoclonal antibodies recognizing specifically the mouse MT₁ and MT₂ revealed the presence of both receptors in precipitates of WT but not mice with targeted deletion of MT₁ or MT₂ (MT₁-KO; MT₂-KO), respectively (Figure 1D-E, middle panels). Western blotting of precipitates with anti-DAT antibodies, recognizing predominantly the mature form migrating at a molecular weight of 80 kDa over the immature non-glycosylated 55 kDa form [21] showed a strong band at 55 kDa but none at 80 kDa suggesting an enrichment of the immature form of DAT in MT₁ precipitates and to a lesser extent in MT₂ precipitates (Figure 1D-E, left upper panels). As the 55 kDa form of DAT was largely undetectable in lysates with this antibody, we wanted to confirm the identity of the DAT band in precipitates with a second antibody recognizing predominantly the immature form (anti n.g. DAT) (SC14002). The 55 kDa band was once again detected with this antibody in MT₁ precipitates validating the interaction of MT₁ with the immature form of DAT (Figure 1D, right upper panel). We were unable to confirm the 55 kDa band in MT₂ precipitates, most likely because the amount of precipitated DAT was below the detection limit of this antibody (Figure 1E, right upper panel).

To further confirm these interactions, we performed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) donor saturation experiments in cells transfected with the *Renilla* luciferase (Rluc) energy donor fused to the C-terminus of MT₁ and MT₂ and the yellow fluorescent protein (YFP) energy acceptor fused to the N-terminus of DAT. The chemokine receptor CCR5-Rluc fusion protein was included as a negative control and the respective MT₁ and MT₂ homodimer combinations as positive controls. The co-expression of a fixed amount of Rluc fusion proteins

and increasing amounts of YFP-DAT resulted in the expected hyperbolic curve [45,46] reaching an asymptote indicating specific interactions between DAT and MT₁ and MT₂, similarly to the previously reported MT₁ and MT₂ homodimers [47] (Figure 2A, B). Colocalization of DAT with MT₁ and MT₂ in transfected HeLa cells further confirmed the close proximity of DAT and melatonin receptors (Figure 2C; Supplementary Figure 1A). Taken together, co-IP, BRET and colocalization experiments provide evidence that DAT interacts with MT₁ and MT₂ in striatal synaptosomes and transfected cells.

Melatonin receptors decrease dopamine uptake through DAT

In order to explore potential consequences of melatonin receptors on DAT function, we measured DA uptake in HEK293T cells expressing DAT in the absence or presence of receptors. Expression of MT₁ and MT₂ decreased DA uptake by 59 ± 5.9 and 26 ± 2.8 % (n=3), respectively (Figure 3A). In agreement with previous reports, co-expression of GPR37 decreased DA uptake by 14 ± 1.6 % (n=3) [20], while the presence of another GPCR, the CCR5 receptor, and the 4-transmembrane-spanning endospalin-1 protein, known to regulate the cell surface expression of other membrane receptors [48], did not affect the DAT-promoted DA uptake (Figure 3A). Expression of comparable quantities of DAT and successful expression of the various GPCRs and endospalin-1 was confirmed in total cell lysates by (Figure 3A inset, Supplementary Figure 1B). Pre-incubation with melatonin (1 μ M) for 30 minutes did not modulate the inhibitory effect of MT₁ and MT₂ receptors on DA uptake in HEK293T cells and striatal synaptosomes (Figure 3B,C). The absence of effect of melatonin was confirmed in concentration-response experiments in striatal synaptosomes (Supplementary Figure 1C). Shorter or longer pre-incubation times with melatonin (1 μ M) were also without effect (not shown).

Inactivation of $G_{i/o}$ and $G_{q/11}$ proteins, known to be activated by melatonin receptors [49], with pertussis toxin (PTX) or YM-254890, respectively, was unable to abolish the inhibitory effect of melatonin receptors on DA uptake arguing against the involvement of constitutive receptor activity in this effect (Supplementary Figure 1D,E). This was further confirmed by treating HEK293 cells with the melatonin receptor inverse agonist S77834 [50], which was also unable to elevate the inhibition of DA uptake (Figure 3B). S77834 was similarly ineffective in modifying the basal DA uptake in striatal synaptosomes of WT mice (Figure 3C). Successful inhibition of constitutive MT_1 and MT_2 receptor activity by S77834 under these conditions was shown in the cAMP accumulation assay (Supplementary Figure 1F).

The N-terminus of DAT (amino acids 1-62) plays a key role in DAT function because it undergoes various post-translational modifications leading to DAT down-regulation [10,12]. It serves as a protein-protein interaction platform for syntaxin 1A [51], synaptogrin-3 [52] and possibly also for dopamine D2 receptors [22,35]. Pull-down experiments between MT_1 and MT_2 receptors and a DAT mutant deleted of the first 55 amino acids [35] (ΔN -Flag-DAT) showed that the N-terminal DAT domain is not necessary for the interaction with melatonin receptors (Supplementary Figure 1G). Consistently, a similar inhibition pattern of DA uptake by melatonin receptors was also observed for the ΔN -Flag-DAT mutant at similar DAT expression levels (Figure 3D, Supplementary Figure 1H).

To confirm our *in vitro* finding we measured DA uptake in striatal synaptosomes of MT_1 -KO and MT_2 -KO mice. DA uptake was readily measurable in synaptosomal preparations of WT mice containing all the necessary elements for the transport of neurotransmitters thus reliably reflecting *in vivo* conditions [39]. DA uptake was doubled in MT_1 -KO and in MT_2 -KO mice (Figure 3E). This enhanced DA transport capacity is not accompanied by increased DAT expression levels as monitored by western blot in synaptosomal lysates (Figure 3E).

Altogether, these results show that melatonin receptors inhibit DA uptake through DAT in transfected HEK293T cells and mice striatal synaptosomes and that this effect is not regulated by melatonin receptor activation or constitutive activity and does not involve the regulatory N-terminal domain of DAT.

Melatonin receptors decrease DAT cell surface expression

Regulation of DAT-promoted DA uptake may be due to either a modulation of the affinity of DA for DAT or to a modification of DAT cell surface expression [21]. Kinetic analysis of DAT-mediated DA uptake showed that K_m values were similar in HEK293T cells expressing DAT alone ($1.57 \pm 0.15 \mu\text{M}$) or coexpressing DAT and MT_1 ($1.07 \pm 0.49 \mu\text{M}$) or MT_2 ($1.49 \pm 0.31 \mu\text{M}$) (Figure 4A). K_m values were comparable to those measured in previous studies [53]. Maximal DA uptake rates (V_{max}) were significantly decreased in cells coexpressing DAT with MT_1 ($78.39 \pm 14.17 \text{ fmol/mg/min}$) or MT_2 ($138.20 \pm 12.43 \text{ fmol/mg/min}$) as compared to cells expressing DAT alone as expected ($222.20 \pm 9.38 \text{ fmol/mg/min}$) ($N=3$; $p\text{-value} < 0.001$). Altogether, these results exclude an effect of melatonin receptors on the affinity of DA for DAT.

To assess the impact of melatonin receptors on DAT cell surface expression, we determined the number of DAT at the cell surface with the radiolabeled cocaine analogue $\beta\text{-CFT}$ [N-methyl- ^3H]WIN-35428. A drop of 50-70% in WIN-35428 binding sites was observed in cells coexpressing either MT_1 or MT_2 (Figure 4B). Similar effects were observed in cells coexpressing DAT and GPR37 recapitulating previously reported results (Figure 4B) [20]. Expression of the negative control receptor CCR5 had no influence on the number of WIN-35428 binding sites (Figure 4B). For all conditions, the total amount of expressed DAT did not change (Figure 4B, inset). Collectively, these data suggest that melatonin receptors limit the number of DAT expressed at the cell surface.

Melatonin receptors retain DAT in the biosynthetic pathway

Decreased DAT cell surface expression might result from higher internalization or lower export of DAT in the presence of melatonin receptors. DAT internalization is known to be dependent on protein kinase C (PKC) activation, directly by phosphorylating DAT or indirectly by mediating its ubiquitination [7]. Treatment of HEK293T cells for 30 minutes with the potent PKC activator, phorbol myristate ester (PMA) [54] caused the expected decrease of DAT cell surface expression of 60% and this effect was not significantly modified by the coexpression of melatonin receptors (Figure 4C).

To explore the influence of melatonin receptors on the retention of DAT in the biosynthetic pathway, cell lysates were analyzed by western blot for the presence of the immature, intracellular (55kDa) DAT form and the mature, cell surface located (80kDa) form. In the presence of melatonin receptors, an enrichment of the immature DAT form was observed, consistent with the retention of DAT in intracellular compartments under this condition (Figure 4D). Before further investigations on where this retention occurs, we checked the presence of Golgi and endoplasmic reticulum in our synaptosomal preparations using antibodies against 58K marker and calnexine, respectively (Supplementary Figure 3). Then colocalization of DAT with calnexine was only observed in cells expressing MT₁ or MT₂ further confirmed the intracellular retention of DAT in the presence of melatonin receptors (Figure 4E). No colocalization was observed with the 58K Golgi marker and the GM130 cis-Golgi marker (Supplementary Figure 2A, B).

Taken together, co-expression of melatonin receptors with DAT decreases its cell surface expression by retaining DAT in the endoplasmic reticulum of the biosynthesis pathway. This observation is also consistent with the co-immunoprecipitation of the immature, intracellular form of DAT with melatonin receptors in the striatum.

Mice lacking melatonin receptors are less sensitive to amphetamine-induced locomotion

MT₁-KO and MT₂-KO mice show increased DA uptake capacity in striatal synaptosomes. Therefore, we predicted decreased synaptic DA concentrations and decreased locomotor activity in these mice. Thus, we measured amphetamine-induced locomotor activity in WT and KO mice (Figure 5A-C). Whereas basal locomotor activity in all three mouse strains was similar, amphetamine-induced locomotor activity was decreased by half in MT₁-KO and MT₂-KO mice compared to WT mice. Amphetamine showed a similar affinity for DAT in striatal synaptosomes prepared from WT and MT₁-KO and MT₂-KO mice excluding the possibility that reduced amphetamine-induced locomotor activity is not due to decreased affinity of amphetamine for DAT (Figure 5D).

Discussion

In this study, we report that melatonin receptors inhibit DA uptake by diminishing the cell surface expression of DAT in a complex containing melatonin receptors and DAT. This conclusion is supported by *in vitro* studies in HEK293T cells and *in vivo* studies in melatonin receptor KO mice including co-immunoprecipitations, DA uptake and locomotor activity.

Initially, DAT was identified as a potential binding partner of the MT₁ receptor in a MYTH screen suggesting the binary character of the interaction and arguing towards the complex formed between MT₁ and DAT. The high sequence homology of MT₁ with MT₂ prompted us to consider also the second melatonin receptor for which we observed indeed similar results as for MT₁ receptors: formation of protein complexes and a decrease in DA uptake, although to a lesser extent. K_m values for DA were similar suggesting unmodified DA transport capacity of DAT in the presence of melatonin receptors. In contrast, maximal transport levels were significantly reduced. Stimulation of MT₁ and MT₂ with a saturating concentration of melatonin did not modify this effect. The inability of the melatonin receptor inverse agonist S77834 to

prevent the inhibitory effect of MT₁ and MT₂ on DA uptake excludes also the involvement of constitutive receptor activity in this effect. Both, melatonin and S77834 were also ineffective in altering the DA uptake in isolated striatal synaptosomes. Similarly, the absence of effect of melatonin and S77834 argues against a direct allosteric effect of melatonin receptors in the common complex. Taken together, melatonin receptors inhibit the maximal DA uptake capacity of the DAT independently of the activation state of melatonin receptors.

Regulation of DAT surface expression has been previously identified as a limiting parameter that regulates DA uptake. Our results indicate that the decreased DA uptake capacity in the presence of MT₁ and MT₂ is caused by the retention of DAT in intracellular compartments. This is supported by the retention of DAT in the ER of HEK293T cells co-expressing MT₁ or MT₂, the enrichment of the immature, intracellular form of DAT under these conditions and the co-immunoprecipitation of the immature 55 kDa form of DAT with melatonin receptors in the striatum. Although the precise molecular species of DAT engaged with its interacting partners was not always reported, in many cases the mature form of DAT seems to be involved. Interestingly, co-immunoprecipitation experiments between snapin and DAT in the striatum suggest the involvement of the immature form of DAT, similar to our findings [55]. The interaction with the non-glycosylated form of DAT is interesting as DAT activity depends not only on its membrane expression but also on its glycosylation status as shown *in vitro* and by the differential vulnerability of midbrain DA cells in Parkinson's disease [56].

The dopamine D2 receptor has been shown to increase DA uptake as a consequence of enhanced DAT cell surface expression possibly involving reduced membrane endocytosis and increased in membrane exocytosis [22,35]. Furthermore, in striatum, activation of the kappa-opioid receptor increased the V_{max} for DAT mediated DA transport and DAT surface expression most likely by forming a molecular protein complex [23]. In the case of the ubiquitine ligase E3 Parkin increased DAT cell surface localization is achieved but by an alternative mechanism.

Actually, correctly folded DAT is stabilized by oligomerization during biosynthesis in the endoplasmic reticulum, a process that is also necessary for efficient translocation of DAT to the cell surface [57]. Importantly, incorrectly folded DAT protomers have dominant negative effects on the WT in these oligomers and inhibit the cell surface delivery of DAT. Parkin is shown to enhance the selective ubiquitination (and thus degradation) of the miss-folded and/or unglycosylated DAT and cause the increase in the cell surface expression of mature forms of DAT.

The striatum expresses abundant amounts of DAT. The expression and function of melatonin receptors is much less established in this brain region. Uz *et al.* demonstrated in single-cell PCR experiments that the mRNA coding for the MT₁ receptor localizes all over the central dopaminergic system including the ventral tegmental area, the substantia nigra and the striatum. Localization of mRNA in the substantia nigra strongly suggests that the protein is expressed in the neuron terminals projecting in the striatum confirming our result [58]. Our finding of ¹²⁵I-MLT binding sites in the striatum (this report and [59]) confirms these results on the protein level. Interestingly, MT₁ is part of a presynaptic protein network including synapsin, SNAP25 and 47, the voltage-gated calcium channel Cav2.2, Munc-18, rabphilin and snapin to which DAT has now to be added [59].

Our study shows that MT₁ and MT₂ have a negative role on the capacity of DAT for DA reuptake. The presence of melatonin receptors could thus protect neurons from intensive DA reuptake. DA is known to form reactive oxygen species through enzymatic degradation. Elevated rate of intra-neuronal DA would thus increase the degeneration of the dopaminergic neurons characterized in several neurodegenerative illnesses as in Parkinson's disease where melatonin receptors are concomitantly down-regulated [29,60]. Intriguingly, the effect of MT₁ and MT₂ on DA uptake appears to be completely independent on stimulation of these receptors by melatonin or any constitutive receptor activity. This conclusion is further supported by the

observation that ip injection of melatonin had no significant effect on amphetamine-induced locomotor activity in rats [61].

Melatonin represents the most reliable readout of the circadian rhythm of the biological master clock. According to our results, variation of melatonin levels along the circadian cycle are unlikely to impact on DAT function and the formation of the melatonin receptor DAT complex. In contrast, variation of MT₁ and MT₂ receptor levels might be important as they are submitted to a circadian regulation due to a negative feed-back loop that exists between melatonin and the expression of its receptors [62]. This regulatory mechanism might be just one component of a complex network of circadian regulation of the dopaminergic system that involves circadian variation of DA levels itself, dopamine D2 and D4 receptors and diurnal rhythms in quinpirole-induced locomotor behaviors [63-65]. In turn, DA has also been shown to regulate major components of the central circadian clock mechanism like Per2 expression in the dorsal striatum [66]. Melatonin has been suggested to modify the dopaminergic system through additional, receptor-independent, mechanisms. Long-term treatment with melatonin prevented DAT down-regulation in a rotenone-induced PD model [67] and a model of amphetamine-induced hippocampal damage [68], most likely through its antioxidant properties.

Taken together, our findings establish a new relationship between melatonin receptors and the control of extracellular DA levels by regulating the DA transport capacity of DAT, particularly in the striatum, as indicated by the enhanced DA uptake in striatal synaptosomes of MT₁-KO and MT₂-KO mice. Given the fact that DAT activity is considered to reflect the general state of dopaminergic circuit, and DAT alterations go together with dopaminergic deregulations in many diseases such as Parkinson's disease [3] and depression [69], our findings warrant further investigation.

Acknowledgments

We thank Drs. Michel Bouvier and Bianca Plouffe (University of Montréal) for continues support and advice in BRET experiments, respectively, Anne-Sophie Journé (Institut Cochin) for her implication in mice breeding and expert advice in BRET and Dr. S. Doly (Institut Cochin) for critical comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Fondation Recherche Médicale (Equipe FRM FRM DEQ20130326503 to R.J.), Inserm, CNRS and the Who am I? laboratory of excellence No.ANR-11-LABX-0071 funded by the French Gouvernement through its “Investments for the Future” program operated by The French National Research Agency (ANR) under grant No.ANR-11-IDEX-0005-01.

Author Contributions

A.B., A.H., M.L.B., A.K., M.W., V.W. and R.J. performed research and/or analyzed data, R.J., A.B. and A.H. wrote the manuscript; I.S. and P.D. reviewed and/or edited the manuscript and contributed to discussion; P.D. and R.J. managed the project.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bjorklund A, and Dunnett SB (2007) Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci* 30:185-187
2. O'Neill B, Tilley MR, Han DD, Thirtamara-Rajamani K, Hill ER, Bishop GA, Zhou FM, During MJ, and Gu HH (2014) Behavior of knock-in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter after virogenetic restoration of cocaine sensitivity in the striatum. *Neuropharmacology* 79:626-633
3. Ishibashi K, Oda K, Ishiwata K, and Ishii K (2014) Comparison of dopamine transporter decline in a patient with Parkinson's disease and normal aging effect. *J Neurol Sci* 339:207-209
4. Laakso A, Bergman J, Haaparanta M, Vilkmann H, Solin O, Syvalahti E, and Hietala J (2001) Decreased striatal dopamine transporter binding in vivo in chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 52:115-120
5. Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, and Fischman AJ (1999) Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 354:2132-2133
6. German CL, Hanson GR, and Fleckenstein AE (2012) Amphetamine and methamphetamine reduce striatal dopamine transporter function without concurrent dopamine transporter relocalization. *J Neurochem* 123:288-297
7. Eriksen J, Jorgensen TN, and Gether U (2010) Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. *J Neurochem* 113:27-41
8. Markota M, Sin J, Pantazopoulos H, Jonilionis R, and Berretta S (2014) Reduced dopamine transporter expression in the amygdala of subjects diagnosed with schizophrenia. *Schizophr Bull* 40:984-991
9. Ng J, Zhen J, Meyer E, Erreger K, Li Y, Kakar N, Ahmad J, Thiele H, Kubisch C, Rider NL, Morton DH, Strauss KA, Puffenberger EG, D'Agnano D, Anikster Y, Carducci C, Hyland K, Rotstein M, Leuzzi V, Bork G, Reith ME, and Kurian MA (2014) Dopamine transporter deficiency syndrome: phenotypic spectrum from infancy to adulthood. *Brain* 137:1107-1119
10. Lin Z, Zhang PW, Zhu X, Melgari JM, Huff R, Spieldoch RL, and Uhl GR (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and MEK1/2 kinase regulation of dopamine transporters (DAT) require N-terminal DAT phosphoacceptor sites. *J Biol Chem* 278:20162-20170
11. Miranda M, Wu CC, Sorkina T, Korstjens DR, and Sorkin A (2005) Enhanced ubiquitylation and accelerated degradation of the dopamine transporter mediated by protein kinase C. *J Biol Chem* 280:35617-35624
12. Miranda M, Dionne KR, Sorkina T, and Sorkin A (2007) Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Mol Biol Cell* 18:313-323
13. Cowell RM, Kantor L, Hewlett GH, Frey KA, and Gnegy ME (2000) Dopamine transporter antagonists block phorbol ester-induced dopamine release and dopamine transporter phosphorylation in striatal synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 389:59-65
14. Khoshbouei H, Sen N, Guptaroy B, Johnson L, Lund D, Gnegy ME, Galli A, and Javitch JA (2004) N-terminal phosphorylation of the dopamine transporter is required for amphetamine-induced efflux. *PLoS Biol* 2:E78

15. Sitte HH, and Freissmuth M (2015) Amphetamines, new psychoactive drugs and the monoamine transporter cycle. *Trends Pharmacol Sci* 36:41-50
16. Torres GE (2006) The dopamine transporter proteome. *J Neurochem* 97 Suppl 1:3-10
17. Kivell BM, Kahlig K, Galli A, Javitch JA, and Shippenberg TS. (2004) Regulation of Dopamine Transporter Function and Cell Surface Expression by Kappa Opioid Receptors. . in *34th Annual meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego
18. Bolan EA, Shan L, Devi LA, Javitch JA, and Shippenberg TS. (2004) Regulation of Dopamine Transporter Function by Kappa-Opioid Receptors: Role of Protein Trafficking. in *34th Annual meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego
19. Pei L, Lee F, Mirecki A, Zou S, Zhang H, Vukusic B, and Liu F. (2004) Regulation of Dopamine Transporter Function by Dopamine D2 Receptors. . in *34th Annual meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego
20. Marazziti D, Mandillo S, Di Pietro C, Golini E, Matteoni R, and Tocchini-Valentini GP (2007) GPR37 associates with the dopamine transporter to modulate dopamine uptake and behavioral responses to dopaminergic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9846-9851
21. Jiang H, Jiang Q, and Feng J (2004) Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *J Biol Chem* 279:54380-54386
22. Lee FJ, Pei L, Moszczynska A, Vukusic B, Fletcher PJ, and Liu F (2007) Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *EMBO J* 26:2127-2136
23. Kivell B, Uzelac Z, Sundaramurthy S, Rajamanickam J, Ewald A, Chefer V, Jaligam V, Bolan E, Simonson B, Annamalai B, Mannangatti P, Prisinzano TE, Gomes I, Devi LA, Jayanthi LD, Sitte HH, Ramamoorthy S, and Shippenberg TS (2014) Salvinorin A regulates dopamine transporter function via a kappa opioid receptor and ERK1/2-dependent mechanism. *Neuropharmacology* 86:228-240
24. Zisapel N, Egozi Y, and Laudon M (1982) Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res* 246:161-163
25. Escames G, Acuna Castroviejo D, and Vives F (1996) Melatonin-dopamine interaction in the striatal projection area of sensorimotor cortex in the rat. *Neuroreport* 7:597-600
26. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, and Olcese J (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62:343-380
27. Jockers R, Delagrange P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, Cecon E, and Zlotos DP (2016) Update on Melatonin Receptors. *IUPHAR Review. Br J Pharmacol* 173:2702-2725
28. Zlotos DP, Jockers R, Cecon E, Rivara S, and Witt-Enderby PA (2014) MT1 and MT2 Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. *J Med Chem* 57:3161-3185
29. Adi N, Mash DC, Ali Y, Singer C, Shehadeh L, and Papapetropoulos S (2010) Melatonin MT1 and MT2 receptor expression in Parkinson's disease. *Med Sci Monit* 16:BR61-67
30. Brunner P, Sozer-Topcular N, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Eckert A, Muller-Spahn F, and Savaskan E (2006) Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *Eur J Histochem* 50:311-316
31. Bendz LM, and Scates AC (2010) Melatonin treatment for insomnia in pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Ann Pharmacother* 44:185-191

32. Monteleone P, Natale M, La Rocca A, and Maj M (1997) Decreased nocturnal secretion of melatonin in drug-free schizophrenics: no change after subchronic treatment with antipsychotics. *Neuropsychobiology* 36:159-163
33. Karamitri A, Renault N, Clement N, Guillaume JL, and Jockers R (2013) Minireview: Toward the establishment of a link between melatonin and glucose homeostasis: association of melatonin MT2 receptor variants with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol* 27:1217-1233
34. Chen N, and Reith ME (2008) Substrates dissociate dopamine transporter oligomers. *J Neurochem* 105:910-920
35. Bolan EA, Kivell B, Jaligam V, Oz M, Jayanthi LD, Han Y, Sen N, Urizar E, Gomes I, Devi LA, Ramamoorthy S, Javitch JA, Zapata A, and Shippenberg TS (2007) D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and 2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism. *Mol Pharmacol* 71:1222-1232
36. Lam VM, Beerepoot P, Angers S, and Salahpour A (2013) A novel assay for measurement of membrane-protein surface expression using a beta-lactamase. *Traffic* 14:778-784
37. Snider J, Kittanakom S, Damjanovic D, Curak J, Wong V, and Stagljar I (2010) Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nat Protoc* 5:1281-1293
38. Gietz RD, and Woods RA (2006) Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* 313:107-120
39. Gainetdinov RR, Fumagalli F, Wang YM, Jones SR, Levey AI, Miller GW, and Caron MG (1998) Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *J Neurochem* 70:1973-1978
40. Guillaume JL, Daulat AM, Maurice P, Levoye A, Migaud M, Brydon L, Malpoux B, Borg-Capra C, and Jockers R (2008) The PDZ protein muppl promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor. *J Biol Chem* 283:16762-16771
41. Cecon E, Chen M, Marcola M, Fernandes PA, Jockers R, and Markus RP (2015) Amyloid beta peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway. *FASEB J* 29:2566-2582
42. Thomas L, Purvis CC, Drew JE, Abramovich DR, and Williams LM (2002) Melatonin receptors in human fetal brain: 2-[I-125] iodomelatonin binding and MT1 gene expression. *Journal Of Pineal Research* 33:218-224
43. Huang X, Dai FF, Gaisano G, Giglou K, Han J, Zhang M, Kittanakom S, Wong V, Wei L, Showalter AD, Sloop KW, Stagljar I, and Wheeler MB (2013) The identification of novel proteins that interact with the GLP-1 receptor and restrain its activity. *Mol Endocrinol* 27:1550-1563
44. Meister B, and Elde R (1993) Dopamine transporter mRNA in neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 58:388-395
45. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, and Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1 and beta 2-adrenergic receptor homo and hetero-dimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277:44925-44931
46. Couturier C, and Jockers R (2003) Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *J Biol Chem* 278:26604-26611
47. Ayoub MA, Levoye A, Delagrangé P, and Jockers R (2004) Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol* 66:312-321
48. Couturier C, Sarkis C, Seron K, Belouzard S, Chen P, Lenain A, Corset L, Dam J, Vauthier V, Dubart A, Mallet J, Froguel P, Rouille Y, and Jockers R (2007) Silencing

- of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19476-19481
49. Brydon L, Roka F, Petit L, deCoppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, and Jockers R (1999) Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(I2), G(I3), and G(Q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 13:2025-2038
 50. Devavry S, Legros C, Brasseur C, Delagrance P, Spadoni G, Cohen W, Malpaux B, Boutin JA, and Nosjean O (2012) Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT(1) and hMT(2) and discovery of inverse agonists. *J Pineal Res* 53:29-37
 51. Binda F, Dipace C, Bowton E, Robertson SD, Lute BJ, Fog JU, Zhang M, Sen N, Colbran RJ, Gnegy ME, Gether U, Javitch JA, Erreger K, and Galli A (2008) Syntaxin 1A interaction with the dopamine transporter promotes amphetamine-induced dopamine efflux. *Mol Pharmacol* 74:1101-1108
 52. Egana LA, Cuevas RA, Baust TB, Parra LA, Leak RK, Hochendoner S, Pena K, Quiroz M, Hong WC, Dorostkar MM, Janz R, Sitte HH, and Torres GE (2009) Physical and functional interaction between the dopamine transporter and the synaptic vesicle protein synaptogyrin-3. *J Neurosci* 29:4592-4604
 53. Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T, and Caron MG (1992) Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol* 42:383-390
 54. Huff RA, Vaughan RA, Kuhar MJ, and Uhl GR (1997) Phorbol esters increase dopamine transporter phosphorylation and decrease transport Vmax. *J Neurochem* 68:225-232
 55. Erdozain AM, De Gois S, Bernard V, Gorgievski V, Pietrancosta N, Dumas S, Macedo CE, Vanhoutte P, Ortega JE, Meana JJ, Tzavara ET, Vialou V, and Giros B (2018) Structural and Functional Characterization of the Interaction of Snapin with the Dopamine Transporter: Differential Modulation of Psychostimulant Actions. *Neuropsychopharmacology* 43:1041-1051
 56. Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Alvarez de la Rosa D, Abreu P, Giraldez T, Castro-Hernandez J, Salas-Hernandez J, Lanciego JL, Rodriguez M, and Gonzalez-Hernandez T (2009) Dopamine transporter glycosylation correlates with the vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 36:494-508
 57. Sorkina T, Doolen S, Galperin E, Zahniser NR, and Sorkin A (2003) Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J Biol Chem* 278:28274-28283
 58. Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y, Pandey GN, and Manev H (2005) The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res* 136:45-53
 59. Benleulmi-Chaachoua A, Chen L, Sokolina K, Wong V, Jurisica I, Emerit MB, Darmon M, Espin A, Stagljar I, Tafelmeyer P, Zamponi GW, Delagrance P, Maurice P, and Jockers R (2016) Protein interactome mining defines melatonin MT1 receptors as integral component of presynaptic protein complexes of neurons. *J Pineal Res* 60:95-108
 60. Haavik J, Almas B, and Flatmark T (1997) Generation of reactive oxygen species by tyrosine hydroxylase: a possible contribution to the degeneration of dopaminergic neurons? *J Neurochem* 68:328-332
 61. Palaoglu S, Palaoglu O, Akarsu ES, Ayhan IH, Ozgen T, and Erbenig A (1994) Behavioural assessment of pinealectomy and foetal pineal gland transplantation in rats: Part II. *Acta Neurochir (Wien)* 128:8-12

62. Poirel VJ, Masson-Pevet M, Pevet P, and Gauer F (2002) MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 946:64-71
63. Akhisaroglu M, Kurtuncu M, Manev H, and Uz T (2005) Diurnal rhythms in quinpirole-induced locomotor behaviors and striatal D2/D3 receptor levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 80:371-377
64. Ikeda E, Matsunaga N, Kakimoto K, Hamamura K, Hayashi A, Koyanagi S, and Ohdo S (2013) Molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of dopamine D3 receptor expression in mouse ventral striatum. *Mol Pharmacol* 83:959-967
65. Gonzalez S, Moreno-Delgado D, Moreno E, Perez-Capote K, Franco R, Mallol J, Cortes A, Casado V, Lluís C, Ortiz J, Ferre S, Canela E, and McCormick PJ (2012) Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D(4) receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. *PLoS Biol* 10:e1001347
66. Hood S, Cassidy P, Cossette MP, Weigl Y, Verwey M, Robinson B, Stewart J, and Amir S (2010) Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. *J Neurosci* 30:14046-14058
67. Lin CH, Huang JY, Ching CH, and Chuang JI (2008) Melatonin reduces the neuronal loss, downregulation of dopamine transporter, and upregulation of D2 receptor in rotenone-induced parkinsonian rats. *J Pineal Res* 44:205-213
68. Leeboonngam T, Pramong R, Sae-Ung K, Govitrapong P, and Phansuwan-Pujito P (2018) Neuroprotective effects of melatonin on amphetamine-induced dopaminergic fiber degeneration in the hippocampus of postnatal rats. *J Pineal Res* 64
69. Hsiao MC, Lin KJ, Liu CY, and Schatz DB (2013) The interaction between dopamine transporter function, gender differences, and possible laterality in depression. *Psychiatry Res* 211:72-77

Figures

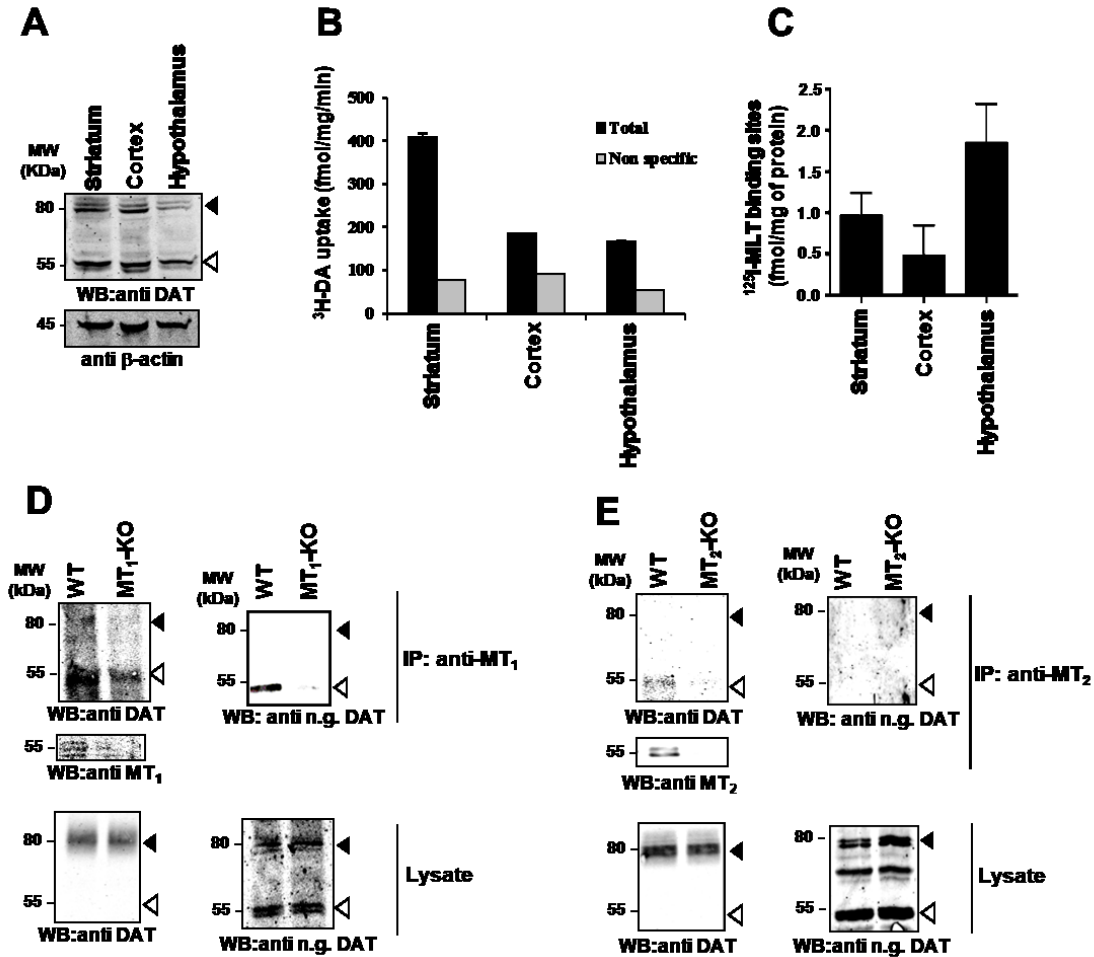


Figure 1: DAT is expressed in the striatum, hypothalamus and cortex and interacts with MT₁ and MT₂ in mice striatal synaptosomes.

(A) Western blot analysis on 30 μg of synaptosomal fraction of mice striatum, cortex and hypothalamus using anti-DAT antibodies. The blot shows that the mature (black arrow head) and the immature (white arrow head) forms of DAT are present at various levels in all three brain regions.

(B) $^3\text{H-DA}$ uptake assay on 100 μg of synaptosomes from different brain regions as indicated, in the presence or absence of 25 nM of nomifensine to define the non-specific uptake.

(C) Number of specific 2-[^{125}I]-iodomelatonin binding sites in presynaptic membranes from rat striatum, hypothalamus and cortex.

(D, E) Co-IP between MT₁ and DAT in striatal synaptosomes of WT and MT₁-KO (D) or MT₂-KO (E) mice using anti-MT₁ (D) or anti-MT₂ (E) antibodies for IP and antibodies against DAT (left panels) or non-glycosylated DAT (n.g. DAT) (right panels) for WB detection. Similar results were obtained in two additional experiments. Black arrow head, mature form of DAT; white arrow head, immature form of DAT.

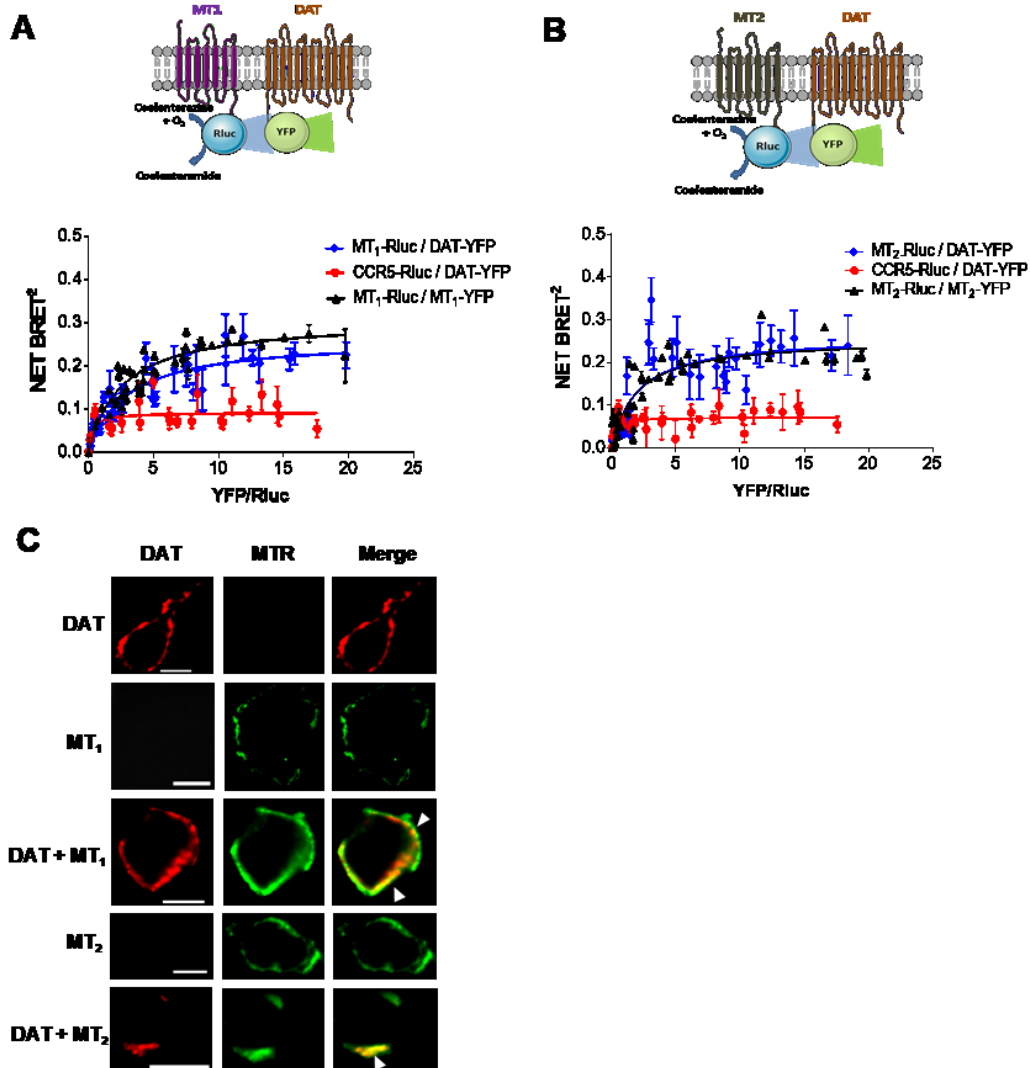


Figure 2. DAT interacts and colocalizes with MT₁ and MT₂ in transfected cells.

(A, B) BRET donor saturation experiments with HEK293T cells transfected with a fixed amount of MT₁-Rluc (A), MT₂-Rluc (B), or CCR5-Rluc (negative control) (A and B) and increasing quantities of YFP-DAT (A and B), MT₁-YFP (A) or MT₂-YFP (B). The saturation curves were obtained from three to five independent experiments.

(C) HeLa cells expressing Myc-DAT and Flag-MT₁ or Flag-DAT and Myc-MT₂ were permeabilized and colocalization of receptors and DAT (white arrow heads) evaluated by immunofluorescence microscopy using the appropriate anti-tag antibodies. Scale bars represent 5 μ m. Experiment was performed at least 2 other times with same results. MTR: MT₁ or MT₂.

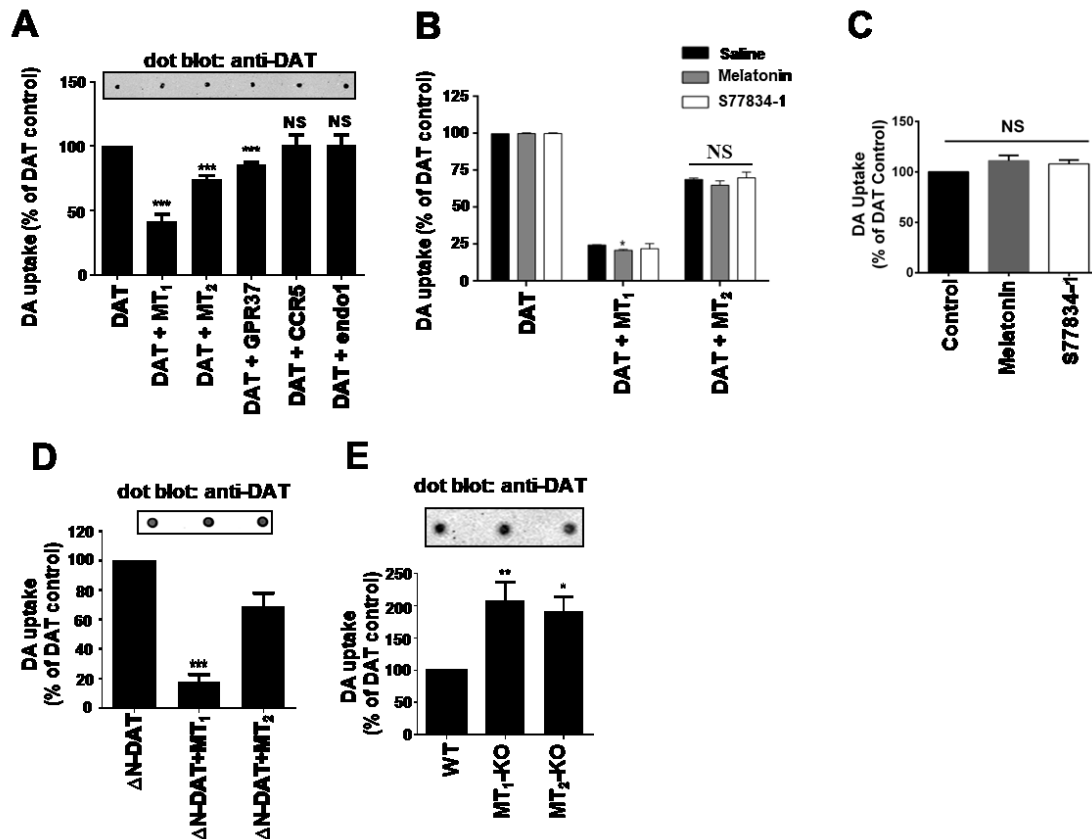


Figure 3. MT₁ and MT₂ constitutively decrease DA uptake in HEK293T cells and striatal synaptosomes.

(A) DA uptake in HEK293T cells expressing Flag-DAT alone or with Flag-MT₁, Myc-MT₂, Myc-GPR37, HA-CCR5 or Myc-Endospanin1 (Endo1). Inset: dot-blot analysis of DAT expression with anti-DAT antibodies.

(B and C) DA uptake in HEK293T cells expressing Flag-MT₁ or Myc-MT₂ (B) or on 100 μg of striatal synaptosomes of WT-mice (C) pre-incubated or not with melatonin or the inverse agonist S77834-1 (1 μM each, 30 min).

(D) DA uptake in HEK293T cells expressing ΔN-Flag-DAT alone or with Flag-MT₁ or Myc-MT₂.

(E) DA uptake on 100 μg of striatal synaptosomes of the indicated mice strains. Dot-Blot analysis of the synaptosomal fractions using anti-DAT antibodies.

Data are expressed as relative specific uptake compared to DAT alone and are presented as mean ± SEM; n=3 (A-C) or n=5 (D). NS not statistically different. *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.005, with respect to vehicle (one-way ANOVA followed by multiple comparison post-hoc test).

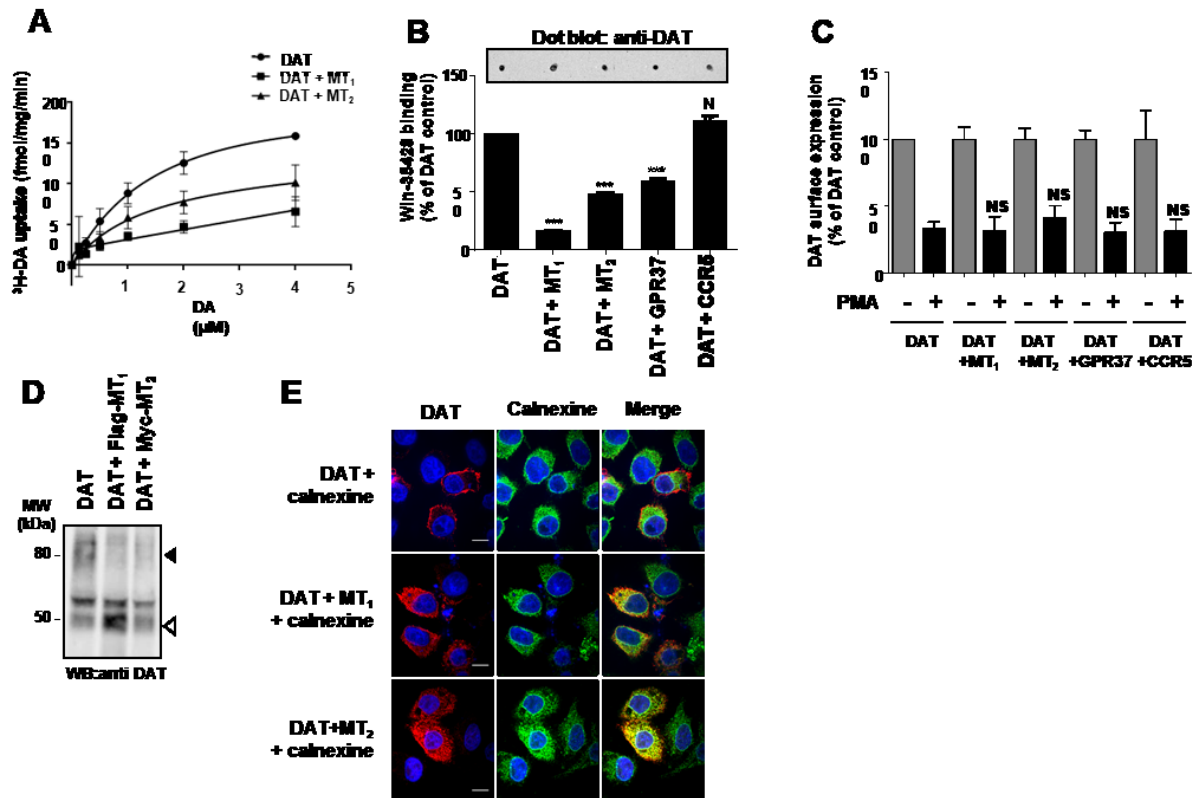


Figure 4. MT₁ and MT₂ do not affect the affinity of DAT for DA but decrease DAT cell surface expression.

(A) DA uptake kinetics were determined in HEK293T expressing DAT with the indicated receptors by incubating cells with 20 nM of ³H-DA and increasing concentrations of unlabeled DA. Michaelis constants (K_m) are: $1.57 \pm 0.15 \mu\text{M}$ (DAT alone), $1.07 \pm 0.49 \mu\text{M}$ (DAT+MT₁), $1.49 \pm 0.31 \mu\text{M}$ (DAT+MT₂); n=3.

(B) The number of DAT expressed at the surface of HEK293T cells was determined with the tritiated cocaine analogue [N-methyl-³H]WIN-35428 (4nM). Non-specific binding was measured in the presence of nomifensine (25 μM). Data are presented as % of control (DAT alone) and are the mean \pm SEM; n=3. Inset: dot-blot analysis of cell fractions with anti-DAT antibodies.

(C) The β -lac-DAT fusion protein was expressed alone or with the indicated proteins and pre-treated or not with PMA (1 μM , 30 min). Data are presented as % of in the absence of PMA; n=3-6.

(D) Western-Blot analysis revealing the 80 kDa glycosylated form of DAT (mature) and the 50 kDa non-glycosylated form of DAT (immature, intracellular) in HEK293T cells expressing DAT with or without Flag-MT₁ or Myc-MT₂. Similar results were obtained in two additional experiments.

(E) HeLa cells expressing Myc-DAT and Flag-MT₁ or Flag-DAT and Myc-MT₂ were permeabilized and the colocalization of DAT and calnexine (Endoplasmic Reticulum marker) monitored by immunofluorescence microscopy. Scale bars represent 5 μm . Experiment was performed at least 2 other times with the same results.

NS, non-significant, ***P < 0.005 using (B) one-sample t-test or (C) one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparisons test.

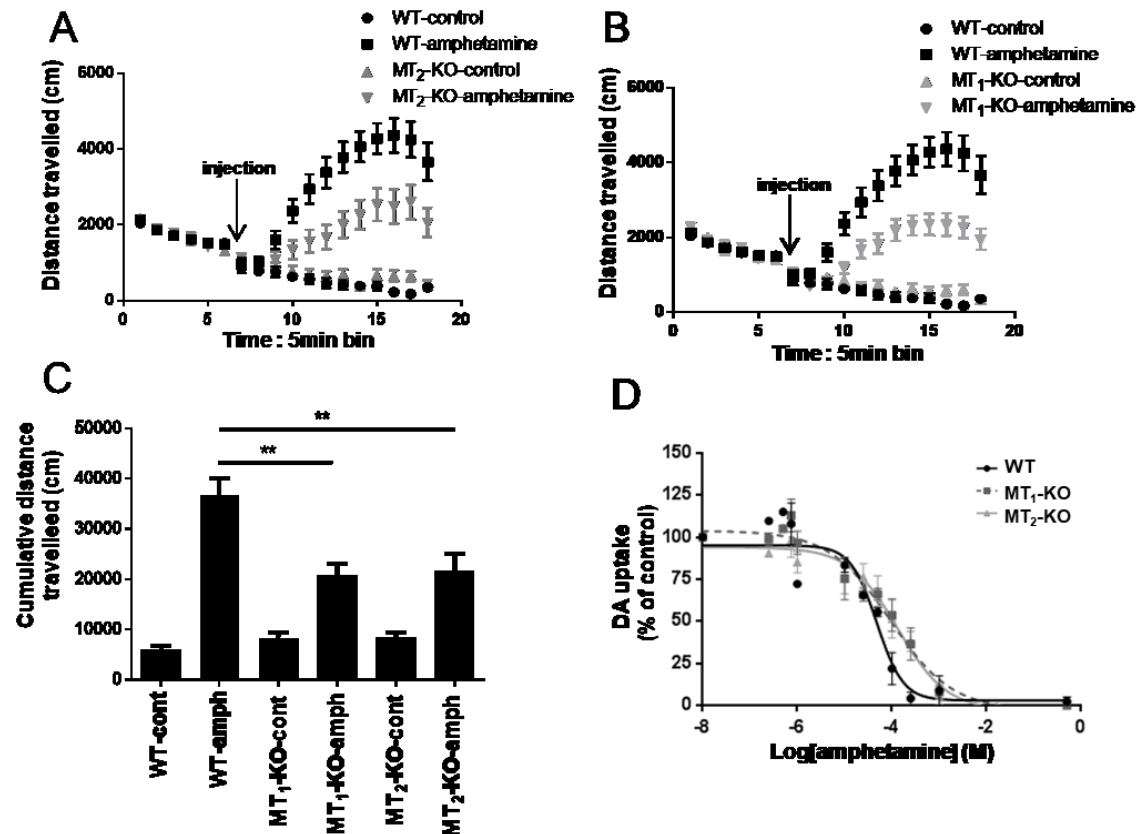


Figure 5. Melatonin receptor KO mice are less sensitive to amphetamine than wild type mice.

(A-C) D-amphetamine was injected (3mg/kg) in WT, MT₁-KO or MT₂-KO mice (arrow on the graph) and the distance traveled by the mice was recorded during 60 minutes. Panel C presents cumulative distance travelled during 60 minutes after D-amphetamine injection. Data are presented as mean ± SEM; N=3.

(D) ³H-DA (20nM) uptake in striatal synaptosomes of the indicated mice strains in the presence of increasing D-amphetamine concentrations. LogIC₅₀ values are -4,32 ± 0,10 (WT), -4,03 ± 0,15 (MT₁-KO), -3,87 ± 0,14 (MT₂-KO); N=3. **P < 0.01, using one way ANOVA test with Dunnett's multiple comparisons test.

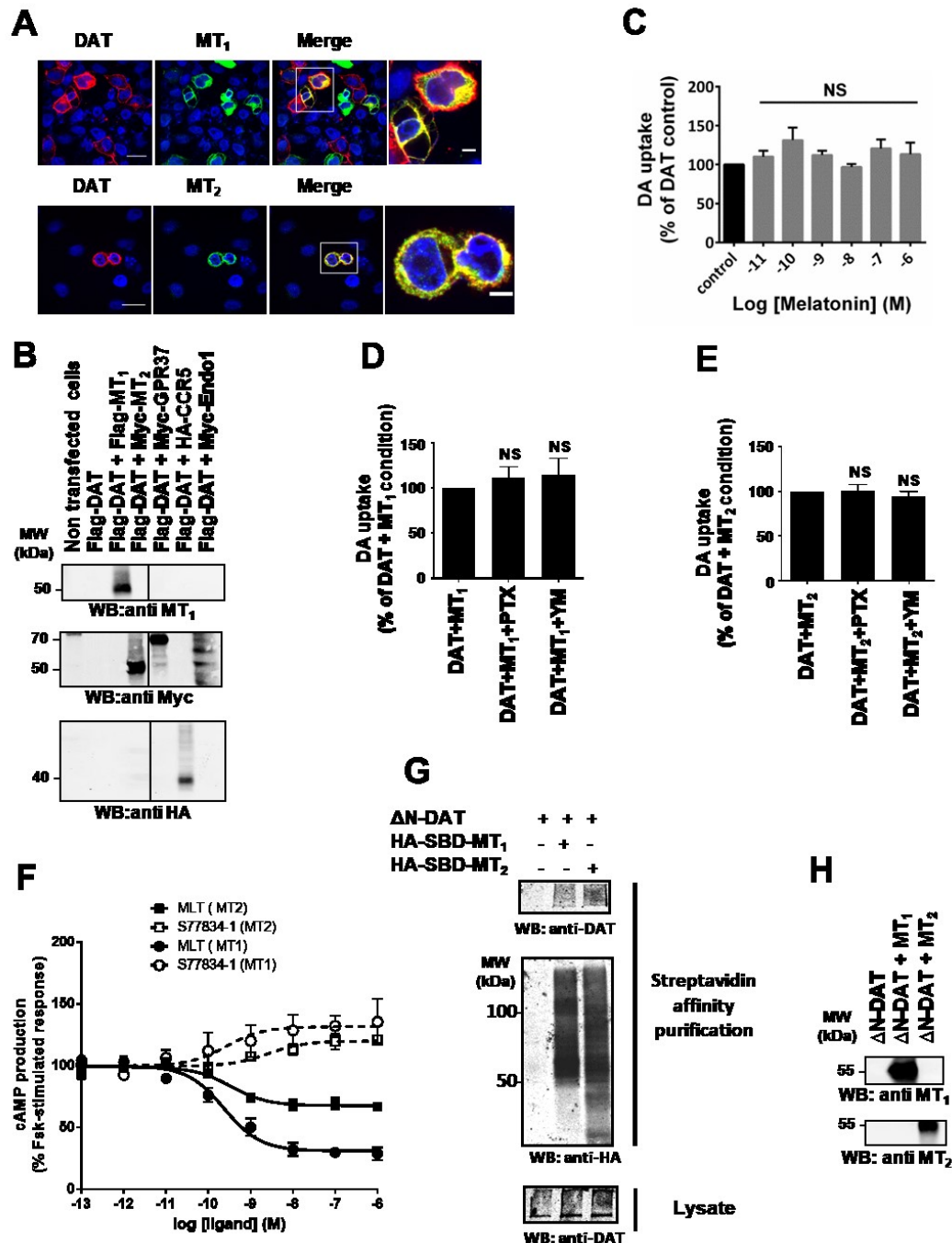
Bait	Prey	MYTH
Melatonin Receptor-Cub-TF	Ost1-NubG	-
Melatonin Receptor-Cub-TF	Ost1-NubI	+++
Artificial Bait-Cub-TF	Ost1-NubG	-
Artificial Bait-Cub-TF	Ost1-NubI	+++
Melatonin Receptor-Cub-TF	NubG-DAT	+++
Artificial Bait-Cub-TF	NubG-DAT	-

- No interaction, +++ Interaction, Ost1-NubG (negative) and -NubI (positive) Control preys

Table 1: MT1 receptor interacts with DAT in MYTH screening

Interaction results of the melatonin receptor or artificial baits when tested against negative control, positive control or DAT preys by MYTH.

Supplementary material:



Supplementary Figure 1. Melatonin receptors decrease DA uptake.

(A) HeLa cells expressing Myc-DAT and Flag-MT₁ or Flag-DAT and Myc-MT₂ were permeabilized and the colocalization of DAT and MT₁ or MT₂ was monitored by immunofluorescence microscopy. Scale bars represent 5 μm. Experiment was performed at least 2 other times with the same results.

(B) Western-blot detection of proteins co-expressed with DAT in HEK293T cell lysates of the DA uptake experiment shown in Figure 3A.

(C) DA uptake on 100 μ g of striatal synaptosomes of WT-mice (C) pre-incubated or not with increasing melatonin concentrations for 30 min. Data are expressed as relative specific uptake compared to DAT alone and are presented as mean \pm SEM; n=3.

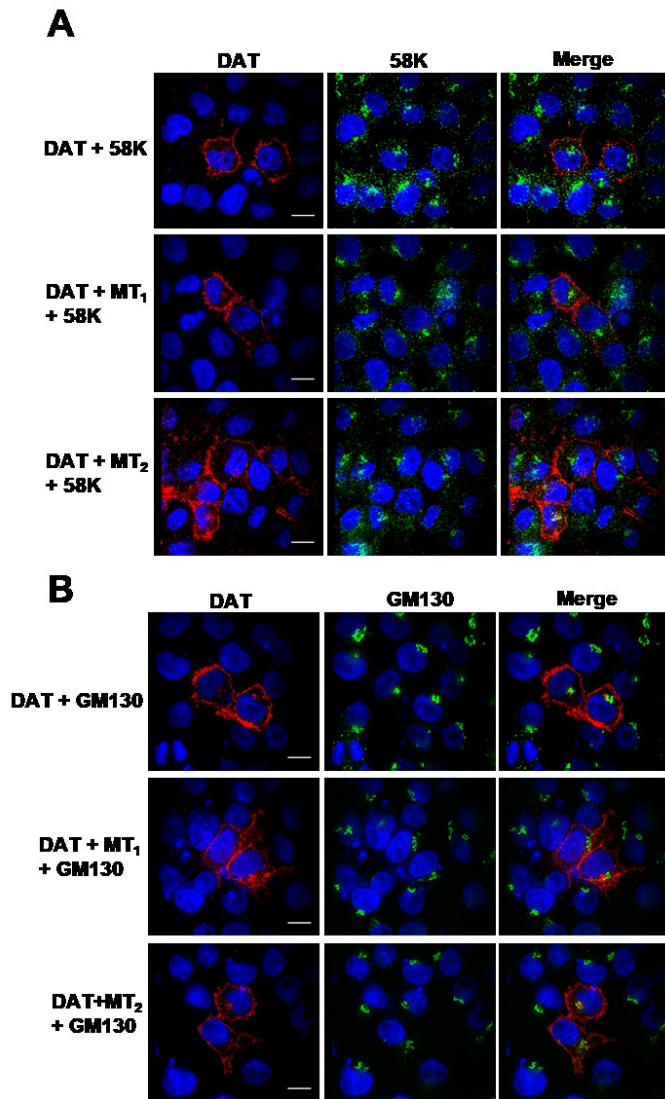
(D and E) DA uptake in HEK293T cells expressing DAT and Flag-MT₁ (D) or Myc-MT₂ (E) in HEK293T cells treated or not with the Gai protein inhibitor pertussis toxin (PTX, 10ng/mL, ON) or the G α q protein inhibitor YM-254890 (YM, 25 μ M, 1h). Data are expressed as % of DA uptake in the absence of inhibitor and are presented as mean \pm SEM; n=3.

(F) Effect of melatonin (closed symbols) and S77834-1 (open symbols) on forskolin (Fsk)-stimulated cAMP production in HEK293T cells expressing MT₁ or MT₂ receptors.

Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicates.

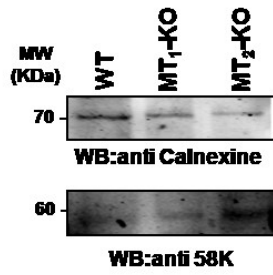
(G) Pull-down of Δ N-Flag-DAT with HA-SBD-MT₁ and HA-SBD-MT₂ (SBD = streptavidin binding domain) on streptavidin coated beads. Data are representative of three experiments. (H) Western-blot detection of Flag-MT₁ and Myc-MT₂ in HEK293T cell lysates of the DA uptake experiment shown in Figure 3C.

NS not statistically different. *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.005, with respect to vehicle (one way ANOVA test).



Supplementary Figure 2. DAT does not colocalizes with Golgi marker proteins in the presence of melatonin receptors.

(A, B) HeLa cells expressing Myc-DAT and Flag-MT₁ or Flag-DAT and Myc-MT₂ were permeabilized and the colocalization of DAT and 58K (Golgi marker) (A) or GM130 (cis-Golgi marker) (B) was evaluated by immunofluorescence microscopy. Scale bars represent 5 μ m. Experiment was performed at least 2 other times with same results.



Supplementary Figure 3. Presence of 58K and calnexine in synaptosome preparation.

Western blot analysis on 30 μ g of mice striatal synaptosome fractions using anti-58K (Golgi marker) and anti-calnexine (Endoplasmic Reticulum marker) antibodies. The western-blot shows that 58K and calnexine are still present in synaptosome preparations.

Résumé du chapitre 2 – Article 1

Dans ce manuscrit, nous avons démontré les points suivants :

- Les MTRs interagissent physiquement avec DAT.
- Les MTRs diminuent l'expression à la surface cellulaire de DAT.
- Les MTRs diminuent l'activité de recapture de la dopamine de DAT.
- Les MTRs retiennent DAT dans le réticulum endoplasmique.
- En absence de MTRs, les souris sont moins sensibles à l'amphétamine.

La découverte d'interactions entre DAT et les MTRs ainsi que la régulation de la recapture par ces derniers offrent de nouvelles perspectives dans la compréhension et le traitement de maladies neurodégénératives comme la MP ainsi que le traitement des personnes souffrant de TDAH ou addictes aux drogues agissant sur le système dopaminergique.

Après avoir découvert un nouveau mécanisme impliquant la régulation du système dopaminergique par le système mélatoninergique, nous nous sommes intéressés à l'implication de ce dernier dans le développement de maladies métaboliques, notamment le DT2.

Chapitre 3

Article 2

Type 2 diabetes–associated variants of the MT₂ melatonin receptor affect distinct modes of signaling

Angeliki Karamitri*, Bianca Plouffe*, Amélie Bonnefond*, Min Chen,
Jonathan Gallion, Jean-Luc Guillaume, Alan Hegron, Mathilde Boissel,
Mickaël Canouil, Claudia Langenberg, Nicholas J. Wareham, Christian Le
Gouill, Viktoria Lukasheva, Olivier Lichtarge, Philippe Froguel,
Michel Bouvier, Ralf Jockers

Science Signaling (2018)

Type 2 diabetes–associated variants of the MT₂ melatonin receptor affect distinct modes of signaling

Angeliki Karamitri^{1,2,3*}, Bianca Plouffe^{4*}, Amélie Bonnefond^{5*}, Min Chen^{1,2,3}, Jonathan Gallion⁶, Jean-Luc Guillaume^{1,2,3}, Alan Hegron^{1,2,3}, Mathilde Boissel⁵, Mickaël Canouil⁵, Claudia Langenberg⁷, Nicholas J. Wareham⁷, Christian Le Gouill⁴, Viktoria Lukashova⁴, Olivier Lichtarge⁶, Philippe Froguel^{5,8†}, Michel Bouvier^{4†‡}, Ralf Jockers^{1,2,3*†‡}

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France. ²CNRS UMR 8104, Paris, France. ³Univ. Paris Descartes, Paris, France. ⁴Institute for Research in Immunology and Cancer & Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada. ⁵Univ. Lille, CNRS UMR 8199 - EGID, Institut Pasteur de Lille, Lille, France. ⁶Structural Computational Biology and Molecular Biophysics, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA. ⁷Medical Research Council (MRC) Epidemiology Unit, University of Cambridge School of Clinical, Cambridge, CB2 0QQ, United Kingdom. ⁸Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, W12 0NN London, United Kingdom.

*These authors contributed equally to this work.

‡Co-senior authors

†Corresponding author. Email: ralf.jockers@inserm.fr (R.J.); michel.bouvier@umontreal.ca (M.B.); philippe.froguel@cncrs.fr (P.F.)

Abstract

Melatonin is produced during the night and regulates sleep and circadian rhythms. Loss-of-function variants in *MTNR1B*, which encodes the melatonin receptor MT₂, a G protein–coupled receptor (GPCR), are associated with an increased risk of type 2 diabetes (T2D). To identify specific T2D-associated signaling pathway(s), we profiled the signaling output of 40 MT₂ variants by monitoring spontaneous (ligand-independent) and melatonin-induced activation of multiple signaling effectors. Genetic association analysis showed that defects

in the melatonin-induced activation of $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ proteins and in spontaneous β -arrestin2 recruitment to MT_2 were the most statistically significantly associated with an increased T2D risk. Computational variant impact prediction by in silico evolutionary lineage analysis strongly correlated with the measured phenotypic effect of each variant, providing a predictive tool for future studies on GPCR variants. Together, this large-scale functional study provides an operational framework for the postgenomic analysis of the multiple GPCR variants present in the human population. The association of T2D risk with signaling pathway-specific defects opens avenues for pathway-specific personalized therapeutic intervention and reveals the potential relevance of MT_2 function during the day, when melatonin is undetectable, but spontaneous activity of the receptor occurs.

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2D) is characterized by high blood glucose concentrations in the context of insulin resistance and impaired insulin secretion from pancreatic beta cells (1). The prevalence of T2D has increased over the last 20 years and closely parallels the mounting epidemic of obesity. G protein-coupled receptors (GPCRs) are promising drug targets for metabolic diseases, including T2D (2, 3). Agonists of GPCRs, such as the glucagon-like peptide 1 receptor (GLP1R), are clinically used to improve glucose tolerance in T2D patients (4). Furthermore, drugs targeting other GPCRs, such as the gastric inhibitory polypeptide receptor (GIPR), the free fatty acid receptor 1 (FFAR1, also known as GPR40), and the glucose-dependent insulinotropic receptor (GPR119), are currently in clinical trials and at different stages of development for diabetes therapy (3).

In addition to several environmental risk factors, T2D has a strong genetic basis. Genome-wide association studies (GWAS) and their meta-analyses have identified more than 100 loci containing single nucleotide polymorphisms (SNPs) that are statistically significantly associated with T2D risk and altered glycemic values or insulin secretion (5). The common SNP rs10830963 is located in the unique intron of *MTNR1B*, which encodes MT₂, the melatonin (MLT) receptor, is statistically significantly associated with increased fasting plasma glucose concentrations, reduced early insulin response to glucose, and increased risk of both T2D and gestational diabetes mellitus (6-8). The homozygous T2D-associated SNP (corresponding to a GG genotype; the wild-type sequence is CC) is associated with a two-fold increase in cis *MTNR1B* mRNA abundance in human pancreatic islets compared with the amount in the islets of CC genotype carriers (7, 9-11), suggesting that increased MLT signaling might be associated with an increased T2D risk. However, when we performed a large-scale exon resequencing of *MTNR1B*, we found that only rare, nonsynonymous variants with a loss-of-function phenotype strongly associated with increased T2D risk (odds ratio of 5, when analyzed in aggregation) (12). Considering these apparently contradictory findings, the role of MT₂ signaling on T2D risk in humans remains unanswered.

MT₂ belongs to the MLT receptor family of GPCRs, which is composed of MT₁, MT₂, and the orphan GPR50 based on their sequence homologies. However, only MT₁ and MT₂ and not GPR50 bind to MLT and do so with high affinity (13-15). MLT is mainly secreted from the pineal gland in a circadian manner with high plasma concentrations during the night (16). MLT receptors are involved in the regulation of sleep, circadian and seasonal rhythms, immune functions, retinal physiology, and glucose homeostasis (17). How MLT modulates glucose homeostasis in humans is not well understood. In rodent β -cell lines, MLT decreases insulin secretion (18) (19), whereas studies of isolated human islets showed that MLT

stimulates insulin secretion (20, 21). It is well-known that MLT exerts opposing effects on specific functions in a species-dependent manner (22). Epidemiological studies demonstrated that people working on different shifts, compared to day workers, present with a marked dysfunction in nocturnal MLT secretion and a higher risk of cardiovascular disorders, metabolic diseases (including T2D), and cancer. A 12-year prospective study showed that decreased nocturnal MLT secretion in nurses working on rotating night shifts is associated with a higher risk of developing T2D (23).

Several sites of MLT action are possible, because MT₁ and MT₂ are present in many central and peripheral tissues, including insulin target tissues, such as liver, muscle, and adipose tissue (19, 24). The amounts of mRNA transcripts for *MTNR1A* (encoding MT₁) and *MTNR1B* are very low or undetectable in human islets and only detectable in a small subset of β -cells (25-27), raising questions about the relevance of human islets as an MLT target tissue (28). In the hypothalamic suprachiasmatic nuclei, MT₁ and MT₂ regulate the circadian rhythms of the master clock in mammals, and disruption of central and peripheral circadian rhythms leads to metabolic disorders, including T2D (29-31). The T2D-associated SNP rs10830963, which is in an intron unique to *MTNR1B*, affects the dynamics of MLT secretion (32). Therefore, it is possible that the global dysregulation of MT₂ signaling contributes to T2D pathophysiology through the alteration of circadian rhythms.

Given that GPCRs can engage multiple distinct signaling pathways and that biased ligands alter the balance of activated signaling pathways (33)(34), the objective of the current study was to assess the effect of all *MTNR1B* variants identified by Bonnefond *et al.* (12) on multiple pathways engaged upon MT₂ activation. We generated a “signaling signature” for each variant receptor to investigate whether the association between MT₂ loss-of-function

and T2D was linked to specific signaling defects. MT₂ has been described to activate three signaling pathways. Through G_{i/o} proteins, MT₂ inhibits the production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2). In addition to engaging G_{i/o} proteins, MT₂ also promotes the recruitment of β -arrestin (35). Here, we assessed the effects of spontaneous (ligand-independent) and MLT-induced activity of each MT₂ variant for these three pathways.

The “evolutionary action” deduced from *in silico* trace evolution analysis (36) predicts the functional effect of a mutation based on the sensitivity of the site that is mutated and on the magnitude of the mutational substitution. We applied this evolutionary action analysis to correlate the experimental data with mutations in the MT₂ sequence. We then reassessed the genetic association data to investigate the effects of specific signaling defects on T2D risk. With this systematic multiparameter approach, we determined specific signaling defects related to MT₂ variation that are associated with T2D risk. This approach not only holds promise for identifying strategies to develop specific treatments or preventative measures for T2D, but also is a method that will facilitate the targeting of specific disease-related pathway defects when implemented into drug discovery workflows.

Results

Identifying pathways engaged by MT₂

To identify the pathways engaged by MT₂, we used a combination of bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based and protein complementation-based sensors to assess G protein activation and β -arrestin recruitment by wild-type (WT) MT₂. We compared the ligand-dependent activation of 10 individual G α proteins by specific receptors known to couple to each G protein with the activation induced by MLT-activated MT₂ using a BRET

assay that detects separation of the $G\alpha$ subunits from $G\gamma$ subunits (fig. S1A) and evaluated the activation of 15 individual $G\alpha$ proteins by MLT-activated MT_2 using a BRET assay that detects the association of a $G\gamma$ subunit with GPCR-regulated kinase 2 (GRK2) (fig. S1B). Of the G protein subtypes assessed, only members of the $G\alpha_{i/o}$ family showed statistically significant activation, with $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ having the most robust activation amplitude (fig. S1, A and B). Thus, we performed a concentration-response analysis for the MLT-induced activation of $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$. We also assessed the ability of MT_2 to spontaneously activate these two $G\alpha$ proteins in the absence of added MLT by comparing the differences in BRET signals in the absence of MLT in cells expressing or not expressing MT_2 (fig. S1, C and, D). MT_2 showed spontaneous activity towards both $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ and MLT promoted a concentration-dependent increase in their activity with similar EC_{50} values for both G proteins. The opposite directions of the presented concentration-response curves reflect the different natures of the biosensors used to test their activity, which results in a decrease in BRET for the sensor monitoring the separation of the $G\alpha$ subunit from $G\gamma$ subunit (used for $G\alpha_{i1}$) and the sensor detecting the interaction of the dissociated $G\beta\gamma$ with GRK2 (used for $G\alpha_z$). MT_2 also displayed spontaneous activity toward the recruitment of β -arrestin2 in the absence of MLT, an activity that was concentration-dependently increased by the addition of MLT (fig. S1E).

To confirm signaling downstream of G proteins and β -arrestin2, we performed cAMP assays and ERK1/2 activation assays, respectively. $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ both inhibit the activity of adenylyl cyclases to inhibit cAMP production; therefore, we assessed the inhibition of forskolin-stimulated cAMP production by MLT-activated MT_2 . MLT triggered a dose-dependent reduction in cAMP concentration with maximal inhibition of approximately 30%,

consistent with the coupling of MT₂ to G proteins that inhibit adenylyl cyclase activity (fig. S1F). β -arrestins promote receptor internalization and desensitization of G protein-dependent signaling at receptors located at the plasma membrane (37). In addition, β -arrestins function as independent signaling transmitters (38) or mediate sustained endosomal signaling (39-42). Both G protein-mediated and β -arrestin-mediated signaling can activate ERK1/2. To determine whether MT₂ can stimulate ERK activation, we performed an ERK activation assay (43) and found that MLT stimulated a dose-dependent increase in ERK activation in MT₂-expressing cells (fig. S1G).

Evaluation of spontaneous $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ signaling and β -arrestin2 recruitment by MT₂ variants

Subsequently, we monitored the effects of the 40 nonsynonymous MT₂ variants (including 38 rare and the two common p.G24E and p.K243R variants), which are distributed throughout the receptor (see fig. S2 for variant positions in the receptor) on the direct engagement of $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ proteins, downstream cAMP production, the recruitment of β -arrestin2, and ERK1/2 activation. To control for the potential influence of different cell-surface abundances on signaling activity, we assessed cell surface receptor abundance by ELISA for all tested forms of the variants and WT receptors (fig. S3). Four mutants are classified as loss-of-MLT binding (p.A42P, p.L60R, p.P95L, and p.Y308S) on the basis of results obtained in a radioligand binding assay (12). We measured the spontaneous (agonist-independent) activation of $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ by the MT₂ variants. For WT MT₂, the spontaneous activity represented 51.3 and 22.5% of the maximal MLT-stimulated activity for $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$, respectively (fig. S1, C and D). Seventeen MT₂ variants displayed reduced spontaneous activation of $G\alpha_{i1}$, and 14 displayed reduced spontaneous activation of $G\alpha_z$ (Fig. 1, A and B, tables S1 and S2). Most MT₂ variants (p.A42P, p.L60R, p.P95L, p.M120V, p.S123R,

p.R138C, p.R138H, p.R138L, p.T201M, p.I223T, p.F250V, p.Y308S, and p.R316H) were defective for the spontaneous activation of both $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$. Only the p.Y141F variant showed subtype-selective reduction for spontaneous activation of $G\alpha_{i1}$. Some variants exhibited increased spontaneous activation of $G\alpha_{i1}$ (p.P36S, p.E237K, and p.S238G) or $G\alpha_z$ (p.A8S, p.A13V, p.Y141F, p.L166I, p.S238G, p.K234R, p.R330W, and p.A342V).

We also determined the spontaneous recruitment of β -arrestin 2 to the MT_2 variants. Similar to G protein activation, we observed high spontaneous β -arrestin2 recruitment for WT MT_2 , representing 70% of the maximal response (fig. S1E). Spontaneous β -arrestin2 recruitment was statistically significantly reduced for 15 variants (Fig. 1C; table S3). The four mutants that exhibit loss-of-MLT binding (p.A42P, p.L60R, p.P95L, and p.Y308S) did not display any spontaneous β -arrestin2 recruitment, confirming that the spontaneous β -arrestin2 recruitment monitored for the WT MT_2 was receptor-dependent and does not represent an intrinsic feature of the assay. None of the variants showed increased spontaneous β -arrestin2 recruitment (Fig. 1C), suggesting that the constraints that restrict constitutive engagement of G proteins are different from those controlling spontaneous β -arrestin recruitment.

Evaluation of agonist-induced $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ signaling by MT_2 variants

The effect of MLT on $G\alpha_{i1}$ or $G\alpha_z$ activation was also differentially altered by the variants. For each variant, full concentration-response curves were performed and both the half-maximal effective concentration (potency; EC_{50}) and the maximal agonist-mediated response (efficacy; E_{max}) were determined (Fig. 2 and fig. S4, tables S1 and S2). From this analysis, we grouped the variants into 8 categories (Fig. 2 and fig. S4): those that were previously classified as loss-of-MLT-binding variants (Fig. 2A and fig. S4A), those that exhibited impaired signaling through all pathways (Fig. 2B and fig. S4B), those that

exhibited impaired signaling in two or more pathways (Fig. 2C and fig. S4C), those with specific defects in MLT-stimulated, G protein-specific signaling (Fig. 2D and fig. S4D), those with a specific defect in β -arrestin recruitment (Fig. 2E and fig. S4E), those with a specific defect in ERK activation (Fig. 2F), those that exhibited a gain of function (Fig. 2G), and those that were similar to WT MT₂ (fig. S4F).

Similar to their reduction in spontaneous activity, most of the variants (p.A42P, p.L60R, p.A74T, p.P95L, p.S123R, p.V124I, p.R138C/H/L, p.Y141F, p.T201M, p.R222H, p.I223T, p.F250V, p.Y308S, p.R316H, p.R330W, and p.A342V) were also deficient in coupling to both G proteins, whereas five variants (p.G109A, p.M120I, p.M120V, p.R154H, and p.D246N) showed subtype-specific defects in MLT-induced $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ activation (fig. 2 and fig. S4). Two variants (p.A359E and p.P36S) showed increased agonist-promoted $G\alpha_{i1}$ activation (table S1), indicating that both loss and gain of MLT responsiveness can be found among natural variants. We examined the influence of the variants on signaling downstream of $G\alpha_i$ by monitoring inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation. The MLT-induced responses show that, in addition to the four loss-of-MLT binding mutants (p.A42P, p.L60R, p.P95L, and p.Y308S), markedly impaired cAMP responses were also observed for p.S123R, p.R138C/H/L, p.F250V, and p.R316H (Fig. 2 and fig. S4, table S4). These data indicate that an impaired ability to reduce cAMP production is consistent with the defective ability of these variants to activate $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$. In some cases (p.A74T, p.V124I, p.Y141F, p.T201M, p.A342V, p.M120I, p.R154H, p.D246N), defects in G_i activity were observed with no effect on the measured cAMP. This is most likely due to the fact that whereas the assays detecting G protein activation are stoichiometric, the production of cAMP is an amplified signal, making it more difficult to detect the effects of the mutations leading to the less severe impairment in G_i activity.

Evaluation of β -arrestin2 recruitment by MT₂ variants

Twenty-four variants were defective for their ability to recruit β -arrestin2 in response to MLT (table S3). In addition to the four loss-of-MLT-binding mutants, 15 MT₂ mutants that displayed impaired G_i signaling (p.A74T, p.G109A, p.M120V, p.S123R, p.V124I, p.R138C/H/L, p.T201M, p.R222H, p.I223T, p.D246N, p.F250V, p.R316H, and p.A342V) and an additional five mutants with normal G_i and cAMP signaling (p.L166I, p.R231H, p.E237K, p.S238G, and p.K243R) showed reduced β -arrestin2 recruitment (Fig. 2 and fig. S4, table S3).

Evaluation of ERK signaling by MT₂ variants

ERK phosphorylation upon MLT stimulation was used as a proxy for activation. For WT MT₂, ERK activation was fully blocked by the G_{i/o} inhibitor pertussis toxin (PTX) and was unaffected by RNAi-mediated silencing of β -arrestin1 and β -arrestin 2 (fig. S5), indicating that ERK activation occurred downstream of G protein activation. All MT₂ variants that were impaired for both the G_i/cAMP and β -arrestin2 pathways also exhibited reduced phosphorylation of ERK in response to MLT (Fig. 2; fig. S4, and table S5). Other variants showed partially impaired ERK activation (p.A74T, p.V124I and p.T201M) together with partial impairment of both G protein-mediated signaling and β -arrestin2 recruitment or with a specific G α_{i1} signaling defect (p.R154H) or with a specific G α_z signaling defect (p.M120I). Furthermore, the ERK signaling-defective variant p.M146V was the only variant with normal G_i/cAMP signaling and β -arrestin2 recruitment, suggesting the potential involvement of additional pathway(s) in mediating MT₂-dependent ERK activation. The p.A359E variant differed from all of the others: it exhibited a substantially increased ERK

response (246% E_{\max} of the WT) (table S5), a property that extended to a lesser extent to $G\alpha_{i1}$ activation and β -arrestin2 recruitment (Fig. 2).

Evaluation of the relationship among signaling alterations exhibited by the MT₂ variants

To determine whether there was a link between the effect of the mutation on spontaneous or agonist-stimulated receptor activities, correlations between the effects on the two parameters were performed for the different pathways (Fig. 3A and fig. S6, A and B). In addition, to assess the possible functional links between two pathways, correlation between the effect on each pathway was performed in a pairwise manner (Fig 3, B and C). We also performed pairwise comparisons of spontaneous activity (fig. S6, C to E). Spontaneous $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ activation only modestly correlated with the corresponding MLT-induced activation of $G\alpha_{i1}$ (Fig. 3A, left) and $G\alpha_z$ (Fig. 3A, middle). A typical example is the p.M120V variant, which exhibited markedly reduced spontaneous $G\alpha_{i1}$ activity and had WT-like agonist-stimulated activity (Fig. 3A, left). Similar to the low correlation between spontaneous and agonist-stimulated G protein activation, the correlation between spontaneous and MLT-induced β -arrestin2 recruitment was also low (Fig. 3A, right). This lack of correlation between spontaneous and agonist-induced activity indicated that the modes of spontaneous and MLT-induced receptor activity were distinct with potentially different allosteric constraints. In contrast, there was a strong correlation between the spontaneous activation of $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ (fig. S5C) and between the MLT-induced activation of $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ (Fig. 3C, $G\alpha_{i1}$ vs. $G\alpha_z$). These correlations suggest that similar receptor-mediated activation modes control these two G_i family members.

To test for a link between G protein- and β -arrestin2-dependent events, we correlated MLT-induced $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ activation and cAMP inhibition with MLT-induced β -arrestin2 recruitment (Fig. 3B). We also tested the correlation between MLT-induced G protein activation and spontaneous β -arrestin2 recruitment (fig. S5, A and B) and between spontaneous G protein activation and spontaneous β -arrestin2 recruitment (fig. S5, C to E). All showed moderate, yet statistically significant correlations, which contrasted with the tightly correlated G protein-dependent events (Fig. 3C), indicating that G protein activation and β -arrestin recruitment rely on at least partially independent processes. Together, these data reveal a general trend of reduced spontaneous and MLT-induced activity for MT₂ mutants at the level of β -arrestin2 recruitment and G protein activation and highlight the independent nature of these two processes.

Generation of signaling signatures of MT₂ variants

To represent the signaling characteristics of the different variants, the overall signaling efficiencies of the WT and mutant receptors were assessed for each outcome using the operational model of Black and Leff (44) as modified by Kenakin *et al.* (45). The transduction coefficient $\log(\tau/K_A)$ was used as an indication of the signaling efficiency of each variant and the comparison between WT receptor and each of the variants was then obtained by subtracting the transduction coefficient $\log(\tau/K_A)$ of the mutants from that of the WT and expressed as $\Delta\log(\tau/K_A)$ (tables S1 to S5). We plotted radial graphs of the calculated $\Delta\log(\tau/K_A)$ together with the spontaneous and MLT-induced signaling efficacy to represent a “signaling signature” for each MT₂ variant. This representation revealed several groups of variants with distinctive signaling signatures (Fig. 4). For example, twelve variants have strong defects in the five signaling cascades considered (p.A42P, p.L60R, p.P95L, p.S123R, P.R138C/H/L, p.R222H, p.I223T, p.F250V, p.Y308S, and p.R316H), six variants showed

specific defects in β -arrestin2 recruitment (p.L166I, p.R231H, p.E237K, p.S238G, p.K243R, and p.D246N), and three variants displayed G protein–specific defects (p.R154H, p.Y141F, and p.R330W). Three variants (p.M120I, p.P36S, and p.A359E) resulted in increased signaling activity compared to that of WT MT₂ in response to MLT.

Evolutionary action analysis of MT₂ variants

The large amount of functional data collected here provides a tool to validate *in silico* models predicting variant receptor functionality. One of these models, Evolutionary Action (EA) (36), predicts the effect of a variant on protein function using the relative importance of each residue based on evolutionary divergence, Evolutionary Trace (ET) (46), combined with the likelihood to observe a given amino acid substitution for another across evolution measured as the substitution log-odds (36). Based on these phylogenetic patterns of variation, an EA score from 0 (benign) to 100 (highly detrimental or impactful) was assigned for each MT₂ variant (Fig. 5A). To assess whether these empirical EA scores could be predictive of the functional impact observed in the signaling assays, we assigned a “phenotype score” to each variant that was calculated by averaging the 13 values corresponding to the normalized functional parameters used for the signaling signatures. The predictive EA scores correlated with the experimentally determined phenotype scores (Fig. 5B), indicating that the degree of measured functional divergence of the variants from the WT correlated with the degree of predicted evolutionary divergence. Overall, the good correlation of phenotypic scores with EA scores confirmed the robustness of Evolutionary Action in predicting the effect of variants on receptor fitness.

Association between functional MT₂ defects and T2D risk

Based on the different signaling signatures observed for the MT₂ variants, they clustered into nine groups. For each of these nine groups, the association between T2D risk and the aggregation of the variants was assessed by the kernel-based adaptive cluster method (47) as previously described (12) (Table 1). By applying Bonferroni correction, we considered $P < 0.0056$ to be statistically significant and we considered P values between 0.05 and 0.0056 to be a trend of association. We found that rare variants with defects in MLT-induced activation of $G\alpha_{i1}$ or $G\alpha_z$ or in spontaneous β -arrestin2 recruitment were the most strongly and statistically significantly associated with increased T2D risk. For example, rare variants with defects in MLT-induced activation of $G\alpha_{i1}$ had an odds ratio of 3.25 with a 95% confidence interval of 1.73-6.10 and a P value of 2.4×10^{-4} (Table 1). In contrast, all of the other groups characterized by different signaling defects showed only a trend of association with T2D. The absence of an association of defective MLT-induced β -arrestin2 recruitment with T2D is consistent with the observation that the frequent p.K243R variant (rs61747139), which exhibits defective MLT-induced β -arrestin2 recruitment, is not associated with T2D (12, 48). Furthermore, the “neutral” rare variants were not found to be associated with T2D risk (Table 1). This is consistent with lack of risk association between T2D and the common p.G24E variant (rs8192552) (12, 48), which is also “neutral.”

Discussion

Our extensive functional genomics study on 40 rare or very rare MT₂ variants identified an overall loss-of-function phenotype for many parameters and pathways measured. The observed disconnection of spontaneous vs. MLT-induced activity as well as G protein– vs. β -arrestin–dependent signaling of these variants enabled us to dissect the respective contributions of each of these parameters and to reveal the strongest associations to increased

T2D risk with defective MLT-induced $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ activation and defective spontaneous β -arrestin2 recruitment.

Connecting rare GPCR variants with common diseases: a general framework

The present study provides a framework to correlate alterations in specific signaling parameters with the risk to develop a common disease. Our study is distinct because the functional basis or relevance of most genetic risk factors remains either unknown or is restricted to a simple loss- and gain-of-function phenotype classification. It is now well-established that the intracellular signaling of GPCRs is highly interconnected, involving multiple signaling pathways. Defining the full functional profile or “signaling signature” of a GPCR and its variants is important to understand the functional defect linked to disease-associated receptor variants. Whereas the number of such GPCR variants has been largely underestimated because of their low frequency, systematic whole-genome sequencing projects revealed a large inter-individual diversity when considering large populations, a relevant scenario in the case of common diseases like T2D.

For genes coding for non-odorant GPCRs in humans, an average of 32 non-synonymous variants have been estimated to exist for each GPCR in a sample of 10,000 individuals (49, 50). This estimation provides a first measure of the number of rare GPCR variants in the human population and gives an idea of the future challenges in terms of their functional characterization to understand their effect on diseases. In terms of the number of variants, the 40 variants identified in the *MTNR1B* gene in a cohort of ~10,000 individuals (12) seem to fit with this assumption. As demonstrated by our study, such a number of variants can be sufficient to identify receptor defects at the level of individual signaling pathways. Application of the operational model of Kenakin and Christopoulos (34, 45), originally

designed to compare the relative signaling efficiency of different ligands, was very instructive in defining an integrative measure for signaling defects that went beyond the determination of the isolated signaling parameters. This is exemplified by the p.R154H variant for which defects in $G\alpha_{i1}$ activation only became visible at the level of the $\Delta\log(\tau/KA)$ transduction ratio because it integrates both potencies and maximal efficacies. Indeed, a decrease in the maximal agonist-mediated efficacy and a rightward $\log EC_{50}$ shift were observed for this variant but were not statistically significant. However, when both maximal efficacy and potency were integrated, the global response depicted by $\Delta\log(\tau/KA)$ value was statistically significantly reduced compared to that of the WT receptor. A good correlation was seen between the EA score of MT_2 variants and the corresponding experimentally determined phenotypic scores, which indicates the usefulness of the EA score to predict the functional effect of a specific GPCR variant. The EA score might therefore be applied to obtain a first classification of GPCR variants before entering into large-scale functional studies. Together, our data provide an operational template for the evaluation of the functional effect of GPCR variants on common traits and diseases.

Specific pathway parameters of MT_2 variants associate with T2D risk

Given that GPCRs, such as MT_2 , can signal through various cascades and that different variants have the potential to modulate one or more signaling parameters, a complete functional characterization is required to understand the full effect of receptor variants on disease risk. Here, we determined both spontaneous and MLT-induced MT_2 activity for five signaling events ($G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ activation, inhibition of cAMP production, β -arrestin2 recruitment, and ERK1/2 activation). Ten of the 38 rare receptor variants had a phenotype that was indistinguishable from that of the WT receptor and were therefore classified as “neutral” variants. The 28 other variants showed functional defects compared to the WT

receptor. Only the variant p.A359E showed a robust gain-of-function phenotype with 246, 145, and 130% increases in the E_{\max} values of ERK activation, $G\alpha_{i1}$ activation, and β -arrestin2 recruitment, respectively. It would be interesting in a follow-up study to determine the effect of this increased MT_2 function on an individual's metabolism. Together, our data show that loss-of-function MT_2 variants at different functional levels is associated with increased T2D risk. Detailed genetic association analysis detected three parameters that stand out in terms of the statistical significance of association with T2D risk: MLT-induced activation of $G\alpha_{i1}$ (19 variants) and $G\alpha_z$ (22 variants) and spontaneous β -arrestin2 recruitment (15 variants). The independence of signaling events associated with G protein activation and β -arrestin2 recruitment was further highlighted by the poor correlation between them for the 40 MT_2 variants. The importance of $G\alpha_{i1}$ activation underlines the general importance of this well-characterized pathway for MT_2 . The activation of $G\alpha_z$ by MT_2 has not been reported previously but the importance of impaired $G\alpha_z$ coupling for the association with T2D risk is of interest because the tissue distribution and GPCR coupling profile of $G\alpha_z$ is more restricted than that of $G\alpha_{i1}$. Indeed, $G\alpha_z$ is mainly expressed in different brain regions and in retinal ganglion cells (51, 52), all regions for which MLT receptor expression has been reported (53, 54). In addition, the intrinsic GTPase activity of $G\alpha_z$ is very slow, with a hydrolysis rate that is 200-fold slower than that determined for any other $G\alpha$ protein (55). These results introduce $G\alpha_z$ as a previously uncharacterized player in MT_2 signaling with a potential effect on T2D risk.

Although the recruitment of β -arrestin2 to MT_2 in transfected cells has been reported (56, 57), the physiological importance of this phenomenon and its robustness in a cellular context expressing endogenous MT_2 receptors remain unclear. MT_2 has indeed a poor capacity for MLT-induced β -arrestin recruitment, an observation that was confirmed here. Part of this

difficulty to reveal ligand-induced β -arrestin2 recruitment might be explained by the high degree of spontaneous β -arrestin2 recruitment observed here. This spontaneous activity was completely lost for several variants, including the four loss-of-MLT binding mutants, which suggests that the measured spontaneous activity is receptor-dependent. β -arrestins are important regulators of GPCR function and scaffolding platforms for many signaling complexes (38) but the role of β -arrestin recruitment in MT_2 function in peripheral and central tissues is currently unknown. Our results indicating an association between the spontaneous recruitment of β -arrestin2 to the receptor and T2D risk point to a possible important role of β -arrestin2 recruitment to MT_2 .

Another unexpected and potentially relevant outcome of our study is the association of spontaneous MT_2 activity, namely β -arrestin 2 recruitment, with T2D risk. The notion that spontaneous and ligand-induced receptor activation of the 40 variants should be considered as independent signaling properties is supported by the poor correlation of these two parameters for three signaling pathways ($G\alpha_{i1}$ activation, $G\alpha_z$ activation, and β -arrestin2 recruitment), which enabled us to determine the effects of both parameters independently on disease risk. Spontaneous MLT receptor activity was previously described for G proteins in transfected cells and tissues (58-60). Our study shows that MT_2 also spontaneously recruits β -arrestin. The importance of constitutive GPCR activity in disease has been discussed in the mesolimbic dopamine system for cannabinoid 1, 5-HT_{2C}, and μ -opioid receptors (61). Spontaneous activity as a risk factor for T2D is particularly interesting in the case of MT_2 , given that its cognate ligand, MLT, is only produced during the night and absent during the daytime because of a direct inhibitory effect of light on MLT synthesis (62). This opens the interesting possibility that MT_2 function might not only be physiologically relevant during

the night but also during the day, at a time when the regulation of plasma insulin concentrations is most important in humans.

Whereas the link between the *MTNR1B* gene and T2D risk has been firmly established in humans (8), the molecular mechanism and relevant melatonin target tissues in humans remain largely unknown. Studies on rodent pancreatic β -cells indicate that these cells are relevant MLT targets in which MT_1 or MT_2 activation inhibits insulin secretion through the $G_i/cAMP$ pathway (63). However, studies conducted with human pancreatic β -cells did not have clear conclusions and several studies using single-cell transcriptome profiling and RNA sequencing detected *MTNR1B* transcripts only in a minor fraction (5%) of human islet cells and at extremely low concentrations (27) (64), questioning the physiological relevance and effect of *MTNR1B* expression in the human pancreas. Functional studies on the common SNP rs10830963, located in the intron of *MTNR1B*, showed a two-fold increase in *MTNR1B* mRNA abundance in human pancreatic islets of GG T2D risk allele carriers (9). However, the functional importance of this observation remains unclear because increased amounts of mRNA transcripts do not necessarily result in increased numbers of receptors. Furthermore, even if an increase in receptor number occurs, this does not necessarily result in an increased signaling capacity because of the presence of spare receptors or chronic receptor desensitization.

Taken together with the currently available data, the initially proposed inhibitory action of MT_2 in human β -cells warrants revision and may be too simplistic. Other potential physiological outputs and MLT target tissues should be considered. Among those are the well-documented effect of MLT on the circadian rhythm of the hypothalamic master clock and the effects on insulin target tissues, such as the adipose tissue (17). Without having

clarified this important point, validation of our results obtained in the HEK 293 model system into a physiologically relevant context remains challenging. Our results provide hints about the most relevant signaling pathways potentially involved, which are the activation of $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ and the recruitment of β -arrestin2. These results will direct future research for the relevant physiological outputs of MLT action. The finding that spontaneous receptor activity also contributes to T2D will be important in guiding future studies in humans by also considering the effects of MT_2 during the daytime, when MLT is not produced.

In terms of therapeutic perspectives, both medical intervention and life style recommendations can be envisioned. The predominant defects observed in MT_2 variants are decreased E_{max} values, suggesting that improving the residual responsiveness in these patients is a possible therapeutic strategy. Because most of the loss-of-function mutants were defective for G protein activation and β -arrestin2 recruitment, an optimal treatment should aim to improve both components. In terms of life-style recommendations, future studies will have to establish whether carriers of MT_2 variants suffer from MLT-specific dysfunctions, such as sleep problems or circadian misalignment of sleep-wake cycles with feeding rhythms. If this is the case, carriers of MT_2 variants could benefit from specific life-style recommendations to decrease their T2D risk. Because carriers of MT_2 variants are rare or very rare, such interventions should be seen in the context of personalized medicine. Based on the signaling signatures established in our study, patient groups might be identified that would benefit from a similar treatment. Similar examples of other GPCRs are melanocortin MC4 receptor mutants, which are associated with severe early-onset obesity for which defective cell-surface expression can be rescued with pharmacological chaperones (65), and gain-of-function mutants of the chemokine receptor CXCR4 identified in patients with the

WHIM syndrome for which the CXCR4 antagonist AMD3100 is currently in clinical trials (66).

Our study further highlights an often-neglected issue, which is the time of blood sampling or functional examination of patients to obtain meaningful results when trying to understand the biology of the MLT system. Indeed, apart from the circadian secretion profile of MLT, the constitutive MT₂ activity and its potential importance during the day time, when MLT concentrations are low, should also be taken into account in this respect. Finally, the set of 40 natural MT₂ variants will constitute a rich source for future structure-function studies of biased receptor signaling.

Conclusion

We provide here a comprehensive framework for the functional characterization of GPCR variants that can serve as a template for future studies on further GPCRs. Our results on rare MT₂ variants demonstrate the association of the loss-of-function phenotype with T2D risk, which served as a basis for the dissection of the specific signaling events most statistically significantly associated with the disease. The two main signaling modules of GPCRs, mediated by G proteins and β -arrestins, both seem to contribute to disease risk. Our finding of the association of T2D risk with spontaneous MT₂ activity should provide insights with respect to circadian timing, an important aspect of MLT research. The information on disease-associated signaling pathways will be valuable for future studies in defining the still unknown functionally relevant outputs linking MT₂ to T2D risk. This information will guide future drug-screening programs intended to improve MT₂ function.

Materials and methods

Plasmids and reagents

The 6mycMT₂/pcDNA5/FRT plasmids encoding WT *MTNR1B* and the 40 *MTNR1B* variants were previously described (12). The 3mycMT₂/ARMS2/PL plasmids encoding WT *MTNR1B* and its variants were generated by subcloning the coding regions of *MTNR1B* from the 6mycMT₂/pcDNA5/FRT plasmids into the pCMV-ProLink expression vector, pCMV-ARMS2-PK2 (DiscoverX). The resulting plasmid encoded in the C terminus the ProLink (PL), a small enzyme donor fragment of β -galactosidase (β -gal) complementary peptide, fused to the target receptor. All constructs were verified by Sanger sequencing (Institut Cochin Sequencing Facility). MLT was obtained from Tocris Biosciences.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney 293T (HEK 293T) cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin. HEK 293 cells stably expressing a β -arrestin2- β -gal-Enzyme Acceptor (EA) fusion protein (DiscoverX) were maintained in the same culture conditions, but with the addition of hygromycin B to maintain expression of the transgene. All cells were transfected with PEI (Polysciences, Inc.) or Xtremegene 9 (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of cell surface receptor expression

ELISAs were performed as previously described (67) using the mouse anti-myc antibody and a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse immunoglobulin G (IgG) whole sheep secondary antibody (Sigma).

BRET assay

G α i1 activation was assessed by measuring BRET between RlucII-G α i1 and GFP10-G γ 2 upon treatment of HEK 293 cells cotransfected to express G β 1, receptor, and BRET sensors

with MLT (68). This BRET pair was also used for the screening of G α proteins activated by MT₂, except for RlucII-G α s, RlucII-G α z, RlucII-G α q, and RlucII-G α 12/13. For these RlucII-tagged sensors, GFP10-G γ 1 was used given that optimal responsive window is generally obtained using these BRET sensor pairs for these G α proteins (fig. S1A). For this G α protein screening, vasopressin receptor type 2 was used as a positive control for G α s activation, whereas muscarinic type 2, angiotensin type 1, and TP α receptors were used as positive controls for G α i/o, G α q, and G α 12/13, respectively. For G α z activation, the MLT-induced increase in BRET between RlucII-G γ 5 and GRK2-GFP10 was monitored in the presence of G α z, G β 1, and the receptor. The same BRET pair was also used for the screening of G α proteins activated by MT₂ (fig. S1B). Transfected cells were plated in poly-D-lysine-pretreated, 96-well white microplates (100 μ l/well; Greiner). Forty-eight hours after transfection, the cells were washed with DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) and then Tyrode's buffer was added. After the addition of agonist, the cells were incubated for 10 min at 37°C and coelenterazine 400a (2.5 μ M; NanoLight Technology) was added 5 min before BRET reading in a Synergy Neo microplate reader (BioTek) (acceptor filter: 515 \pm 30 nm; donor filter: 410 \pm 80 nm). Net BRET represents the BRET signal subtracted by the BRET monitored in the absence of a GFP10-tagged sensor. Δ BRET refers to the difference in net BRET recorded from cells treated with agonist and cells treated with vehicle. For the agonist dose-response curves, the percentage of the response of the WT receptor was calculated from the Δ BRET value obtained from a given variant divided by the Δ BRET obtained from the WT receptor in the same experiment. Spontaneous G α i1 or G α z activation was calculated from the variant Δ BRET value divided by the Δ BRET obtained from the WT receptor in the same experiment, where Δ BRET here represents the difference in basal net BRET (vehicle only) in cells expressing biosensors and the receptor and the basal net BRET monitored in cells expressing biosensors only (mock).

Homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF)-based cAMP assay

The intracellular concentrations of cAMP were determined in cells transiently expressing MT₂ or one of the 40 MT₂ variants in the presence of 2 μM FSK and after 30 min of stimulation with *MLT* at room temperature by *HTRF* using the “cAMP femto2” kit (Cisbio) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of β-arrestin2 recruitment

The PathHunter assay (DiscoverX) was used to measure interactions between MT₂ and β-arrestin2 as previously described (43). HEK 293 cells stably expressing a fusion protein of β-arrestin2 with a larger fragment of β-gal, called enzyme acceptor (EA) were transiently transfected with the 3mycMT₂PL plasmids. Two days after transfection, the medium was replaced with AssayComplete cell plating 4 reagent (DiscoverX) containing *MLT* and the cells were incubated for 2 hours at 37°C. Activation of the MT₂/PL stimulates the binding of β-arrestin2-EA fusion protein to the PL-tagged MT₂ and forces complementation of the two β-gal enzyme fragments, resulting in the formation of an active β-gal enzyme. This interaction leads to an increase in enzyme activity that can be measured with chemiluminescent PathHunter Detection Reagents (DiscoverX; <https://www.discoverx.com/arrestin>) and represents β-arrestin2 recruitment to the receptor. Luminescence signal was determined after 60 min of incubation at room temperature.

Measurement of pERK1/2 abundance

Intracellular pERK1/2 was measured using the Surefire pERK kit (Thr202/Tyr204; Perkin Elmer) in HEK 293T cells transiently expressing the *MTNR1B* or the *MTNR1B* variants, as previously described (69). Given that the peak of pERK phosphorylation was previously observed for MT₂ at 5 min after *MLT* stimulation (12), this time point was chosen to test the ability of MT₂ variants to activate ERK in *MLT* dose-response curves.

Evolutionary action analysis

The predicted effect of each variant within the MT₂ receptor was calculated as previously described (36) using the amino acid sequence deduced from the *MTNR1B* gene for the query.

Statistical analysis

LogEC₅₀, logIC₅₀, and agonist-induced E_{max} values were determined by nonlinear regression with a variable Hill slope using GraphPad Prism software (version 6.0). For each assay, the agonist-induced E_{max} value for every MT₂ variant was normalized as a percentage of the maximal MLT-stimulated response of the WT receptor (set at 100) monitored in parallel with the receptor variant. The dose-response curves were fitted to an operational model of agonism designed by Kenakin and Christopoulos (34)(45) to obtain log(τ/K_A) values for the WT receptor and its variants. Normally, an agonist is set as a reference agonist, against which within-pathway comparisons for the same receptor to other agonists can be made and expressed as $\Delta\log(\tau/K_A)$. In this study, within-pathway comparisons were made between MT₂ variants and the WT receptor. For each variant, the basal activation of G α_{i1} , activation of G α_z , and recruitment of β -arrestin2 activation was expressed as a percentage of that of the WT receptor. Normalized difference was calculated on values corresponding to the constitutive activation, agonist-induced E_{max} and $\Delta\log(\tau/K_A)$ to fit a -1 to +1 scale using the following formula: (variant – WT)/ (variant + WT). In the case of $\Delta\log(\tau/K_A)$, before normalization, the anti-logs were first calculated and then were fitted to the aforementioned formula. Positive and negative values represent mutations with better or worst responses, respectively, than that of the WT receptor. Subsequently, logIC₅₀, logEC₅₀, agonist-induced E_{max}, and $\Delta\log(\tau/K_A)$ values were expressed as means \pm SEM of the indicated number of experiments (n). Statistical analysis for logIC₅₀, logEC₅₀, and agonist-induced E_{max} was performed by comparing independent fits with a global fit that shared the selected parameter,

whereas a one-sample *t* test was used to examine the mean differences between WT MT₂ and its variants for the values corresponding to the basal activation and $\Delta\log(\tau/K_A)$ ratios.

T2D case-control association study

As previously described (12), rare *MTNR1B* variants (with a frequency <1%) were analyzed in aggregation according to their functional effect. In a T2D case-control study including 2,186 individuals with T2D and 4,804 controls with normal fasting glucose concentrations, we assessed the effect of these aggregated variants on T2D risk through the kernel-based adaptive cluster method (47) embedded in a logistic regression model adjusted for age, gender, and body mass index. Following the Bonferroni correction, a *P* value < 0.0056 (= 0.05÷9; where 9 was the number of independent tests performed in the present study) was considered to be statistically significant, whereas a *P* value between 0.05 and 0.0056 was considered nominal. These statistical analyses were performed through R. All samples were collected with appropriate informed consent with their use in the present study. All cohort studies followed ethical principles defined in the Helsinki declaration, and they were approved by local ethical committees from Lille (France), Paris (France), Poitiers (France) and Cambridge (UK).

REFERENCES AND NOTES

1. A. American Diabetes, Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* **37 Suppl 1**, S14-80 (2014).
2. G. Vassart, S. Costagliola, G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 362-372 (2011).
3. Y. Oh da, J. M. Olefsky, G protein-coupled receptors as targets for anti-diabetic therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **15**, 161-172 (2016).
4. B. Ahren, Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 369-385 (2009).
5. A. Bonnefond, P. Froguel, Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know? *Cell Metab* **21**, 357-368 (2015).
6. N. Bouatia-Naji, A. Bonnefond, P. Froguel, [Inputs from the genetics of fasting glucose: lessons for diabetes]. *Med Sci (Paris)* **25**, 897-902 (2009).
7. V. Lyssenko, C. L. Nagorny, M. R. Erdos, N. Wierup, A. Jonsson, P. Spiegel, M. Bugliani, R. Saxena, M. Fex, N. Pulizzi, B. Isomaa, T. Tuomi, P. Nilsson, J.

- Kuusisto, J. Tuomilehto, M. Boehnke, D. Altshuler, F. Sundler, J. G. Eriksson, A. U. Jackson, M. Laakso, P. Marchetti, R. M. Watanabe, H. Mulder, L. Groop, Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* **41**, 82-88 (2009).
8. A. Bonnefond, L. Valeriya, in *From Association to Function*. (Springer International Publishing, 2016).
 9. T. Tuomi, C. L. Nagorny, P. Singh, H. Bennet, Q. Yu, I. Alenkvist, B. Isomaa, B. Ostman, J. Soderstrom, A. K. Pesonen, S. Martikainen, K. Raikonen, T. Forsen, L. Hakaste, P. Almgren, P. Storm, O. Asplund, L. Shcherbina, M. Fex, J. Fadista, A. Tengholm, N. Wierup, L. Groop, H. Mulder, Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes. *Cell Metab* **23**, 1067-1077 (2016).
 10. J. Fadista, P. Vikman, E. O. Laakso, I. G. Mollet, J. L. Esguerra, J. Taneera, P. Storm, P. Osmark, C. Ladenvall, R. B. Prasad, K. B. Hansson, F. Finotello, K. Uvebrant, J. K. Ofori, B. Di Camillo, U. Krus, C. M. Cilio, O. Hansson, L. Eliasson, A. H. Rosengren, E. Renstrom, C. B. Wollheim, L. Groop, Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13924-13929 (2014).
 11. M. van de Bunt, J. E. Manning Fox, X. Dai, A. Barrett, C. Grey, L. Li, A. J. Bennett, P. R. Johnson, R. V. Rajotte, K. J. Gaulton, E. T. Dermitzakis, P. E. MacDonald, M. I. McCarthy, A. L. Gloyn, Transcript Expression Data from Human Islets Links Regulatory Signals from Genome-Wide Association Studies for Type 2 Diabetes and Glycemic Traits to Their Downstream Effectors. *PLoS Genet* **11**, e1005694 (2015).
 12. A. Bonnefond, N. Clément, K. Fawcett, L. Yengo, E. Vaillant, J. L. Guillaume, A. Dechaume, F. Payne, R. Roussel, S. Czernichow, S. Hercberg, S. Hadjadj, B. Balkau, M. Marre, O. Lantieri, C. Langenberg, N. Bouatia-Naji, G. Charpentier, M. Vaxillaire, G. Rocheleau, N. J. Wareham, R. Sladek, M. I. McCarthy, C. Dina, I. Barroso, R. Jockers, P. Froguel, M.-A. o. G. , I.-R. T. Consortium, Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet* **44**, 297-301 (2012).
 13. N. Clement, N. Renault, J. L. Guillaume, E. Cecon, A. S. Journe, X. Laurent, K. Tadagaki, F. Coge, A. Gohier, P. Delagrang, P. Chavatte, R. Jockers, Importance of the second extracellular loop for melatonin MT1 receptor function and absence of melatonin binding in GPR50. *Br J Pharmacol* **175**, 3281-3297 (2017).
 14. R. Jockers, P. Maurice, J. A. Boutin, P. Delagrang, Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* **154**, 1182-1195 (2008).
 15. R. Jockers, P. Delagrang, M. L. Dubocovich, R. P. Markus, N. Renault, G. Tosini, E. Cecon, D. P. Zlotos, Update on Melatonin Receptors. IUPHAR Review. *Br J Pharmacol* **173**, 2702-2725 (2016).
 16. M. L. Dubocovich, P. Delagrang, D. N. Krause, D. Sugden, D. P. Cardinali, J. Olcese, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* **62**, 343-380 (2010).
 17. G. Tosini, S. Owino, J. L. Guillaume, R. Jockers, Understanding melatonin receptor pharmacology: Latest insights from mouse models, and their relevance to human disease. *Bioessays* **36**, 778-787 (2014).
 18. E. Peschke, I. Bahr, E. Muhlbauer, Melatonin and pancreatic islets: interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. *Int J Mol Sci* **14**, 6981-7015 (2013).

19. A. Karamitri, N. Renault, N. Clement, J. L. Guillaume, R. Jockers, Minireview: Toward the establishment of a link between melatonin and glucose homeostasis: association of melatonin MT2 receptor variants with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol* **27**, 1217-1233 (2013).
20. R. D. Ramracheya, D. S. Muller, P. E. Squires, H. Brereton, D. Sugden, G. C. Huang, S. A. Amiel, P. M. Jones, S. J. Persaud, Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* **44**, 273-279 (2008).
21. S. Costes, M. Boss, A. P. Thomas, A. V. Matveyenko, Activation of Melatonin Signaling Promotes beta-Cell Survival and Function. *Mol Endocrinol* **29**, 682-692 (2015).
22. N. Y. Feng, A. H. Bass, "Singing" Fish Rely on Circadian Rhythm and Melatonin for the Timing of Nocturnal Courtship Vocalization. *Curr Biol* **26**, 2681-2689 (2016).
23. C. J. McMullan, E. S. Schernhammer, E. B. Rimm, F. B. Hu, J. P. Forman, Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *Jama* **309**, 1388-1396 (2013).
24. E. Peschke, I. Bahr, E. Muhlbauer, Experimental and clinical aspects of melatonin and clock genes in diabetes. *J Pineal Res* **59**, 1-23 (2015).
25. D. M. Blodgett, A. Nowosielska, S. Afik, S. Pechhold, A. J. Cura, N. J. Kennedy, S. Kim, A. Kucukural, R. J. Davis, S. C. Kent, D. L. Greiner, M. G. Garber, D. M. Harlan, P. diIorio, Novel Observations From Next-Generation RNA Sequencing of Highly Purified Human Adult and Fetal Islet Cell Subsets. *Diabetes* **64**, 3172-3181 (2015).
26. K. J. Gaulton, T. Ferreira, Y. Lee, A. Raimondo, R. Magi, M. E. Reschen, A. Mahajan, A. Locke, N. W. Rayner, N. Robertson, R. A. Scott, I. Prokopenko, L. J. Scott, T. Green, T. Sparso, D. Thuillier, L. Yengo, H. Grallert, S. Wahl, M. Franberg, R. J. Strawbridge, H. Kestler, H. Chheda, L. Eisele, S. Gustafsson, V. Steinthorsdottir, G. Thorleifsson, L. Qi, L. C. Karssen, E. M. van Leeuwen, S. M. Willems, M. Li, H. Chen, C. Fuchsberger, P. Kwan, C. Ma, M. Linderman, Y. Lu, S. K. Thomsen, J. K. Rundle, N. L. Beer, M. van de Bunt, A. Chalisey, H. M. Kang, B. F. Voight, G. R. Abecasis, P. Almgren, D. Baldassarre, B. Balkau, R. Benediktsson, M. Bluher, H. Boeing, L. L. Bonnycastle, E. P. Bottinger, N. P. Burtt, J. Carey, G. Charpentier, P. S. Chines, M. C. Cornelis, D. J. Couper, A. T. Crenshaw, R. M. van Dam, A. S. Doney, M. Dorkhan, S. Edkins, J. G. Eriksson, T. Esko, E. Eury, J. Fadista, J. Flannick, P. Fontanillas, C. Fox, P. W. Franks, K. Gertow, C. Gieger, B. Gigante, O. Gottesman, G. B. Grant, N. Grarup, C. J. Groves, M. Hassinen, C. T. Have, C. Herder, O. L. Holmen, A. B. Hreidarsson, S. E. Humphries, D. J. Hunter, A. U. Jackson, A. Jonsson, M. E. Jorgensen, T. Jorgensen, W. H. Kao, N. D. Kerrison, L. Kinnunen, N. Klopp, A. Kong, P. Kovacs, P. Kraft, J. Kravic, C. Langford, K. Leander, L. Liang, P. Lichtner, C. M. Lindgren, E. Lindholm, A. Linneberg, C. T. Liu, S. Lobbens, J. Luan, V. Lyssenko, S. Mannisto, O. McLeod, J. Meyer, E. Mihailov, G. Mirza, T. W. Muhleisen, M. Muller-Nurasyid, C. Navarro, M. M. Nothen, N. N. Oskolkov, K. R. Owen, D. Palli, S. Pechlivanis, L. Peltonen, J. R. Perry, C. G. Platou, M. Roden, D. Ruderfer, D. Rybin, Y. T. van der Schouw, B. Sennblad, G. Sigurethsson, A. Stancakova, G. Steinbach, P. Storm, K. Strauch, H. M. Stringham, Q. Sun, B. Thorand, E. Tikkanen, A. Tonjes, J. Trakalo, E. Tremoli, T. Tuomi, R. Wennauer, S. Wiltshire, A. R. Wood, E. Zeggini, I. Dunham, E. Birney, L. Pasquali, J. Ferrer, R. J. Loos, J. Dupuis, J. C. Florez, E. Boerwinkle, J. S. Pankow, C. van Duijn, E. Sijbrands, J. B. Meigs, F. B. Hu, U. Thorsteinsdottir, K. Stefansson, T. A. Lakka, R. Rauramaa, M. Stumvoll, N. L. Pedersen, L. Lind, S. M. Keinanen-

- Kiukaanniemi, E. Korpi-Hyovalti, T. E. Saaristo, J. Saltevo, J. Kuusisto, M. Laakso, A. Metspalu, R. Erbel, K. H. Jocke, S. Moebus, S. Ripatti, V. Salomaa, E. Ingelsson, B. O. Boehm, R. N. Bergman, F. S. Collins, K. L. Mohlke, H. Koistinen, J. Tuomilehto, K. Hveem, I. Njolstad, P. Deloukas, P. J. Donnelly, T. M. Frayling, A. T. Hattersley, U. de Faire, A. Hamsten, T. Illig, A. Peters, S. Cauchi, R. Sladek, P. Froguel, T. Hansen, O. Pedersen, A. D. Morris, C. N. Palmer, S. Kathiresan, O. Melander, P. M. Nilsson, L. C. Groop, I. Barroso, C. Langenberg, N. J. Wareham, C. A. O'Callaghan, A. L. Gloyn, D. Altshuler, M. Boehnke, T. M. Teslovich, M. I. McCarthy, A. P. Morris, D. I. G. Replication, C. Meta-analysis, Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet* **47**, 1415-1425 (2015).
27. A. Segerstolpe, A. Palasantza, P. Eliasson, E. M. Andersson, A. C. Andreasson, X. Sun, S. Picelli, A. Sabirsh, M. Clausen, M. K. Bjursell, D. M. Smith, M. Kasper, C. Ammala, R. Sandberg, Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* **24**, 593-607 (2016).
 28. A. Bonnefond, A. Karamitri, R. Jockers, P. Froguel, The Difficult Journey from Genome-wide Association Studies to Pathophysiology: The Melatonin Receptor 1B (MT2) Paradigm. *Cell Metab* **24**, 345-347 (2016).
 29. B. Marcheva, K. M. Ramsey, E. D. Buhr, Y. Kobayashi, H. Su, C. H. Ko, G. Ivanova, C. Omura, S. Mo, M. H. Vitaterna, J. P. Lopez, L. H. Philipson, C. A. Bradfield, S. D. Crosby, L. JeBailey, X. Wang, J. S. Takahashi, J. Bass, Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* **466**, 627-631 (2010).
 30. J. Bass, J. S. Takahashi, Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* **330**, 1349-1354 (2010).
 31. A. Knutsson, A. Kempe, Shift work and diabetes--a systematic review. *Chronobiol Int* **31**, 1146-1151 (2014).
 32. J. M. Lane, A. M. Chang, A. C. Bjornnes, D. Aeschbach, C. Anderson, B. E. Cade, S. W. Cain, C. A. Czeisler, S. A. Gharib, J. J. Gooley, D. J. Gottlieb, S. F. Grant, E. B. Klerman, D. S. Lauderdale, S. W. Lockley, M. Munch, S. Patel, N. M. Punjabi, S. M. Rajaratnam, M. Rueger, M. A. St Hilaire, N. Santhi, K. Scheuermaier, E. Van Reen, P. C. Zee, S. A. Shea, J. F. Duffy, O. M. Buxton, S. Redline, F. A. Scheer, R. Saxena, Impact of Common Diabetes Risk Variant in MTNR1B on Sleep, Circadian, and Melatonin Physiology. *Diabetes* **65**, 1741-1751 (2016).
 33. S. Galandrin, G. Oligny-Longpre, M. Bouvier, The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 423-430 (2007).
 34. T. Kenakin, A. Christopoulos, Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 205-216 (2013).
 35. E. Cecon, A. Oishi, R. Jockers, Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *Br J Pharmacol* **175**, 3263-3280 (2017).
 36. P. Katsonis, O. Lichtarge, A formal perturbation equation between genotype and phenotype determines the Evolutionary Action of protein-coding variations on fitness. *Genome Res* **24**, 2050-2058 (2014).
 37. R. R. Gainetdinov, R. T. Premont, L. M. Bohn, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* **27**, 107-144 (2004).
 38. S. Rajagopal, K. Rajagopal, R. J. Lefkowitz, Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 373-386 (2010).

39. D. Calebiro, V. O. Nikolaev, L. Persani, M. J. Lohse, Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **31**, 221-228 (2010).
40. J. P. Vilaradaga, F. G. Jean-Alphonse, T. J. Gardella, Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nat Chem Biol* **10**, 700-706 (2014).
41. N. G. Tsvetanova, R. Irannejad, M. von Zastrow, G protein-coupled receptor (GPCR) signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes. *J Biol Chem* **290**, 6689-6696 (2015).
42. A. R. Thomsen, B. Plouffe, T. J. Cahill, 3rd, A. K. Shukla, J. T. Tarrasch, A. M. Dosey, A. W. Kahsai, R. T. Strachan, B. Pani, J. P. Mahoney, L. Huang, B. Breton, F. M. Heydenreich, R. K. Sunahara, G. Skiniotis, M. Bouvier, R. J. Lefkowitz, GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* **166**, 907-919 (2016).
43. D. L. Bassoni, W. J. Raab, P. L. Achacoso, C. Y. Loh, T. S. Wehrman, Measurements of beta-arrestin recruitment to activated seven transmembrane receptors using enzyme complementation. *Methods Mol Biol* **897**, 181-203 (2012).
44. J. W. Black, P. Leff, Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **220**, 141-162 (1983).
45. T. Kenakin, C. Watson, V. Muniz-Medina, A. Christopoulos, S. Novick, A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci* **3**, 193-203 (2012).
46. O. Lichtarge, H. R. Bourne, F. E. Cohen, An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol* **257**, 342-358 (1996).
47. D. J. Liu, S. M. Leal, A novel adaptive method for the analysis of next-generation sequencing data to detect complex trait associations with rare variants due to gene main effects and interactions. *PLoS Genet* **6**, e1001156 (2010).
48. G. D. C. T2D-GENES Consortium, DIAGRAM Consortium. (2016/07/25).
49. M. R. Nelson, D. Wegmann, M. G. Ehm, D. Kessner, P. St Jean, C. Verzilli, J. Shen, Z. Tang, S. A. Bacanu, D. Fraser, L. Warren, J. Aponte, M. Zawistowski, X. Liu, H. Zhang, Y. Zhang, J. Li, Y. Li, L. Li, P. Woollard, S. Topp, M. D. Hall, K. Nangle, J. Wang, G. Abecasis, L. R. Cardon, S. Zollner, J. C. Whittaker, S. L. Chissole, J. Novembre, V. Mooser, An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. *Science* **337**, 100-104 (2012).
50. A. Karamitri, R. Jockers, in *Methods in Pharmacology and Toxicology series, G Protein-Coupled Receptor Genetics: Research and Methods in the Post-Genomic Era*, C. W. Stefens, Ed. (Springer Science, New York, 2014), pp. 313-332.
51. D. R. Hinton, J. C. Blanks, H. K. Fong, P. J. Casey, E. Hildebrandt, M. I. Simons, Novel localization of a G protein, Gz-alpha, in neurons of brain and retina. *J Neurosci* **10**, 2763-2770 (1990).
52. M. E. Kimple, J. W. Joseph, C. L. Bailey, P. T. Fueger, I. A. Hendry, C. B. Newgard, P. J. Casey, Galphaz negatively regulates insulin secretion and glucose clearance. *J Biol Chem* **283**, 4560-4567 (2008).
53. K. Baba, A. Benleulmi-Chaachoua, A. S. Journe, M. Kamal, J. L. Guillaume, S. Dussaud, F. Gbahou, K. Yettou, C. Liu, S. Contreras-Alcantara, R. Jockers, G. Tosini, Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci Signal* **6**, ra89 (2013).
54. R. M. Slominski, R. J. Reiter, N. Schlabritz-Loutsevitch, R. S. Ostrom, A. T. Slominski, Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* **351**, 152-166 (2012).

55. P. J. Casey, H. K. Fong, M. I. Simon, A. G. Gilman, Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *J Biol Chem* **265**, 2383-2390 (1990).
56. T. Sakurai, T. Koike, M. Nakayama, Pharmacological characterization of a highly selective and potent partial agonist of the MT(2) melatonin receptor. *Pharmacology* **93**, 244-252 (2014).
57. M. Kamal, F. Gbahou, J. L. Guillaume, A. M. Daulat, A. Benleulmi-Chaachoua, M. Luka, P. Chen, D. Kalbasi Anaraki, M. Baroncini, C. Mannoury la Cour, M. J. Millan, V. Prevot, P. Delagrangé, R. Jockers, Convergence of melatonin and serotonin (5-HT) signaling at MT2/5-HT2C receptor heteromers. *J Biol Chem* **290**, 11537-11546 (2015).
58. S. Devavry, C. Legros, C. Brasseur, P. Delagrangé, G. Spadoni, W. Cohen, B. Malpoux, J. A. Boutin, O. Nosjean, Description of the constitutive activity of cloned human melatonin receptors hMT(1) and hMT(2) and discovery of inverse agonists. *J Pineal Res* **53**, 29-37 (2012).
59. M. A. Ayoub, C. Couturier, E. Lucas-Meunier, S. Angers, P. Fossier, M. Bouvier, R. Jockers, Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277**, 21522-21528 (2002).
60. C. Ersahin, M. I. Masana, M. L. Dubocovich, Constitutively active melatonin MT(1) receptors in male rat caudal arteries. *Eur J Pharmacol* **439**, 171-172 (2002).
61. F. J. Meye, G. M. Ramakers, R. A. Adan, The vital role of constitutive GPCR activity in the mesolimbic dopamine system. *Transl Psychiatry* **4**, e361 (2014).
62. J. Arendt, Melatonin, circadian rhythms, and sleep. *N Engl J Med* **343**, 1114-1116 (2000).
63. E. Peschke, I. Stumpf, I. Bazwinsky, L. Litvak, H. Dralle, E. Muhlbauer, Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* **42**, 350-358 (2007).
64. S. K. Thomsen, A. Ceroni, M. van de Bunt, C. Burrows, A. Barrett, R. Scharfmann, D. Ebner, M. I. McCarthy, A. L. Gloyn, Systematic Functional Characterization of Candidate Causal Genes for Type 2 Diabetes Risk Variants. *Diabetes* **65**, 3805-3811 (2016).
65. P. Rene, C. Le Gouill, I. D. Pogozheva, G. Lee, H. I. Mosberg, I. S. Farooqi, K. J. Valenzano, M. Bouvier, Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity. *J Pharmacol Exp Ther* **335**, 520-532 (2010).
66. D. H. McDermott, J. Lopez, F. Deng, Q. Liu, T. Ojode, H. Chen, J. Ulrick, N. Kwatema, C. Kelly, S. Anaya-O'Brien, M. Garofalo, M. Marquesen, D. Hilligoss, R. DeCastro, H. L. Malech, P. M. Murphy, AMD3100 is a potent antagonist at CXCR4(R334X), a hyperfunctional mutant chemokine receptor and cause of WHIM syndrome. *J Cell Mol Med* **15**, 2071-2081 (2011).
67. F. F. Hamdan, M. D. Rochdi, B. Breton, D. Fessart, D. E. Michaud, P. G. Charest, S. A. Laporte, M. Bouvier, Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem* **282**, 29089-29100 (2007).
68. S. Armando, J. Quoyer, V. Lukashova, A. Maiga, Y. Percherancier, N. Heveker, J. P. Pin, L. Prezeau, M. Bouvier, The chemokine CXCL4 and CC2 receptors form homo- and heterooligomers that can engage their signaling G-protein effectors and betaarrestin. *FASEB J* **28**, 4509-4523 (2014).

69. E. T. van der Westhuizen, B. Breton, A. Christopoulos, M. Bouvier, Quantification of ligand bias for clinically relevant beta2-adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. *Mol Pharmacol* **85**, 492-509 (2014).
70. M. Steinfath, B. Geertz, W. Schmitz, H. Scholz, A. Haverich, I. Breil, P. Hanrath, C. Reupcke, M. Sigmund, H. B. Lo, Distinct down-regulation of cardiac $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ - adrenoceptors in different human heart diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **343**, 217-220 (1991).
71. J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, F. V. Di, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001).

Acknowledgments

We thank A. Green and the Discoverx team for their valuable advice in assay design and continuous support. We thank A. Oishi, E. Cecon (Institut Cochin, France), and N. Clement (Clement, Institut Curie, France) for their help during the reviewing process. We are grateful to the D.E.S.I.R. (B. Balkau, M. Marre, O. Lantieri, and R. Roussel) and Corbeil (G. Charpentier) study groups for the availability of genetic data. **Funding:** This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-BSV1-012-01 “MLT2D” and ANR-2011-META “MELA-BETES”, ANR-12-RPIB-0016 “MED-HET-REC-2”), the Fondation de la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20130326503), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the “Who am I?” laboratory of excellence No.ANR-11-LABX-0071 funded by the French Government through its “Investments for the Future” program operated by The French National Research Agency (70) under grant No.ANR-11-IDEX-0005-01 (to R.J.); by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating (MOP10501) and Foundation grants (FDN148431) to M. Bouvier and a Post-Doctoral Fellowship from CIHR and a Post-Doctoral Fellowship Award from Diabetes Canada (71) to B.P. M. Bouvier holds a Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. A.B. is supported by INSERM.

Author contributions

A.K., B.P., A.B., P.F., M. Bouvier, and R.J. participated in the project design; A.K., B.P., M.C., J.L.G., and A.H. performed the biochemical investigation; A.B., M. Boissel, and M.C. performed the genetic investigation; J.G., and O.L. performed the Evolutionary Action analysis; C.L., N.J.W., C.L.G., V.L., and P.F. provided resources; A.K., B.P., A.B., M. Bouvier, and R.J. wrote the original draft of the manuscript; A.K., B.P., A.B., J.G., P.F., M.

Bouvier, and R.J. participated in the writing, reviewing, and editing of the manuscript; A.K., B.P. A.B., P.F., M. Bouvier, and R.J. participated in funding acquisition; A.K., A.B., O.L., M. Bouvier, and R.J. supervised the experiments.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Data and materials availability

All BRET-based biosensors used in the study are available for non-commercial use through a regular academic Material Transfer Agreement. All data needed to evaluate the conclusions of this study are available in the paper or the supplementary materials.

Figures

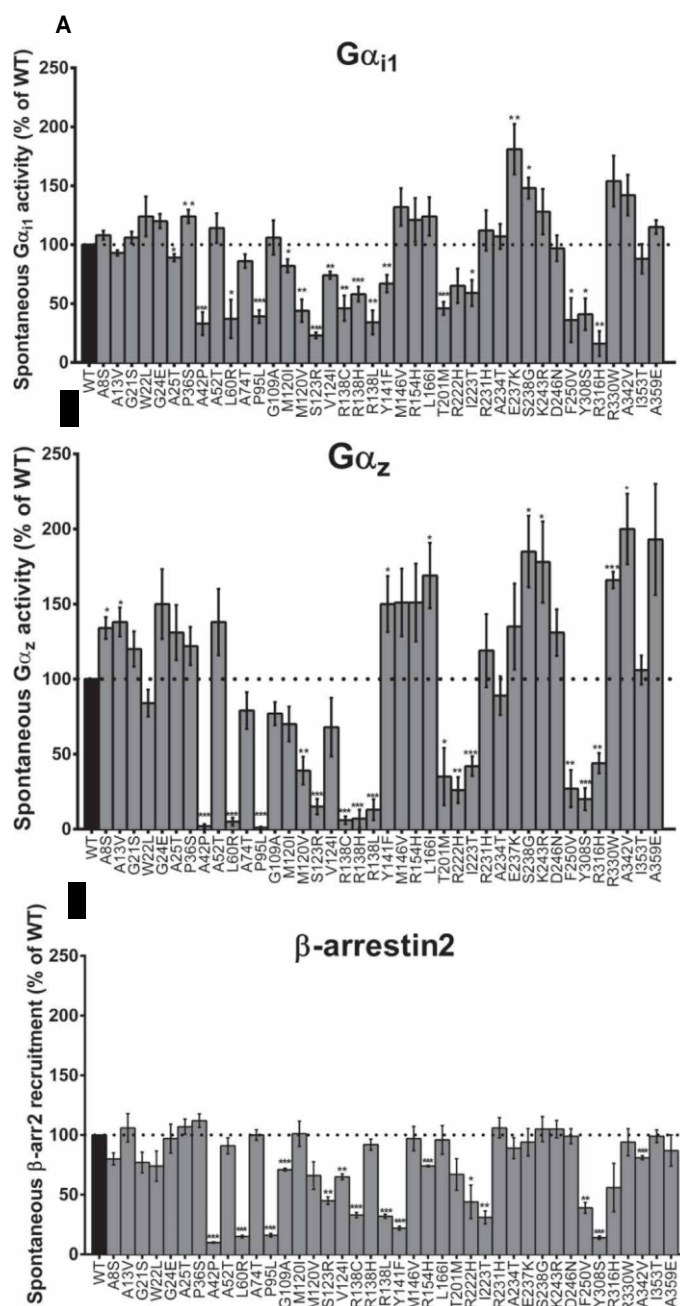


Fig. 1. Functional profiling of MT₂ variants for spontaneous receptor activity.

(A) Spontaneous G α_{i1} activity of WT MT₂ and the indicated MT₂ variants as measured by BRET. (B) Spontaneous G α_z activity of WT MT₂ and the indicated MT₂ variants as measured by BRET. (C) Spontaneous recruitment of β -arrestin2 (β -arr2) to WT MT₂ and the indicated MT₂ variants as measured by the pathHunter β -arrestin2 assay. Data are shown as a percentage of the activity of WT MT₂ (indicated by the dotted line) and are means \pm SEM of at least three experiments. One-sample t-test was performed to assess statistically significant differences between the WT receptor and the MT₂ variants. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.0001. See also tables S1 to S5 for complete data sets for the spontaneous activity of MT₂ variants.

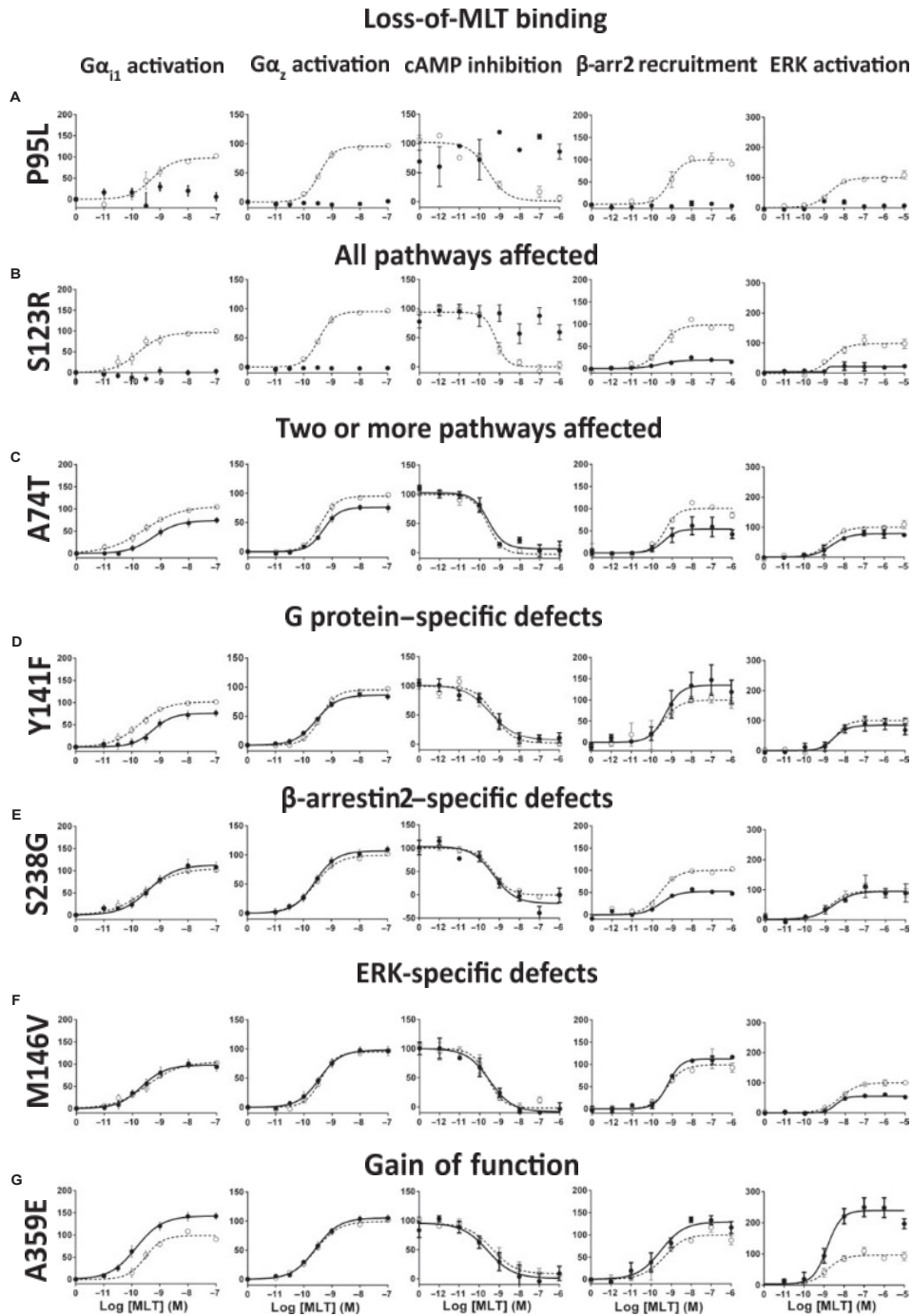
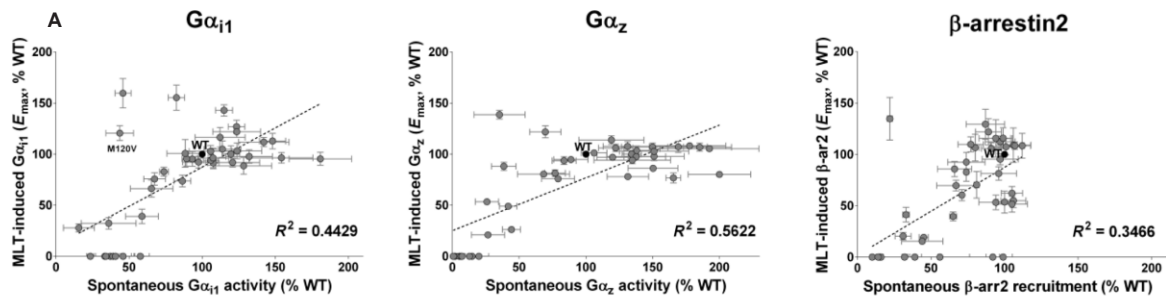


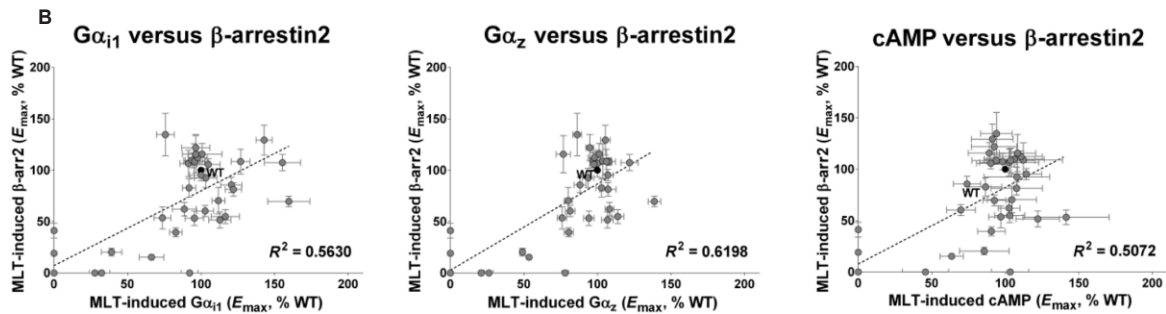
Fig. 2. MLT concentration-response curves for the MT_2 -mediated signaling of variants representing each signaling profile.

(A to G) Analysis of the signaling profiles of MT_2 variants. The MT_2 variant tested is listed on the left. Each of the five categories of signaling profile is listed above the row of graphs for each variant receptor. The effect of each variant on signaling is listed for each panel. Solid lines with filled circles correspond to the variant MT_2 and dotted lines with open circles correspond to the WT MT_2 , which was monitored in parallel with the variant receptors in each experiment. Data were plotted using non-linear regression with a variable Hill slope. Data are means \pm SEM of at least three experiments. See also fig. S4 and tables S1 to S5 for complete data sets for the agonist-mediated signaling activity of MT_2 variants.

Spontaneous activity versus MLT-induced effect



G protein versus β -arrestin



G protein versus cAMP

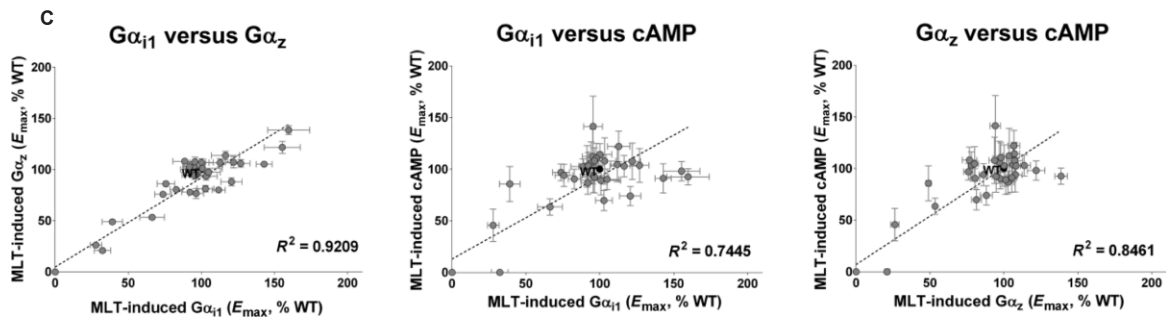


Fig. 3. Relationships between spontaneous and MLT-induced MT₂ variant activation, between G protein- and β -arrestin2-dependent events, and between different G protein signaling events.

(A) Correlation plots between the spontaneous and MLT-induced effects (E_{max}) of each variant MT₂ for G α_{i1} activation (left), G α_z activation (middle), and β -arrestin2 recruitment (right). (B) Correlation plots between the E_{max} values of MLT-induced G α_{i1} activation, G α_z activation, and cAMP inhibition with β -arrestin2 recruitment for each variant MT₂. (C) Correlation plots between the E_{max} values of MLT-induced G α_{i1} activation and G α_z activation (left), G α_{i1} activation and cAMP inhibition (middle), and G α_z activation and cAMP inhibition of each variant MT₂. Spontaneous activities and E_{max} values represent means \pm SEM of at least three experiments and were normalized to those of the WT MT₂. Data were fitted by linear regression analysis and R^2 values were obtained for the overall correlation. All R values are statistically significant with P values less than 0.0001. See also fig. S6 for correlations between spontaneous and agonist-promoted activity for G proteins and β -arrestin signaling parameters.

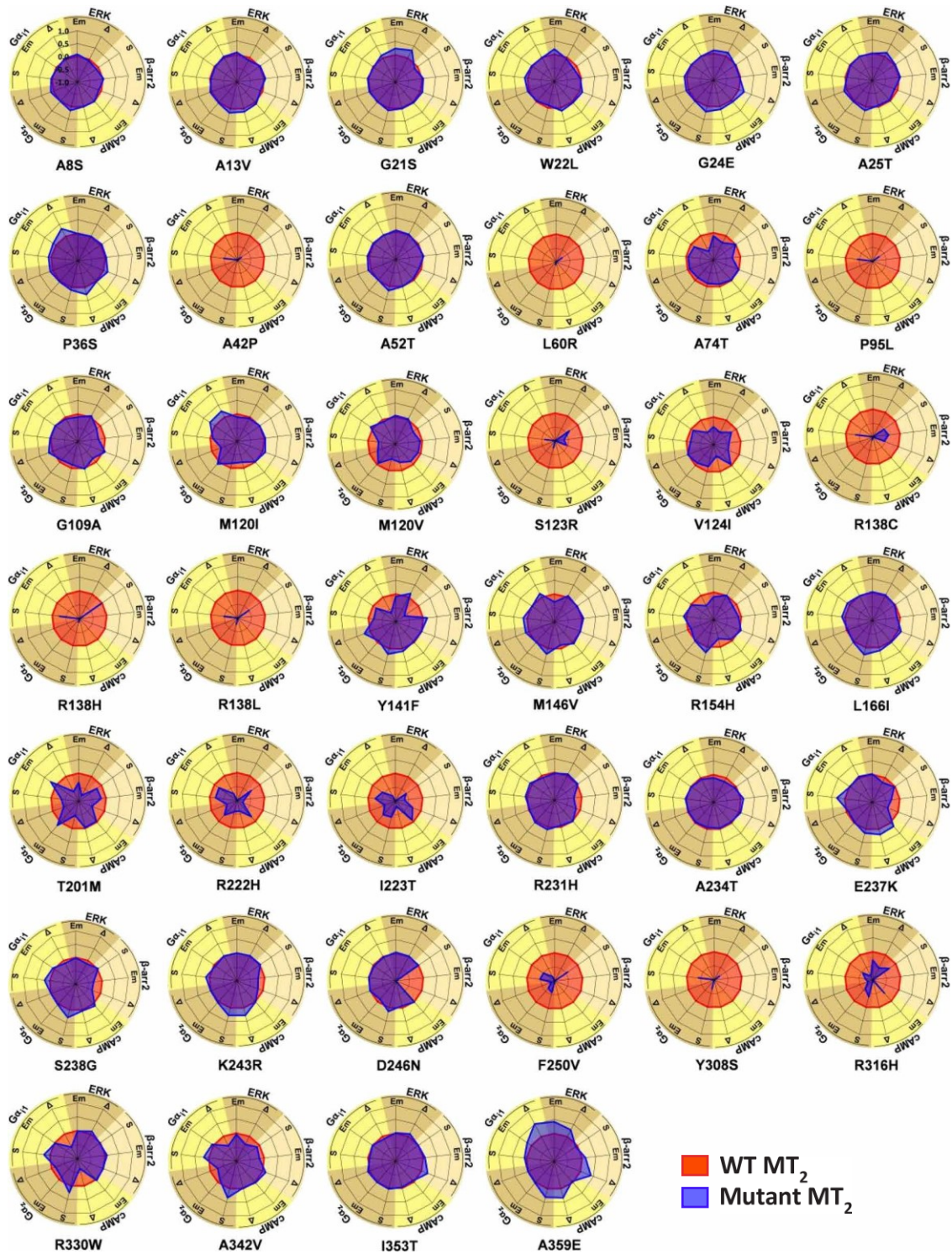


Fig. 4. Graphical representation of the signaling signatures of MT₂ variants.

Radial graphs representing spontaneous and MLT-induced activation of $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$, inhibition of cAMP production, recruitment of β -arrestin2, and activation of ERK by WT MT₂ and the 40 indicated MT₂ variants. The activity of WT MT₂ was set as zero. Values of variants with enhanced properties ranged from 0 to +1 and those with impaired properties ranged from 0 to -1. The scale of all radial graphs ranged from -1 to +1. S, spontaneous; Em, agonist-mediated efficacy; Δ , $\Delta\log(\tau/K_A)$. See also tables S1 to S5 for complete data sets for spontaneous and agonist-mediated signaling activity of the MT₂ variants.

A

MT ₂ variant	EA score	MT ₂ variant	EA score	MT ₂ variant	EA score	MT ₂ variant	EA score
A8S	0.76	A74T	28.36	Y141F	20.58	S238G	7.36
A13V	9.02	P95L	94.56	M146V	24.23	K243R	1.56
G21S	1.69	G109A	48.93	R154H	0.83	D246N	18.31
W22L	25.00	M120I	32.82	L166I	3.59	F250V	76.81
G24E	29.78	M120V	45.38	T201M	45.25	Y308S	96.34
A25T	6.19	S123R	96.79	R222H	34.74	R316H	81.90
P36S	28.31	V124I	51.82	I223T	81.78	R330W	38.10
A42P	11.17	R138C	79.82	R231H	50.72	A342V	17.04
A52T	26.31	R138H	57.60	A234T	40.79	I353T	1.86
L60R	79.70	R138L	80.64	E237K	8.74	A359E	12.00

B

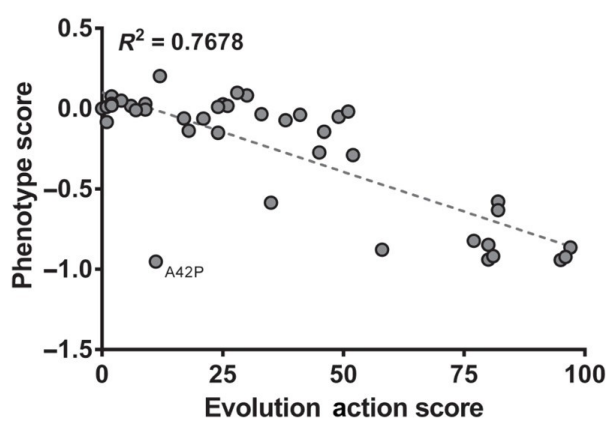


Fig. 5. Evolutionary Action analysis of MT₂ variants and correlation with signaling impairment.

(A) An Evolutionary Action (EA) score was calculated for each indicated MT₂ variant. EA ranges from 0 to 100 with a score of 0 predicted as benign and a score of 100 predicted as highly impactful or detrimental to protein function. Scores are colored based on EA [EA = 0 (pink) to EA = 100 (blue)]. (B) Functional defects of every MT₂ variant were defined by phenotype score and correlated with the EA score. Data were fitted by linear regression analysis and R² values obtained for the overall correlation. Correlation value was statistically significant, $P < 0.0001$. The A42P MT₂ variant was excluded from the R² calculation because of the known detrimental effect of proline residues on general protein structure. See also tables S1 to S5 for complete data sets for spontaneous and agonist-mediated signaling activity of the MT₂ variants.

Consequences on MT ₂ Function		Rare MT ₂ Variants	Frequency (cases)	Frequency (controls)	Odds Ratio [95% CI]	P value
Defects in Gα ₁ activation	Spontaneous	A25T, A42P, L60R, P95L, M120I/V, S123R, V124I, R138C/H/L, Y141F, T201M, I223T, F250V, Y308S, R316H	1.1%	0.7%	2.32 [1.17;4.60]	0.016
	MLT-induced	A42P, L60R, A74T, P95L, S123R, V124I, R138C/H/L, Y141F, R154H, T201M, R222H, I223T, F250V, Y308S, R316H, R330W, A342V	1.4%	0.7%	3.25 [1.73;6.10]	2.4×10 ⁻⁴
Defects in Gα _z activation	Spontaneous	A42P, L60R, P95L, M120V, S123R, R138C/H/L, T201M, R222H, I223T, F250V, Y308S, R316H	0.9%	0.5%	2.95 [1.35;6.46]	0.0067
	MLT-induced	A42P, L60R, A74T, P95L, G109A, M120I/V, S123R, V124I, R138C/H/L, Y141F, T201M, R222H, I223T, D246N, F250V, Y308S, R316H, R330W, A342V	1.4%	0.8%	2.93 [1.57;5.45]	7.3×10 ⁻⁴
Defects in cAMP inhibition	MLT-induced	A42P, L60R, P95L, G109A, M120V, S123R, R138C/H/L, R222H, I223T, F250V, Y308S, R316H, R330W	0.9%	0.6%	2.83 [1.31;6.12]	0.0083
Defects in β-arrestin2 recruitment	Spontaneous	A42P, L60R, P95L, G109A, S123R, V124I, R138C/L, Y141F, R154H, R222H, I223T, F250V, Y308S, A342V	1.3%	0.7%	3.06 [1.59;5.90]	8.3×10 ⁻⁴
	MLT-induced	A42P, L60R, A74T, P95L, G109A, M120V, S123R, V124I, R138C/H/L, L166I, T201M, R222H, I223T, R231H, E237K, S238G, D246N, F250V, Y308S, R316H, A342V	2.7%	2.3%	2.13 [1.23;3.70]	0.0071
Defects in ERK activation	MLT-induced	A42P, L60R, A74T, P95L, M120I, S123R, V124I, R138C/H/L, M146V, R154H, T201M, R222H, I223T, F250V, Y308S, R316H	1.2%	0.8%	2.49 [1.29;4.80]	0.0066
Neutral variants		A8S, A13V, G21S, W22L, A25T, P36S, A52T, A234T, I353T, A359E	0.2%	0.2%	2.50 [0.59;10.59]	0.21

Table 1. Association of specific functional defects of rare MT₂ variants with T2D risk.

Only rare MT₂ variants (with a frequency < 1%) were included. By applying Bonferroni correction, a statistically significant *P* value was < 0.0056. A *P* value between 0.05 and 0.0056 was considered a trend of association (a nominal association). Nine independent association tests were performed, based on a T2D case-control study including 2,186 individuals with T2D and 4,804 controls.

Supplementary material

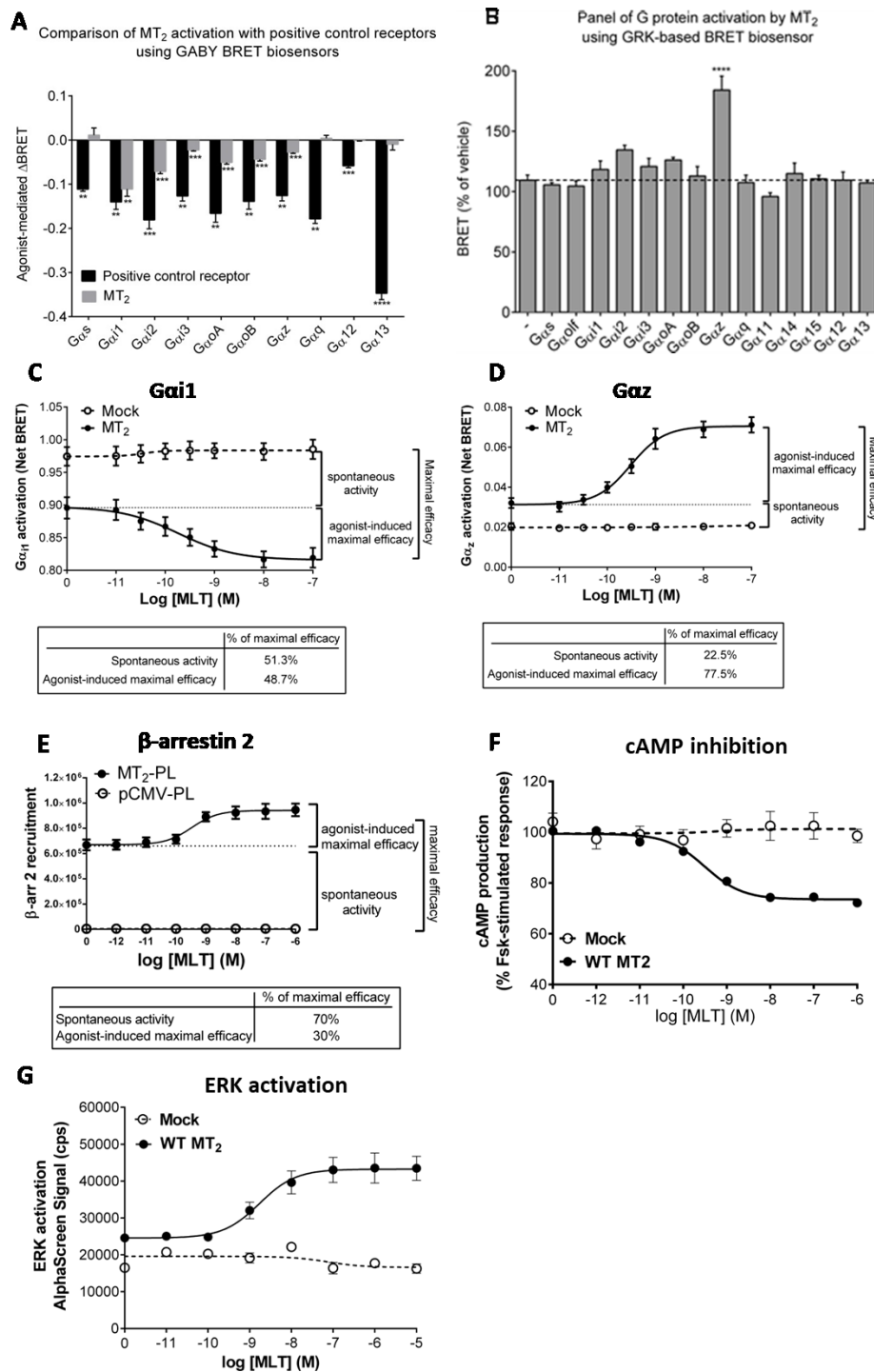


Fig. S1. Screening for G proteins and detection of pathways activated by WT-MT₂.
(A) Screening of G proteins activated by MT₂ by monitoring the melatonin-induced BRET decrease between RlucII- Gα and GFP10-Gγ1 or GFP10-Gγ2 (GABY BRET biosensor). Vasopressin receptor type 2 was used as a positive control for Gα_s activation, and muscarinic type 2, angiotensin type 1, and TPα receptors were used as positive controls for Gα_{i/o}, Gα_q, and Gα_{12/13}, respectively. **(B)** Screening of G proteins activated by MT₂ by monitoring the melatonin-induced BRET increase between RlucII-Gγ5 and GFP10-GRK2 in the absence or

presence of overexpressed $G\alpha$ protein (GRK-based BRET biosensor). (C) Monitoring MT_2 -mediated $G\alpha_{i1}$ spontaneous activity with the RlucII- $G\alpha_{i1}$ /GFP10- $G\gamma_2$ BRET biosensor. (D) Monitoring MT_2 -mediated $G\alpha_z$ spontaneous activity with the RlucII- $G\gamma_5$ /GFP10-GRK2 BRET biosensor. The use of the RlucII- $G\gamma_5$ /GFP10-GRK2 BRET biosensor resulted in a better dynamic window for detecting agonist-promoted activity compared to the RlucII- $G\alpha_z$ /GFP10- $G\gamma_1$ BRET biosensor. (E) Monitoring MT_2 -mediated β -arrestin2 spontaneous recruitment both in the absence and presence of MLT in HEK 293 cells stably expressing β -arrestin2- β -gal-EA and the empty plasmid pCMV-PL or MT_2 -PL with the PathHunter assay. (F) Monitoring MT_2 -mediated cAMP inhibition in the presence or absence of MT_2 . (G) Monitoring MT_2 -mediated ERK activation in the presence or absence of MT_2 . Data in all panels are means \pm SEM of at least three independent experiments.

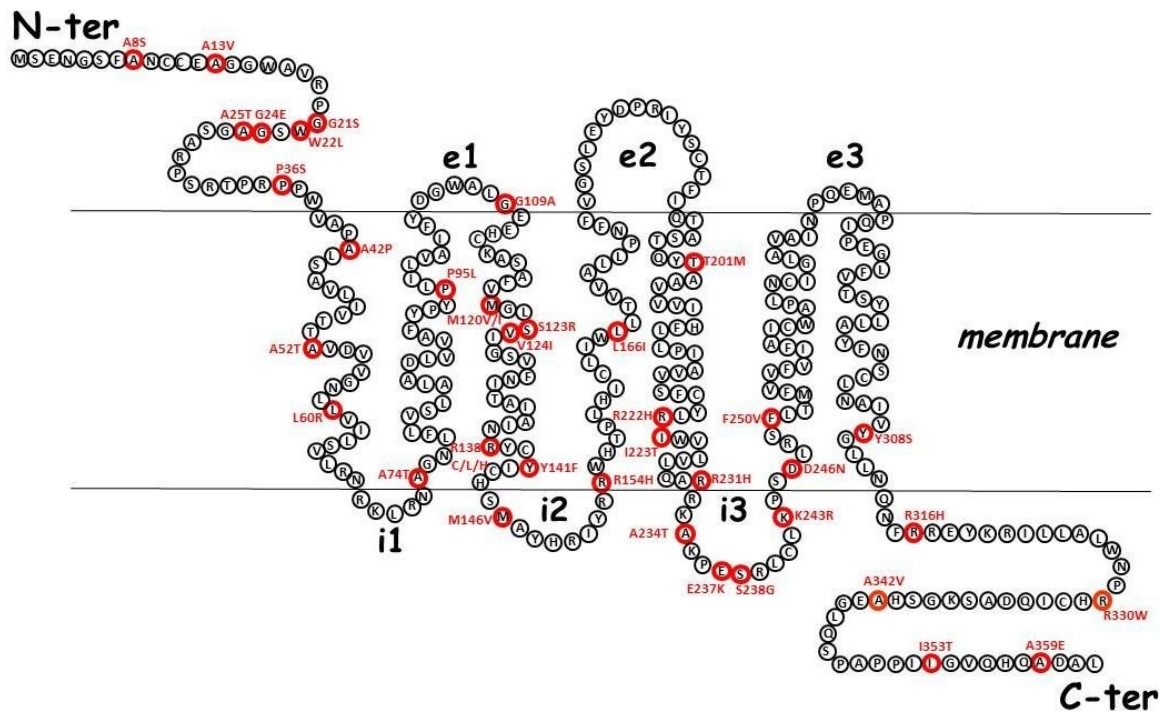


Fig. S2. Predicted topology and distribution of the 40 MT_2 variants.

The different variants are indicated in red. Assignment of residues was obtained by the GPCRdb database (www.gpcrdb.org). e1 to e3, extracellular loops 1 to 3; i1 to i3, intracellular loops 1 to 3.

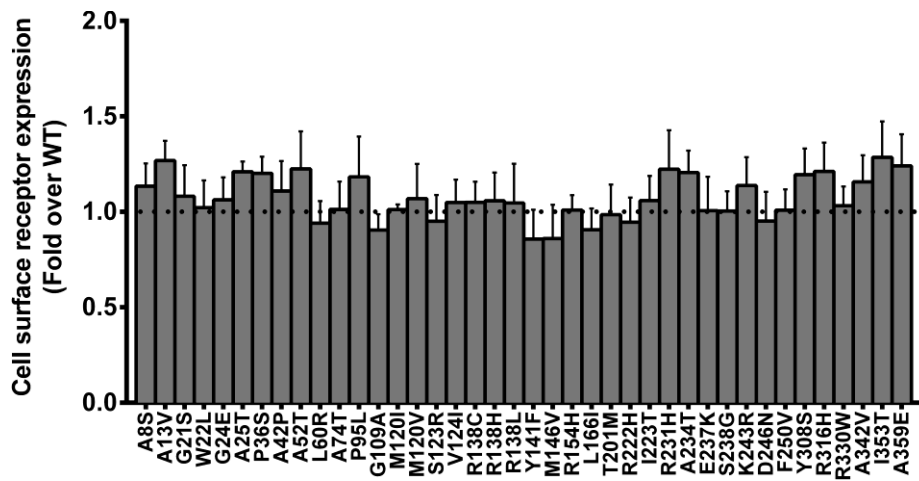


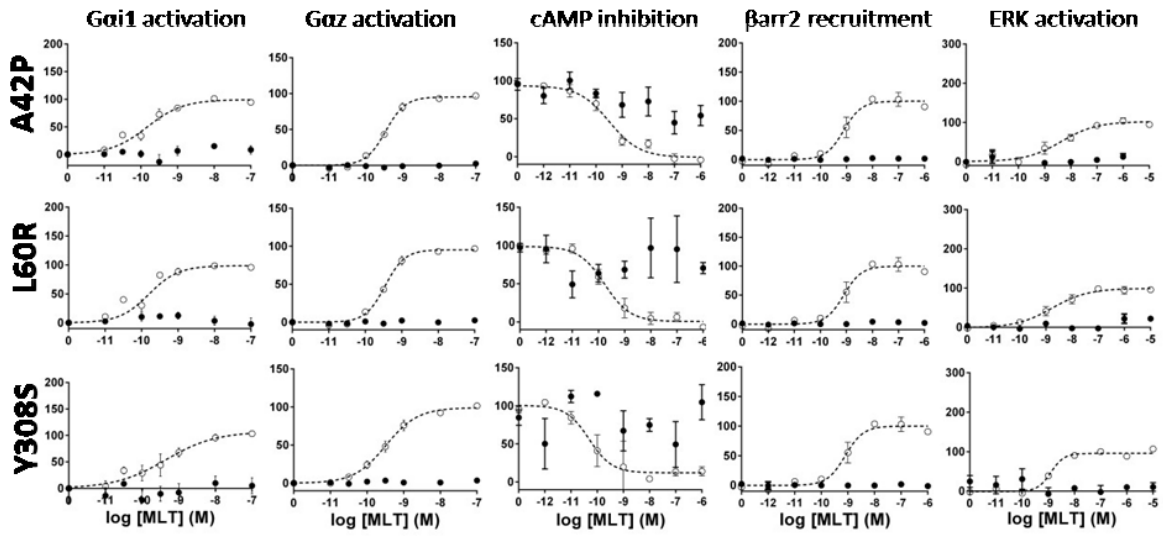
Fig. S3. Detection of MT₂ variants at the cell surface.

All MT₂ variants were expressed at the cell surface as determined by cell surface ELISA. The data were analyzed by one-sample *t* test compared to the WT-MT₂ and are presented as the means \pm SEM of five to ten independent experiments. No statistically significant differences were observed.

Fig. S4

A

Loss-of-MLT binding



B

All pathways affected

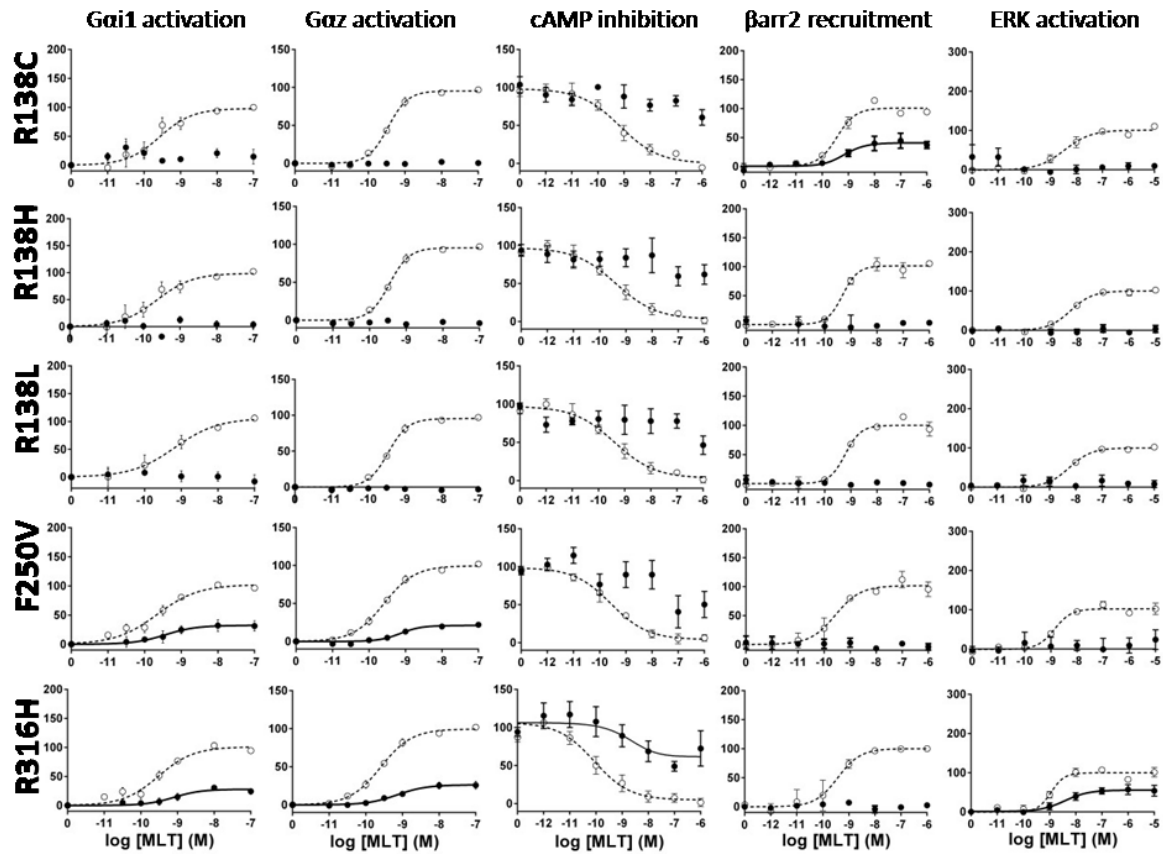


Fig. S4 (continued)

c

Two or more pathways affected

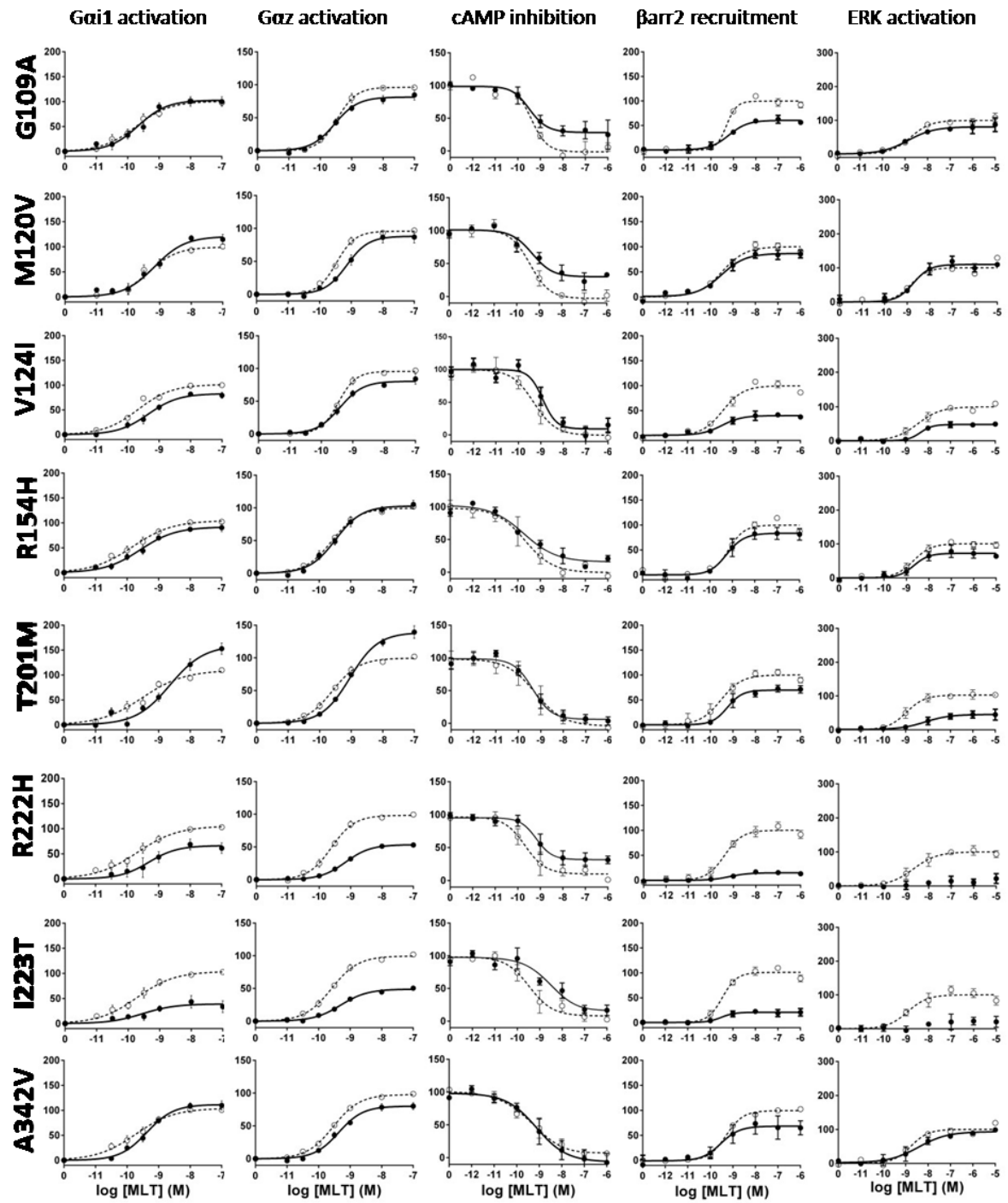
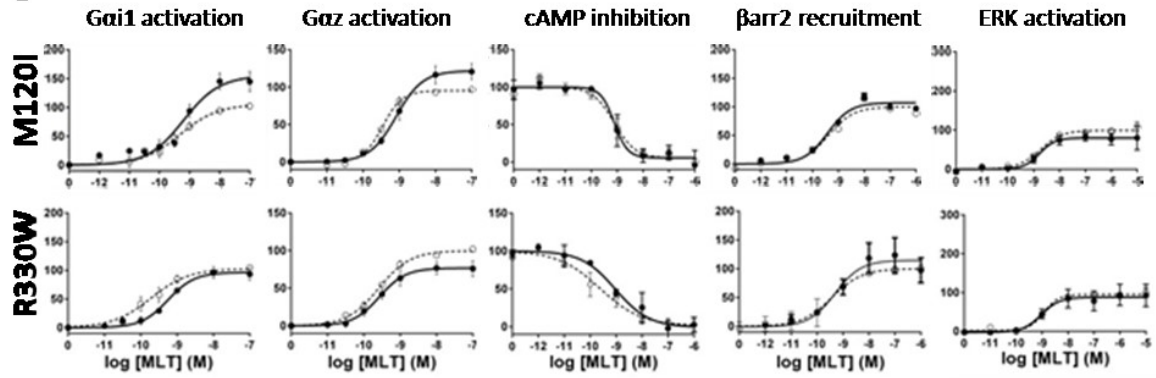


Fig. S4 (continued)

G protein specific defects

D



E

β -arrestin 2 specific defects

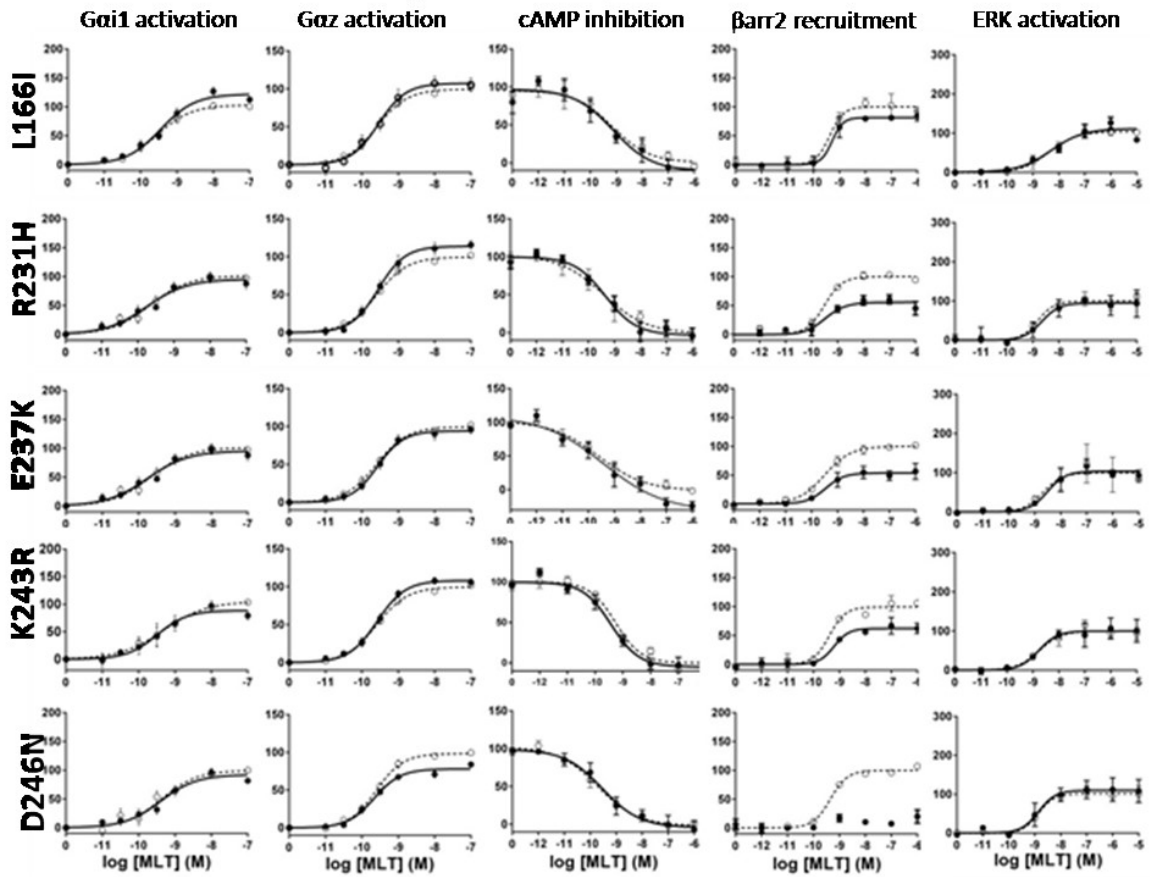


Fig. S4 (continued)

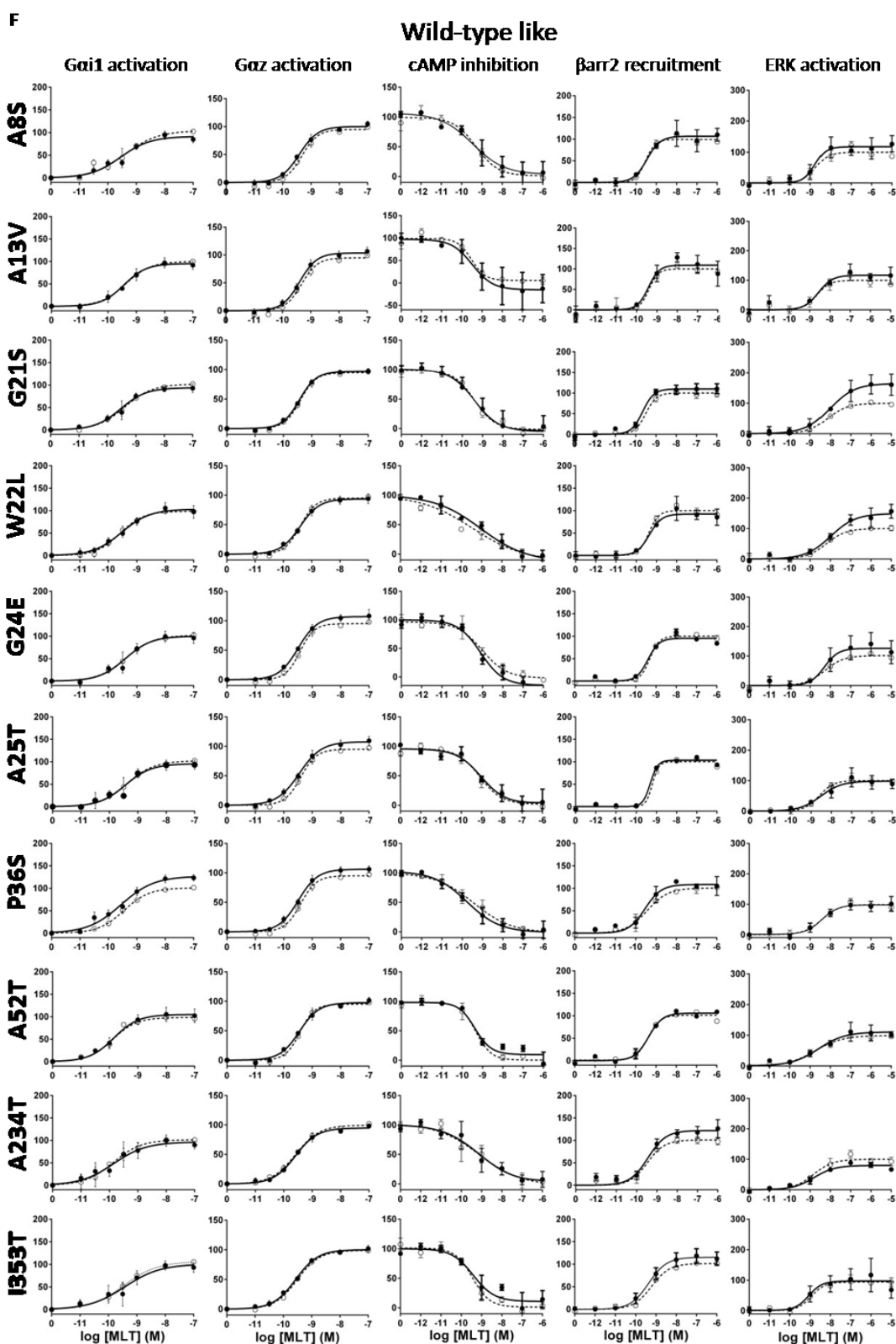


Fig. S4. MLT dose-response curves for *Gai1* and *Gaz* activation, β -arrestin2 recruitment, cAMP inhibition, and ERK activation by MT₂ variants.

(A) MLT dose-response curves for the loss-of-MLT binding MT₂ variants. (B) MLT dose-

response curves for the MT₂ variants with marked defects in all measured pathways. (C) MLT dose-response curves for the MT₂ variants with defects in more than one signaling pathway. (D) MLT dose-response curves for the MT₂ variants with specific defects in G protein activation. (E) MLT dose-response curves for the MT₂ variants with specific defects in β -arrestin2 recruitment. (F) MLT dose-response curves for the MT₂ variants without defects in any of the measured signaling pathways. Solid lines with filled circles correspond to the variant MT₂ and dotted lines with open circles correspond to the WT-MT₂ monitored in parallel with the variant receptors in each experiment. Data were plotted using nonlinear regression with a variable Hill slope. Data are means \pm SEM of at least three experiments.

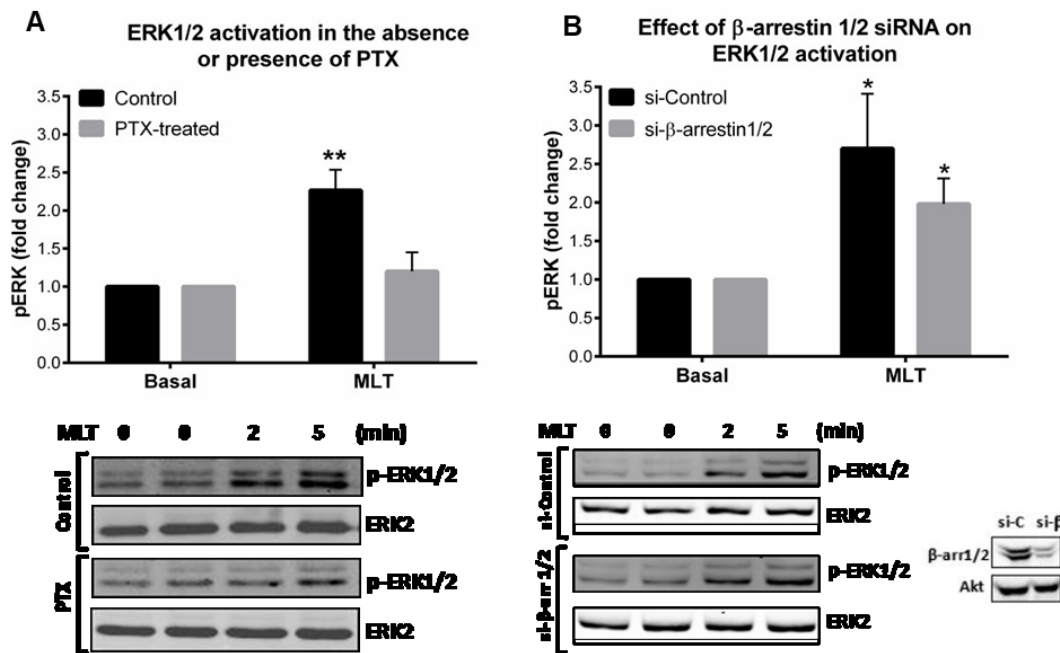


Fig. S5. G protein–dependent but β -arrestin–independent MLT-mediated ERK phosphorylation by MT₂.

(A) Effect of pertussis toxin (PTX) on ERK1/2 phosphorylation kinetics induced by MLT. HEK 293T cells expressing MT₂ were pretreated with or without PTX overnight before being treated with 100 nM MLT for the indicated times. A representative Western blot is shown. The immunoreactive bands for time 0 (basal) and 5 min after MLT addition (MLT) from three independent experiments were quantified, and the data are expressed as the mean \pm SEM of the fold-increase in the abundance of phosphorylated ERK1/2 compared to basal amounts. (B) Effect of siRNA-mediated silencing of β -arrestin1/2 or control siRNA on the kinetics of ERK1/2 phosphorylation induced by MLT. HEK 293T cells expressing MT₂ were transfected with control (si-C) or β -arrestin1/2–specific (si- β) siRNA 72 hours before being treated with 100 nM MLT for the indicated times. A representative Western blot is shown. The immunoreactive bands from three independent experiments for time 0 (basal) and 5 min after MLT addition (MLT) were quantified by densitometry, and the data are expressed as the mean \pm SEM of the fold-increase in the abundance of phosphorylated ERK1/2 compared to basal amounts. Right: Western blot shows knockdown of β -arrestin1/2. AKT was used as a loading control. A one-sample *t* test was performed to assess statistically significant differences between basal and MLT-induced ERK phosphorylation. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

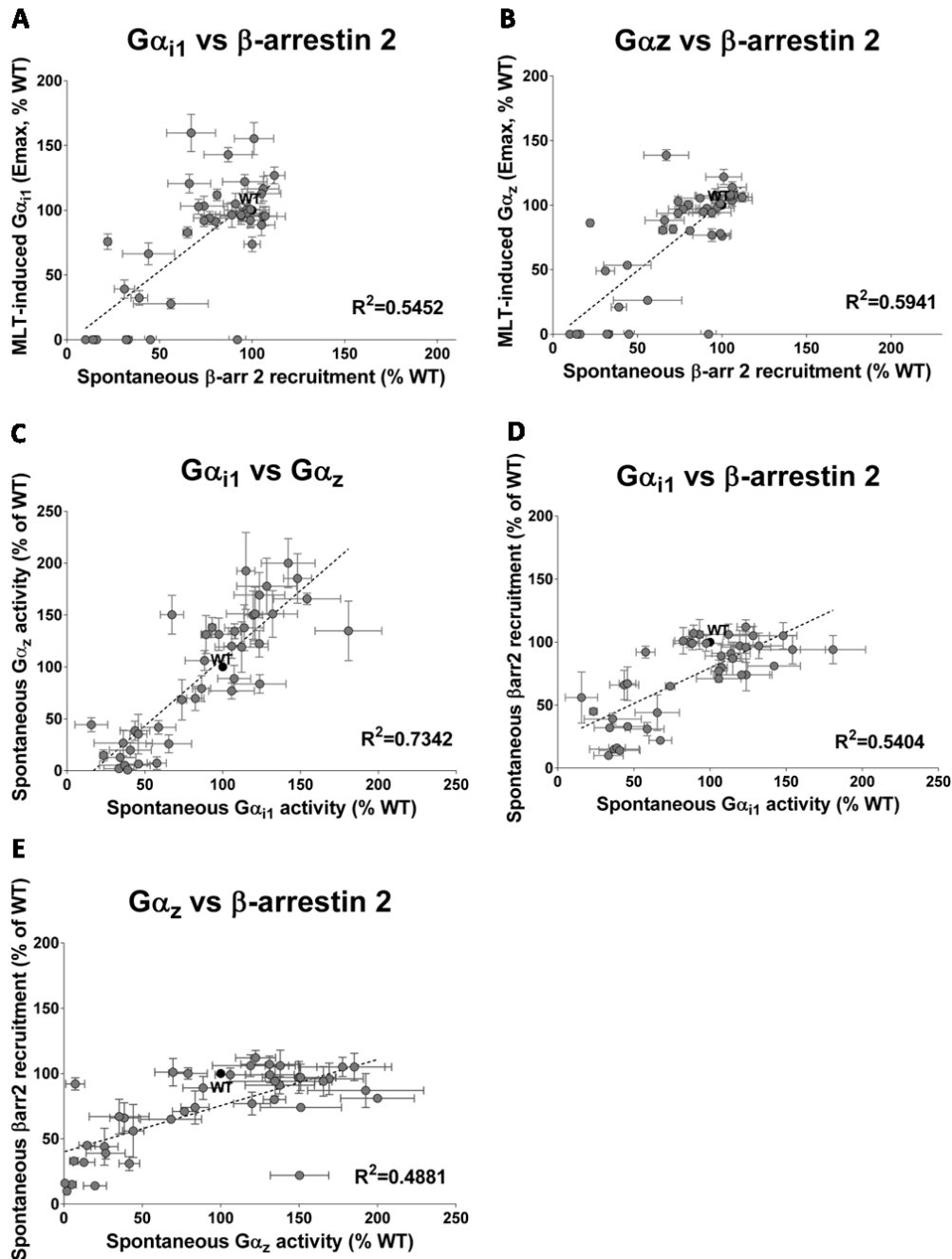


Fig. S6. Correlations between the effects of the mutations on spontaneous and agonist-promoted activity for G proteins and β -arrestin signaling parameters performed pairwise.

(A) Correlation between spontaneous β -arrestin2 recruitment and MLT-induced $G\alpha_{i1}$ activation (E_{max}) of each MT_2 variant. (B) Correlation between spontaneous β -arrestin2 recruitment and MLT-induced $G\alpha_z$ activation (E_{max}) of each MT_2 variant. (C) Correlation between spontaneous $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_z$ activity of each MT_2 variant. (D) Correlation between spontaneous $G\alpha_{i1}$ activity and β -arrestin2 recruitment of each MT_2 variant. (E) Correlation between spontaneous $G\alpha_z$ activity and β -arrestin2 recruitment of each MT_2 variant. Spontaneous activities and E_{max} values represent means \pm SEM of at least three experiments normalized to WT- MT_2 . Data were fitted in GraphPad Prism by linear regression analysis and R^2 values were obtained for the overall correlation.

Variant	Spontaneous activity [#]	Agonist mediated ^{##}	Potency (LogEC ₅₀) ^{##}		Log(τ/K _A)		Δlog(τ/K _A) [#]
	(% WT)	(E _{max}) (% WT)	WT	Variant	WT	Variant	
A8S	108 ± 4	91 ± 6	-9.40 ± 0.12	-9.55 ± 0.14	9.40 ± 0.12	9.42 ± 0.13	0.03 ± 0.18
A13V	93 ± 2	95 ± 7	-9.37 ± 0.08	-9.44 ± 0.16	9.38 ± 0.13	9.42 ± 0.13	0.04 ± 0.18
G21S	106 ± 5	94 ± 5	-9.39 ± 0.09	-9.53 ± 0.11	9.39 ± 0.10	9.49 ± 0.10	0.09 ± 0.14
W22L	123 ± 17	103 ± 8	-9.59 ± 0.08	-9.53 ± 0.16	9.56 ± 0.11	9.55 ± 0.12	-0.01 ± 0.16
G24E	120 ± 6*	100 ± 8	-9.39 ± 0.09	-9.40 ± 0.17	9.39 ± 0.13	9.39 ± 0.12	0.00 ± 0.18
A25T	89 ± 3*	96 ± 7	-9.39 ± 0.09	-9.44 ± 0.16	9.39 ± 0.12	9.40 ± 0.13	0.00 ± 0.18
P36S	124 ± 6**	127 ± 6***	-9.46 ± 0.06	-9.55 ± 0.12	9.27 ± 0.11	9.56 ± 0.09	0.29 ± 0.09*
A42P	33 ± 10***	0***	-9.83 ± 0.08	ND	9.83 ± 0.08	ND	ND
A52T	114 ± 13	105 ± 8	-9.88 ± 0.07	-9.85 ± 0.20	9.86 ± 0.15	9.85 ± 0.14	-0.01 ± 0.21
L60R	37 ± 16*	0***	-9.80 ± 0.10	ND	9.80 ± 0.10	ND	ND
A74T	86 ± 6	74 ± 6*	-9.59 ± 0.11	-9.26 ± 0.18	9.60 ± 0.12	8.94 ± 0.18	-0.66 ± 0.22*
P95L	39 ± 5***	0***	-9.28 ± 0.14	ND	9.28 ± 0.14	ND	ND
G109A	106 ± 15	103 ± 6	-9.73 ± 0.11	-9.66 ± 0.12	9.71 ± 0.11	9.66 ± 0.11	-0.06 ± 0.15
M120I	82 ± 6*	155 ± 12*	-9.32 ± 0.15	-9.20 ± 0.18	8.97 ± 0.21	9.19 ± 0.15	0.22 ± 0.26
M120V	44 ± 9**	121 ± 7*	-9.35 ± 0.11	-9.16 ± 0.12	9.24 ± 0.13	9.17 ± 0.11	-0.07 ± 0.17
S123R	23 ± 2***	0***	-9.77 ± 0.15	ND	9.77 ± 0.15	ND	ND
V124I	74 ± 3**	83 ± 4**	-9.67 ± 0.09	-9.35 ± 0.11*	9.67 ± 0.09	9.19 ± 0.11	-0.48 ± 0.14*
R138C	46 ± 11**	0***	-9.57 ± 0.17	ND	9.57 ± 0.17	ND	ND
R138H	58 ± 6***	0***	-9.63 ± 0.18	ND	9.63 ± 0.18	ND	ND
R138L	34 ± 10**	0***	-9.18 ± 0.29	ND	9.18 ± 0.29	ND	ND
Y141F	67 ± 7**	76 ± 6**	-9.73 ± 0.08	-9.25 ± 0.14**	9.74 ± 0.10	9.08 ± 0.16	-0.66 ± 0.19*
M146V	132 ± 16	98 ± 7	-9.47 ± 0.09	-9.68 ± 0.14	9.50 ± 0.12	9.63 ± 0.11	0.13 ± 0.16
R154H	121 ± 18	92 ± 4	-9.82 ± 0.11	-9.58 ± 0.11	9.83 ± 0.10	9.44 ± 0.11	-0.38 ± 0.15*
L166I	124 ± 16	122 ± 6*	-9.55 ± 0.09	-9.45 ± 0.09	9.45 ± 0.10	9.45 ± 0.08	0.00 ± 0.13
T201M	46 ± 5***	160 ± 14*	-9.51 ± 0.14	-8.64 ± 0.18*	9.21 ± 0.19	8.60 ± 0.16	-0.61 ± 0.25*
R222H	65 ± 15	66 ± 8**	-9.67 ± 0.11	-9.31 ± 0.25	9.68 ± 0.16	8.89 ± 0.26	-0.79 ± 0.30*
I223T	59 ± 11*	39 ± 7*	-9.72 ± 0.10	-9.55 ± 0.39	9.71 ± 0.13	8.77 ± 0.36	-0.95 ± 0.38*
R231H	112 ± 17	116 ± 10	-9.66 ± 0.11	-9.51 ± 0.18	9.57 ± 0.16	9.49 ± 0.15	-0.08 ± 0.22
A234T	107 ± 11	96 ± 10	-9.87 ± 0.13	-9.85 ± 0.25	9.84 ± 0.17	9.79 ± 0.18	-0.05 ± 0.25
E237K	181 ± 21**	95 ± 6	-9.66 ± 0.10	-9.76 ± 0.15	9.65 ± 0.12	9.69 ± 0.12	0.04 ± 0.17
S238G	148 ± 9*	113 ± 8	-9.56 ± 0.12	-9.41 ± 0.14	9.49 ± 0.13	9.39 ± 0.12	-0.10 ± 0.18
K243R	128 ± 19	89 ± 8	-9.32 ± 0.17	-9.49 ± 0.19	9.36 ± 0.18	9.37 ± 0.19	0.01 ± 0.26
D246N	97 ± 11	92 ± 6	-9.37 ± 0.14	-9.40 ± 0.13	9.36 ± 0.13	9.33 ± 0.13	-0.03 ± 0.18
F250V	36 ± 19*	32 ± 6**	-9.66 ± 0.10	-9.43 ± 0.34	9.65 ± 0.12	8.65 ± 0.37	-1.01 ± 0.38*
Y308S	41 ± 13*	0***	-9.36 ± 0.23	ND	9.36 ± 0.23	ND	ND
R316H	16 ± 11**	28 ± 4*	-9.52 ± 0.10	-9.09 ± 0.25	9.52 ± 0.09	8.43 ± 0.34	-1.09 ± 0.35*
R330W	154 ± 22	96 ± 5	-9.72 ± 0.13	-9.25 ± 0.10*	9.74 ± 0.11	9.22 ± 0.11	-0.52 ± 0.15*
A342V	142 ± 17	112 ± 4	-9.73 ± 0.11	-9.37 ± 0.08*	9.68 ± 0.09	9.33 ± 0.09	-0.34 ± 0.13*
I353T	88 ± 12	101 ± 13	-9.46 ± 0.11	-9.42 ± 0.30	9.44 ± 0.20	9.35 ± 0.20	-0.09 ± 0.29
A359E	115 ± 6	143 ± 6***	-9.53 ± 0.07	-9.84 ± 0.10*	9.38 ± 0.12	9.87 ± 0.09	0.49 ± 0.15*

Table S1. Summary of the functional profiling of G α_{i1} activation by WT-MT₂ and MT₂ variants.

Data are means \pm SEM of four to ten independent experiments with repeats in quadruplicate. ND denotes that the experimental parameter could not be determined due to lack of a concentration- response curve. The data were analyzed by comparing independent fits with a global fit that shares the selected parameter (^{##}) and by one-sample *t* test ([#]) compared to the WT. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.0001.

Variant	Spontaneous activity [#]	Agonist mediated ^{d##}	Potency (LogEC ₅₀) ^{##}		Log(τ /K _A)		Δ log(τ /K _A) [#]
	(% WT)	(% WT)	WT	Variant	WT	Variant	
A8S	134 ± 7*	100 ± 3	-9.33 ± 0.05	-9.42 ± 0.06	9.33 ± 0.06	9.43 ± 0.05	0.10 ± 0.08
A13V	138 ± 10*	104 ± 4	-9.33 ± 0.05	-9.39 ± 0.07	9.36 ± 0.08	9.40 ± 0.05	0.04 ± 0.09
G21S	120 ± 12	97 ± 2	-9.41 ± 0.04	-9.44 ± 0.03	9.41 ± 0.05	9.44 ± 0.04	0.03 ± 0.06
W22L	84 ± 9	94 ± 4	-9.41 ± 0.04	-9.41 ± 0.07	9.40 ± 0.05	9.44 ± 0.06	0.05 ± 0.08
G24E	150 ± 23	107 ± 4*	-9.43 ± 0.04	-9.49 ± 0.06	9.44 ± 0.07	9.51 ± 0.05	0.07 ± 0.08
A25T	131 ± 18	108 ± 5*	-9.41 ± 0.04	-9.46 ± 0.08	9.38 ± 0.07	9.48 ± 0.06	0.09 ± 0.09
P36S	122 ± 13	106 ± 4*	-9.41 ± 0.04	-9.49 ± 0.06	9.41 ± 0.06	9.50 ± 0.05	0.09 ± 0.08
A42P	2 ± 1***	0***	-9.46 ± 0.04	ND	9.46 ± 0.04	ND	ND
A52T	138 ± 22	98 ± 3	-9.43 ± 0.04	-9.45 ± 0.05	9.41 ± 0.04	9.50 ± 0.06	0.09 ± 0.12
L60R	5 ± 3***	0***	-9.46 ± 0.04	ND	9.46 ± 0.04	ND	ND
A74T	79 ± 12	76 ± 3***	-9.41 ± 0.04	-9.30 ± 0.06	9.41 ± 0.04	9.35 ± 0.08	-0.06 ± 0.09
P95L	1 ± 1***	0***	-9.46 ± 0.04	ND	9.46 ± 0.04	ND	ND
G109A	77 ± 8	81 ± 3***	-9.46 ± 0.04	-9.54 ± 0.07	9.46 ± 0.04	9.58 ± 0.07	0.12 ± 0.08
M120I	70 ± 12	122 ± 6***	-9.46 ± 0.04	-9.08 ± 0.08***	9.45 ± 0.09	9.11 ± 0.06	-0.34 ± 0.11*
M120V	39 ± 9**	88 ± 4	-9.47 ± 0.03	-9.14 ± 0.08***	9.46 ± 0.05	9.18 ± 0.07	-0.29 ± 0.09*
S123R	15 ± 5***	0***	-9.46 ± 0.04	ND	9.46 ± 0.04	ND	ND
V124I	68 ± 19	80 ± 3***	-9.46 ± 0.03	-9.41 ± 0.07	9.46 ± 0.04	9.47 ± 0.07	0.01 ± 0.08
R138C	6 ± 3***	0***	-9.46 ± 0.04	ND	9.46 ± 0.04	ND	ND
R138H	7 ± 6***	0***	-9.46 ± 0.04	ND	9.46 ± 0.04	ND	ND
R138L	13 ± 7***	0***	-9.46 ± 0.04	ND	9.46 ± 0.04	ND	ND
Y141F	150 ± 19*	86 ± 3*	-9.41 ± 0.04	-9.55 ± 0.06*	9.40 ± 0.04	9.59 ± 0.06	0.19 ± 0.07*
M146V	151 ± 23	98 ± 4	-9.41 ± 0.04	-9.45 ± 0.07	9.39 ± 0.05	9.48 ± 0.07	0.10 ± 0.09
R154H	151 ± 26	103 ± 4	-9.59 ± 0.04	-9.48 ± 0.07	9.58 ± 0.06	9.48 ± 0.06	-0.10 ± 0.08
L166I	169 ± 22*	107 ± 5	-9.59 ± 0.04	-9.55 ± 0.09	9.58 ± 0.08	9.54 ± 0.07	-0.04 ± 0.11
T201M	35 ± 19*	139 ± 4***	-9.59 ± 0.04	-9.04 ± 0.06***	9.44 ± 0.07	9.05 ± 0.05	-0.39 ± 0.09*
R222H	26 ± 9**	53 ± 0***	-9.61 ± 0.04	-9.16 ± 0.06***	9.61 ± 0.35	9.00 ± 0.09	-0.61 ± 0.10**
I223T	42 ± 7***	49 ± 2***	-9.59 ± 0.04	-9.30 ± 0.07**	9.59 ± 0.04	9.02 ± 0.10	-0.57 ± 0.10**
R231H	119 ± 24	114 ± 4**	-9.59 ± 0.04	-9.55 ± 0.07	9.57 ± 0.07	9.55 ± 0.05	-0.02 ± 0.09
A234T	89 ± 13	95 ± 3	-9.59 ± 0.04	-9.59 ± 0.05	9.60 ± 0.04	9.57 ± 0.05	-0.02 ± 0.07
E237K	135 ± 29	94 ± 4	-9.60 ± 0.05	-9.57 ± 0.07	9.62 ± 0.06	9.55 ± 0.06	-0.06 ± 0.09
S238G	185 ± 24*	107 ± 4	-9.59 ± 0.04	-9.59 ± 0.07	9.58 ± 0.06	9.59 ± 0.05	0.01 ± 0.08
K243R	178 ± 27*	108 ± 3*	-9.59 ± 0.04	-9.58 ± 0.05	9.57 ± 0.05	9.58 ± 0.04	0.01 ± 0.07
D246N	131 ± 16	78 ± 2***	-9.61 ± 0.04	-9.66 ± 0.05	9.61 ± 0.04	9.62 ± 0.06	0.01 ± 0.07
F250V	27 ± 12**	21 ± 2***	-9.59 ± 0.04	-9.14 ± 0.13**	9.59 ± 0.04	8.42 ± 0.20	-1.18 ± 0.20**
Y308S	20 ± 7***	0***	-9.49 ± 0.06	ND	9.49 ± 0.06	ND	ND
R316H	44 ± 7**	26 ± 3***	-9.59 ± 0.04	-9.14 ± 0.21*	9.59 ± 0.04	8.59 ± 0.20	-1.00 ± 0.20**
R330W	166 ± 5***	77 ± 5***	-9.59 ± 0.04	-9.57 ± 0.11	9.60 ± 0.07	9.47 ± 0.11	-0.13 ± 0.13
A342V	200 ± 24*	80 ± 3***	-9.54 ± 0.03	-9.36 ± 0.07*	9.54 ± 0.04	9.29 ± 0.06	-0.25 ± 0.08*
I353T	106 ± 10	101 ± 2	-9.53 ± 0.02	-9.55 ± 0.04	9.51 ± 0.03	9.57 ± 0.03	0.06 ± 0.05
A359E	193 ± 37	105 ± 3	-9.59 ± 0.04	-9.58 ± 0.06	9.57 ± 0.05	9.58 ± 0.05	0.01 ± 0.07

Table S2. Summary of the functional profiling of G α_z activation by WT-MT₂ and MT₂ variants.

Data are means ± SEM of four to six independent experiments with repeats in triplicate. ND denotes that the experimental parameter could not be determined due to lack of a concentration-response curve. The data were analyzed by comparing independent fits with a global fit that shares the selected parameter (^{##}) and by one-sample *t* test ([#]) compared to the WT. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.0001.

Variant	Spontaneous activity [#] (% WT)	Agonist mediated ^{##} (E _{max}) (% WT)	Potency (LogEC ₅₀) ^{##}		Log(τ/K _A)		Δlog(τ/K _A) [#]
			WT	Variant	WT	Variant	
A8S	80 ± 3	107 ± 13	-9.54 ± 0.13	-9.46 ± 0.28	9.55 ± 0.23	9.46 ± 0.22	-0.09 ± 0.32
A13V	106 ± 12	109 ± 17	-9.42 ± 0.32	-9.39 ± 0.36	9.53 ± 0.37	9.46 ± 0.27	-0.07 ± 0.46
G21S	77 ± 9	110 ± 7	-9.51 ± 0.13	-9.66 ± 0.18	9.61 ± 0.19	9.67 ± 0.15	0.06 ± 0.24
W22L	74 ± 13	92 ± 9	-9.38 ± 0.14	-9.35 ± 0.24	9.36 ± 0.16	9.45 ± 0.23	0.09 ± 0.28
G24E	97 ± 12	95 ± 5	-9.30 ± 0.09	-9.40 ± 0.13	9.31 ± 0.10	9.49 ± 0.13	0.18 ± 0.17
A25T	107 ± 6	108 ± 4	-9.20 ± 0.39	-9.30 ± 0.14	9.38 ± 0.16	9.28 ± 0.15	-0.10 ± 0.22
P36S	112 ± 6	108 ± 12	-9.43 ± 0.18	-9.54 ± 0.24	9.41 ± 0.21	9.54 ± 0.19	0.14 ± 0.28
A42P	10 ± 1***	0***	-9.10 ± 0.14	ND	9.10 ± 0.09	ND	ND
A52T	91 ± 7	106 ± 5	-9.39 ± 0.09	-9.36 ± 0.10	9.43 ± 0.10	9.36 ± 0.08	-0.07 ± 0.13
L60R	15 ± 1***	0***	-9.10 ± 0.14	ND	9.10 ± 0.09	ND	ND
A74T	100 ± 4	54 ± 11**	-9.37 ± 0.20	-9.41 ± 0.42	9.37 ± 0.23	9.36 ± 0.48	-0.01 ± 0.54
P95L	16 ± 1***	0***	-9.10 ± 0.14	ND	9.15 ± 0.10	ND	ND
G109A	71 ± 1***	60 ± 5***	-9.31 ± 0.12	-9.20 ± 0.17	9.29 ± 0.12	9.35 ± 0.21	0.06 ± 0.24
M120I	101 ± 11	107 ± 8	-9.38 ± 0.17	-9.42 ± 0.15	9.34 ± 0.15	9.43 ± 0.15	0.09 ± 0.21
M120V	66 ± 12	86 ± 7*	-9.48 ± 0.12	-9.51 ± 0.19	9.48 ± 0.14	9.39 ± 0.15	-0.09 ± 0.20
S123R	45 ± 3**	19 ± 2*	-9.53 ± 0.16	-9.58 ± 0.22	9.51 ± 0.11	8.98 ± 0.53	-0.54 ± 0.54
V124I	65 ± 2**	40 ± 4***	-9.45 ± 0.13	-9.50 ± 0.25	9.44 ± 0.10	9.04 ± 0.30	-0.40 ± 0.32
R138C	33 ± 2***	41 ± 7**	-9.43 ± 0.11	-9.17 ± 0.34	9.44 ± 0.11	8.90 ± 0.31	-0.54 ± 0.33
R138H	92 ± 5	0***	-9.30 ± 0.14	ND	9.32 ± 0.17	ND	ND
R138L	32 ± 2***	0***	-9.22 ± 0.12	ND	9.22 ± 0.08	ND	ND
Y141F	22 ± 2***	135 ± 21	-9.40 ± 0.32	-9.29 ± 0.34	9.30 ± 0.41	9.29 ± 0.29	-0.01 ± 0.50
M146V	97 ± 10	112 ± 6	-9.22 ± 0.19	-9.21 ± 0.09	9.22 ± 0.15	9.21 ± 0.12	-0.01 ± 0.19
R154H	74 ± 1***	83 ± 9	-9.18 ± 0.14	-9.21 ± 0.21	9.17 ± 0.14	9.22 ± 0.20	0.05 ± 0.24
L166I	96 ± 12	81 ± 7*	-9.37 ± 0.14	-9.28 ± 0.23	9.35 ± 0.14	9.44 ± 0.21	0.10 ± 0.25
T201M	67 ± 13	70 ± 5*	-9.53 ± 0.20	-9.24 ± 0.16	9.53 ± 0.15	9.07 ± 0.25	-0.46 ± 0.29
R222H	44 ± 14*	15 ± 2**	-9.39 ± 0.14	-9.18 ± 0.27	9.39 ± 0.10	8.46 ± 0.64	-0.93 ± 0.65
I223T	31 ± 5**	20 ± 4*	-9.46 ± 0.12	-9.52 ± 0.39	9.47 ± 0.09	9.17 ± 0.48	-0.29 ± 0.49
R231H	106 ± 8	55 ± 7***	-9.51 ± 0.14	-9.45 ± 0.25	9.51 ± 0.14	9.37 ± 0.27	-0.14 ± 0.31
A234T	89 ± 9	122 ± 13*	-9.47 ± 0.19	-9.44 ± 0.22	9.40 ± 0.23	9.45 ± 0.18	0.05 ± 0.30
E237K	94 ± 11	53 ± 7***	-9.50 ± 0.12	-9.46 ± 0.30	9.51 ± 0.14	9.14 ± 0.28	-0.37 ± 0.32
S238G	105 ± 10	52 ± 8***	-9.59 ± 0.18	-9.57 ± 0.32	9.59 ± 0.18	9.29 ± 0.37	-0.31 ± 0.41
K243R	105 ± 7	62 ± 7**	-9.39 ± 0.17	-9.21 ± 0.24	9.39 ± 0.15	9.22 ± 0.28	-0.17 ± 0.32
D246N	99 ± 6	0***	-9.36 ± 0.09	ND	9.35 ± 0.10	ND	ND
F250V	39 ± 4**	0***	-9.57 ± 0.23	ND	9.56 ± 0.18	ND	ND
Y308S	14 ± 2***	0***	-9.10 ± 0.14	ND	9.10 ± 0.10	ND	ND
R316H	56 ± 20	0***	-9.43 ± 0.24	ND	9.43 ± 0.24	ND	ND
R330W	94 ± 11	116 ± 18	-9.43 ± 0.25	-9.31 ± 0.35	9.32 ± 0.30	9.31 ± 0.27	-0.01 ± 0.40
A342V	81 ± 2**	70 ± 13**	-9.30 ± 0.09	-9.53 ± 0.39	9.31 ± 0.19	9.41 ± 0.33	0.10 ± 0.38
I353T	99 ± 5	116 ± 10	-9.22 ± 0.10	-9.36 ± 0.19	9.16 ± 0.15	9.36 ± 0.14	0.21 ± 0.20
A359E	87 ± 13	129 ± 15*	-9.37 ± 0.25	-9.51 ± 0.26	9.15 ± 0.26	9.52 ± 0.23	0.37 ± 0.35

Table S3. Summary of the functional profiling of β-arrestin2 recruitment to WT-MT₂ and MT₂ variants.

Data are means ± SEM of three or four independent experiments with repeats in triplicate. ND denotes that the experimental parameter could not be determined due to lack of a concentration- response curve. The data were analyzed by comparing independent fits with a global fit that shares the selected parameter (^{##}) and by one-sample *t* test ([#]) compared to the WT. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.0001.

Variant	Agonist mediated ^{###}	Potency (LogEC ₅₀) ^{###}		Log(τ/K _A)		Δlog(τ/K _A) [#]
	(E _{max})	WT	Variant	WT	Variant	
	(% WT)					
A8S	103 ± 20	-9.29 ± 0.20	-9.46 ± 0.45	9.31 ± 0.28	9.30 ± 0.27	-0.01 ± 0.39
A13V	112 ± 27	-9.52 ± 0.16	-9.48 ± 0.51	9.41 ± 0.40	9.51 ± 0.32	0.10 ± 0.52
G21S	106 ± 20	-9.41 ± 0.17	-9.39 ± 0.41	9.39 ± 0.28	9.41 ± 0.27	0.02 ± 0.39
W22L	108 ± 22	-9.45 ± 0.42	-9.04 ± 0.45	9.15 ± 0.40	9.25 ± 0.37	0.10 ± 0.55
G24E	114 ± 10	-9.03 ± 0.21	-9.09 ± 0.19	8.96 ± 0.19	9.06 ± 0.17	0.10 ± 0.25
A25T	94 ± 17	-9.09 ± 0.17	-9.05 ± 0.43	9.06 ± 0.24	9.01 ± 0.27	-0.04 ± 0.36
P36S	104 ± 16	-9.44 ± 0.32	-9.77 ± 0.33	9.46 ± 0.28	9.70 ± 0.28	0.24 ± 0.39
A42P	0***	-9.53 ± 0.16	ND	9.50 ± 0.23	ND	ND
A52T	90 ± 10	-9.34 ± 0.13	-9.38 ± 0.29	9.34 ± 0.16	9.35 ± 0.20	0.01 ± 0.25
L60R	0***	-9.77 ± 0.15	ND	9.79 ± 0.34	ND	ND
A74T	97 ± 8	-9.59 ± 0.15	-9.64 ± 0.21	9.62 ± 0.14	9.55 ± 0.20	-0.07 ± 0.25
P95L	0***	-9.57 ± 0.27	ND	9.31 ± 0.35	ND	ND
G109A	70 ± 10*	-9.41 ± 0.15	-9.43 ± 0.31	9.40 ± 0.16	9.42 ± 0.29	0.02 ± 0.33
M120I	98 ± 11	-9.11 ± 0.15	-9.00 ± 0.15	9.15 ± 0.16	8.96 ± 0.15	-0.20 ± 0.27
M120V	74 ± 9*	-9.41 ± 0.18	-9.30 ± 0.26	9.40 ± 0.16	9.12 ± 0.25	-0.28 ± 0.30
S123R	0***	-9.24 ± 0.12	ND	9.16 ± 0.17	ND	ND
V124I	90 ± 9	-9.31 ± 0.24	-8.91 ± 0.16	9.36 ± 0.20	8.79 ± 0.21	-0.57 ± 0.29
R138C	0***	-9.16 ± 0.25	ND	9.12 ± 0.25	ND	ND
R138H	0***	-9.39 ± 0.26	ND	9.27 ± 0.31	ND	ND
R138L	0***	-9.39 ± 0.26	ND	9.19 ± 0.28	ND	ND
Y141F	94 ± 11	-9.26 ± 0.18	-9.45 ± 0.26	9.26 ± 0.19	9.35 ± 0.19	0.08 ± 0.27
M146V	111 ± 14	-9.60 ± 0.19	-9.52 ± 0.26	9.60 ± 0.20	9.48 ± 0.21	-0.11 ± 0.29
R154H	87 ± 11	-9.69 ± 0.27	-9.73 ± 0.26	9.73 ± 0.23	9.46 ± 0.23	-0.27 ± 0.33
L166I	108 ± 18	-9.16 ± 0.29	-9.12 ± 0.35	9.02 ± 0.29	9.12 ± 0.29	0.10 ± 0.41
T201M	93 ± 8	-9.26 ± 0.33	-9.36 ± 0.17	9.29 ± 0.22	9.27 ± 0.22	-0.02 ± 0.32
R222H	64 ± 8*	-9.68 ± 0.21	-9.18 ± 0.23	9.69 ± 0.19	9.07 ± 0.27	-0.62 ± 0.33
I223T	86 ± 17	-9.47 ± 0.22	-8.46 ± 0.40*	9.38 ± 0.23	8.42 ± 0.26	-0.96 ± 0.35*
R231H	103 ± 10	-9.42 ± 0.35	-9.35 ± 0.21	9.40 ± 0.23	9.35 ± 0.24	-0.05 ± 0.34
A234T	92 ± 15	-9.12 ± 0.55	-9.18 ± 0.39	9.13 ± 0.42	9.10 ± 0.41	-0.03 ± 0.59
E237K	141 ± 29	-9.62 ± 0.26	-9.42 ± 0.42	9.17 ± 0.30	9.35 ± 0.31	0.18 ± 0.43
S238G	122 ± 15	-9.32 ± 0.10	-9.29 ± 0.26	9.23 ± 0.19	9.27 ± 0.17	0.04 ± 0.26
K243R	103 ± 7	-9.27 ± 0.11	-9.42 ± 0.14	9.21 ± 0.11	9.46 ± 0.12	0.25 ± 0.16
D246N	103 ± 13	-9.72 ± 0.17	-9.53 ± 0.28	9.64 ± 0.20	9.57 ± 0.22	-0.07 ± 0.30
F250V	0***	-9.57 ± 0.21	ND	9.56 ± 0.35	ND	ND
Y308S	0***	-10.31 ± 0.25	ND	10.10 ± 0.38	ND	ND
R316H	46 ± 16*	-9.92 ± 0.22	-8.89 ± 0.57*	10.07 ± 0.31	7.95 ± 0.70	-2.12 ± 0.76*
R330W	108 ± 12	-9.63 ± 0.27	-9.03 ± 0.27	9.61 ± 0.25	8.96 ± 0.26	-0.65 ± 0.25*
A342V	105 ± 17	-9.43 ± 0.29	-9.11 ± 0.32	9.14 ± 0.29	9.12 ± 0.29	-0.02 ± 0.41
I353T	89 ± 14	-9.45 ± 0.16	-9.42 ± 0.35	9.43 ± 0.23	9.40 ± 0.24	-0.03 ± 0.33
A359E	91 ± 14	-9.42 ± 0.27	-9.54 ± 0.34	9.28 ± 0.27	9.58 ± 0.28	0.30 ± 0.39

Table S4. Summary of the functional profiling of cAMP inhibition by WT-MT₂ and MT₂ variants.

Data are means ± SEM of three to five independent experiments with repeats in triplicate. ND denotes that the experimental parameter could not be determined due to lack of a concentration- response curve. The data were analyzed by comparing independent fits with a global fit that shares the selected parameter (^{###}) and by one-sample *t* test ([#]) compared to the WT. **P* < 0.05, ****P* < 0.0001.

Variant	Agonist mediated ^{###}	Potency (LogEC ₅₀) ^{###}		Log(τ/K _A)		Δlog(τ/K _A) [#]
	(E _{max}) (% WT)	WT	Variant	WT	Variant	
A8S	118 ± 18	-8.74 ± 0.23	-8.78 ± 0.31	8.83 ± 0.39	8.78 ± 0.24	-0.05 ± 0.46
A13V	117 ± 18	-8.64 ± 0.26	-8.57 ± 0.38	8.66 ± 0.34	8.58 ± 0.31	-0.09 ± 0.46
G21S	164 ± 27	-8.14 ± 0.21	-8.02 ± 0.37	7.73 ± 0.38	8.02 ± 0.26	0.29 ± 0.46
W22L	149 ± 23	-8.20 ± 0.19	-7.99 ± 0.34	8.00 ± 0.30	7.95 ± 0.24	-0.05 ± 0.38
G24E	124 ± 22	-8.27 ± 0.19	-8.30 ± 0.35	8.18 ± 0.35	8.32 ± 0.25	0.13 ± 0.43
A25T	98 ± 17	-8.60 ± 0.22	-8.52 ± 0.41	8.52 ± 0.30	8.60 ± 0.30	0.13 ± 0.43
P36S	98 ± 13	-8.42 ± 0.22	-8.42 ± 0.28	8.41 ± 0.23	8.42 ± 0.23	0.01 ± 0.32
A42P	0***	-8.37 ± 0.30	ND	8.38 ± 0.26	ND	ND
A52T	110 ± 19	-8.76 ± 0.22	-8.59 ± 0.36	8.59 ± 0.27	8.60 ± 0.27	0.02 ± 0.38
L60R	0***	-8.76 ± 0.22	ND	8.75 ± 0.18	ND	ND
A74T	79 ± 8**	-8.75 ± 0.12	-8.63 ± 0.20	8.75 ± 0.13	8.50 ± 0.19	-0.25 ± 0.23
P95L	0***	-8.75 ± 0.12	ND	8.79 ± 0.13	ND	ND
G109A	81 ± 10	-8.75 ± 0.13	-8.87 ± 0.26	8.74 ± 0.14	8.79 ± 0.20	0.05 ± 0.25
M120I	80 ± 10*	-8.75 ± 0.12	-8.77 ± 0.23	8.76 ± 0.15	8.72 ± 0.21	-0.04 ± 0.26
M120V	110 ± 12	-8.85 ± 0.15	-8.72 ± 0.23	8.74 ± 0.23	8.78 ± 0.18	0.03 ± 0.29
S123R	0***	-8.69 ± 0.22	ND	8.65 ± 0.18	ND	ND
V124I	48 ± 4***	-8.46 ± 0.16	-8.34 ± 0.19	8.45 ± 0.12	7.98 ± 0.29	-0.48 ± 0.32
R138C	0***	-8.46 ± 0.16	ND	8.46 ± 0.26	ND	ND
R138H	0***	-8.24 ± 0.10	ND	8.28 ± 0.12	ND	ND
R138L	0***	-8.24 ± 0.10	ND	8.24 ± 0.13	ND	ND
Y141F	83 ± 13	-8.45 ± 0.11	-8.53 ± 0.34	8.46 ± 0.22	8.59 ± 0.28	0.13 ± 0.36
M146V	55 ± 3***	-8.24 ± 0.09	-8.46 ± 0.14	8.24 ± 0.08	8.29 ± 0.18	0.05 ± 0.19
R154H	72 ± 9*	-8.69 ± 0.16	-8.67 ± 0.29	8.65 ± 0.17	8.66 ± 0.28	0.00 ± 0.33
L166I	106 ± 13	-8.37 ± 0.19	-8.30 ± 0.26	8.28 ± 0.22	8.31 ± 0.20	0.03 ± 0.29
T201M	50 ± 9*	-8.67 ± 0.23	-8.19 ± 0.42*	8.67 ± 0.19	7.79 ± 0.45	-0.87 ± 0.49
R222H	0***	-8.67 ± 0.23	ND	8.68 ± 0.20	ND	ND
I223T	0***	-8.93 ± 0.22	ND	8.93 ± 0.20	ND	ND
R231H	95 ± 19	-8.80 ± 0.19	-8.66 ± 0.39	8.72 ± 0.36	8.77 ± 0.25	0.05 ± 0.44
A234T	80 ± 8	-8.83 ± 0.26	-8.80 ± 0.20	8.87 ± 0.22	8.74 ± 0.23	-0.13 ± 0.32
E237K	103 ± 13	-8.67 ± 0.44	-8.51 ± 0.29	8.69 ± 0.36	8.51 ± 0.39	-0.18 ± 0.53
S238G	98 ± 19	-8.75 ± 0.21	-8.60 ± 0.44	8.73 ± 0.27	8.62 ± 0.29	-0.11 ± 0.40
K243R	100 ± 16	-8.75 ± 0.21	-8.78 ± 0.35	8.88 ± 0.28	8.90 ± 0.20	0.01 ± 0.35
D246N	107 ± 16	-8.85 ± 0.13	-8.87 ± 0.30	8.88 ± 0.28	8.90 ± 0.20	0.01 ± 0.35
F250V	0***	-8.86 ± 0.12	ND	8.87 ± 0.22	ND	ND
Y308S	0***	-8.90 ± 0.10	ND	8.90 ± 0.23	ND	ND
R316H	54 ± 9*	-8.95 ± 0.12	-8.42 ± 0.38	8.95 ± 0.12	8.44 ± 0.53	-0.51 ± 0.54
R330W	97 ± 18	-8.94 ± 0.10	-9.03 ± 0.32	8.95 ± 0.16	9.05 ± 0.27	0.09 ± 0.32
A342V	91 ± 14	-8.77 ± 0.15	-8.42 ± 0.33	8.72 ± 0.18	8.43 ± 0.22	-0.29 ± 0.29
I353T	103 ± 29	-8.94 ± 0.16	-9.06 ± 0.43	8.97 ± 0.39	9.06 ± 0.27	0.09 ± 0.47
A359E	246 ± 21**	-8.86 ± 0.20	-8.84 ± 0.17	8.60 ± 0.41	8.85 ± 0.12	0.24 ± 0.42

Table S5. Summary of the functional profiling of ERK activation by WT-MT₂ and MT₂ variants.

Data are means ± SEM of three or four independent experiments with repeats in triplicate. ND denotes that the experimental parameter could not be determined due to lack of a concentration-response curve. The data were analyzed by comparing independent fits with a global fit that shares the selected parameter (^{###}) and by one-sample *t* test ([#]) compared to the WT. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.0001.

Résumé du chapitre 3 – Article 2

Dans ce manuscrit, dans lequel j'ai participé à la caractérisation de mutants en réalisant des ELISA et en mesurant l'activation de ERK et l'inhibition de la production d'AMPc, nous avons :

- Identifié que MT₂ pouvait activer les protéines Gai1, Gai2, Gai3, GaoA, GaoB, Gaz et était capable de recruter la β arrestine-2
- Caractérisé les 40 variants naturels de MT₂ précédemment identifiés par notre groupe. Nous avons ainsi mesuré leur capacité à activer spontanément ou suite à leur liaison à la MLT, les protéines Gai1, Gaz, à recruter la β arrestine-2, à phosphoryler ERK et à inhiber la production d'AMPc.
- Généré des profils de signalisation pour chaque variant et les avons classés en 9 groupes selon leurs similitudes.
- Relié les défauts d'activation des protéines Gai1, Gaz induites par la MLT et de recrutement constitutif de la β arrestine-2 à un risque accru de développer le DT2.
- Montré que les analyses informatiques de prédiction de l'impact de mutations (EA score) sont des outils robustes et pouvant être très utiles.

Après avoir caractérisé le récepteur MT₂ et identifié les mécanismes par lesquels il était impliqué dans le développement du DT2, nous nous sommes intéressés au récepteur MT₁ et ses mécanismes d'action.

Chapitre 4

Article 3

Identification of key regions mediating human melatonin type 1 receptor functional selectivity revealed by natural variants

Alan Hégron, Bianca Plouffe, Eunna Huh, Xavier Deupi, Wenwen Gao,
Amélie Bonnefond, Christian Le Gouill, Philippe Froguel, Olivier Lichtarge,
Ralf Jockers, Michel Bouvier

En rédaction

Identification of key regions mediating human melatonin type 1 receptor functional selectivity revealed by natural variants

Alan Hégron^{1,2,3,4,5,6}, Bianca Plouffe^{5,6}, Eunna Huh⁷, Xavier Deupi⁸, Wenwen Gao^{1,2,3}, Amélie Bonnefond⁹, Christian Le Gouill⁵, Philippe Froguel⁹, Olivier Lichtarge⁷, Ralf Jockers^{1,2,3*}, Michel Bouvier^{5,6*}

1 Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

2 CNRS UMR 8104, Paris, France

3 University of Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

4 University of Paris Saclay, Paris, France

5 Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

6 Department of biochemistry and Molecular Medicine, University of Montreal, QC, Canada

7 Computational and Integrative Biomedical Research Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, United States of America

8 Laboratory of Biomolecular Research, Paul Scherrer Institute (PSI), 5232 Villigen PSI, Switzerland

9 CNRS UMR8199, Lille, France

***Corresponding authors:** Michel Bouvier, University of Montreal, Canada, and Ralf Jockers, University of Paris Descartes, France.

Statement of author contributions:

AH conceived and designed experiments. AH and WG made constructions of variant plasmids. AH characterized receptors with the exception of binding done by WG. EH and OL did the computational analysis. XD did the 3D modeling and contributed to the discussion. AB and PF sequenced MT₁ genes and found genetic variations. AH, BP and MB analyzed data. AH, RJ and MB wrote the manuscript.

Abstract

Melatonin (5-methoxy-*N*-acetyltryptamine) is a hormone mainly produced by the pineal gland in a circadian rhythm with low levels during the day and high levels at night. MT₁ is one of the 2 receptors mediating the action of melatonin and belongs to the G protein-coupled receptors (GPCRs) family. Despite an increasing number of activated GPCR crystal structures available, the molecular mechanism of action of a large number of receptors, including MT₁, remain poorly understood. We took advantage of the existence of numerous rare variants found in the population to probe the role of specific residues and receptor domains in the activation of the different pathways engaged by the receptor. To do this, 32 variants were identified and their signaling profiles were characterized using BRET-based sensors probing 12 different signaling pathways in living cells. We then combined our experimental results with computational tools to group variants in 5 different clusters depending on the signaling profiles obtained. We used a three-dimensional structural model of MT₁ to visualize the position of each variant in the receptor and to identify regions important for β arrestin-2 recruitment as well as G α 12 and G α 15 activation. This study reinforces the idea that natural variants are powerful tools in order to understand the mechanism of action of a receptor and that distinct receptor domains differentially controls the activation of the various effectors engaged by the receptor.

Introduction

High-throughput sequencing is rapidly improving our understanding of disease causes and susceptibilities in humans (359-361) as well as adaptation and evolution of organisms (362-364). Studies revealed that each human contains 10000 to 11000 nonsynonymous genetic variations (365) but only few of them are expected to cause diseases, the rest being considered neutral. Variant information in databases is often limited to basic annotations like neutral or deleterious. Deleteriousness can be approximated with measures of conservation and molecular functionality, but available data on both information are rarely combined. In the same way, even a strong association between a mutation and a phenotype provides no information on the protein function and/or structure changes.

Studies regularly discover new genetic variations with a great variety of effects since just a single nucleotide polymorphism (SNP) can change the folding or interactions between protein (366, 367). Many proteins have several functions interacting with different other proteins, but most protein-interacting maps ignore the structural details of each protein and the mechanisms of their interactions. It's the case for several G protein-coupled receptors (GPCRs) which have a broad set of functions and are involved in the development of a multitude of diseases. But the molecular determinants controlling their different actions are not well understood. SNPs represent a rich pool of variants with potential functional consequences that could be used to probe such molecular determinants.

One concept well recognized is the capacity of GPCRs to preferentially activate some signaling pathways, depending on the ligand (368-370) and potentially leading to distinct physiological actions. This concept is called functional selectivity or biased signaling. Mutations at specific position in the receptor structure can have the same effect and modify the signaling profile of a receptor (371, 372).

Here, we identified 32 melatonin type 1 receptor (MT₁) variants in 9393 people which revealed 32 non-synonymous genetic variations on MT₁ coding regions providing a source of genetic variants to study the structure function relationship of the receptor.

The MT₁ receptor is one of the two melatonin receptors involved in the physiological action of this neurohormone. Melatonin (MLT) is mainly released by the pineal gland in circadian and seasonal manners (373). Melatonin was also reported in other tissues such as the retina (374), the Harderian gland (375), the striatum (376), the gastrointestinal tracts (377), testis (378), lymphocytes (133) or the pancreas (104, 106). This hormone binds to two GPCRs,

MT₁ and MT₂, which activate many signaling pathways regulating different physiological functions including sleep-wake cycle, circadian entrainment, seasonal reproduction and glycemic homeostasis (379-384).

Here, we used the MT₁ SNPs to investigate their potential impact on the signaling profile of the MT₁ receptor in order to gain insight on the molecular determinants of its functional selectivity.

Materials and methods

Cell culture and transfection

HEK293 cells were grown in complete medium (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 4.5g/L glucose, 100 U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin and 1mM glutamine) (Invitrogen, CA). Transient transfections were performed using JetPEI (Polyplus Transfection, France), according to manufacturer's instructions.

Analysis of cell surface receptor expression

ELISAs were performed as previously described (385) using the mouse anti-flag antibody and a horseradish peroxidase-conjugated mouse immunoglobulin G (IgG) whole-sheep secondary antibody (Sigma).

BRET measurement

Gai1/i2/i3/oA/oB activations was assessed by measuring BRET between RlucII-Gai1/i2/i3/oA/oB and GFP10-G γ 2 upon treatment of HEK 293 cells cotransfected to express Gai1/i2/i3/oA/oB, receptor, and BRET sensors with MLT (386). For RlucII-G α s, RlucII-G α z, RlucII-G α q, and RlucII-G α 12/13, we used RlucII-tagged sensors, GFP10-G γ 1 was used given that optimal responsive window is generally obtained using these BRET sensor pairs for these G α proteins. For this G α protein screening we used these BRET pairs in the presence of G β 1 protein. G α 15 activation by receptors was assessed using a unimolecular biosensor. Since MT₁ stimulation by melatonin does not activate PKC in our HEK293T cells in the absence of G α 15 but does so in its presence, we used the PKC activation as a surrogate assay to measure G α 15 activation by MT₁. PKC activation was assessed by measuring BRET with this unimolecular biosensor. The BRET2-based PKC sensor consists of a GFP10, 2 phospho-sensing domains (FHA1 & FHA2), a long and flexible linker, 2 specific phospho-substrate sequences, a RLucII and the diacyl glycerol (DAG)-binding "C1b" domain of PKC δ added to increase signal specificity. Once phosphorylated, the phospho-substrates interact with their respective phospho-sensing domain, which stabilizes a conformation characterized by a higher BRET signal (387). β arrestin-2 recruitment was assessed by measuring BRET between RlucII- β arrestin-2 rGFP-CAAX (prenylation CAAX box of KRas) demonstrating the recruitment of the β arrestin-2 to the plasma membrane. Transfected cells were plated in poly-d-lysine-pretreated 96-well white microplates (100 μ l per well; Greiner). Forty-eight hours after transfection, cells were washed with Dulbecco's phosphate-

buffered saline, and then Tyrode's buffer was added. After the addition of MLT, the cells were incubated for 10 min at 37°C, and coelenterazine 400a (2.5 μM; NanoLight Technology) was added 5 min before BRET reading in a Synergy Neo Microplate reader (BioTek) (acceptor filter: 515 ± 30 nm; donor filter: 410 ± 80 nm). Net BRET represents the BRET signal subtracted by the BRET monitored in the absence of a GFP10-tagged sensor. αBRET refers to the difference in net BRET recorded from cells treated with agonist and cells treated with vehicle. For the agonist dose-response curves, the percentage of the response of the WT receptor was calculated from the αBRET value obtained from a given variant divided by the αBRET obtained from the WT receptor in the same experiment.

Evolutionary action analysis

The predicted effect of each variant within the MT₁ receptor was calculated, as previously described, (388) using the amino acid sequence deduced from the *MTNRIA* gene for the query.

Statistical analysis

LogEC₅₀ and agonist-induced E_{max} values were determined by nonlinear regression with a variable Hill slope using GraphPad Prism software (version 6.0). For each assay, the agonist-induced E_{max} value for every MT₁ variant was normalized as a percentage of the maximal MLT-stimulated response of the WT receptor (set at 100) monitored in parallel with the receptor variant. The dose-response curves were fitted to an operational model of agonism designed by Kenakin and Christopoulos (389, 390) to obtain log(τ/KA) values for the WT receptor and its variants. Normally, an agonist is set as a reference agonist, against which within-pathway comparisons for the same receptor to other agonists can be made and expressed as Δlog(τ/KA). Here, within- pathway comparisons were made between MT₁ variants and the WT receptor. Normalized difference was calculated on values corresponding to agonist-induced E_{max}, and Δlog(τ/KA) to fit a -1 to +1 scale using the following formula: (variant – WT) / (variant + WT). In the case of Δlog(τ/KA), before normalization, the anti-logs were first calculated and then were fitted to the aforementioned formula. Positive and negative values represent variations with better or worst responses, respectively, than those of the WT receptor. Subsequently, logEC₅₀, agonist-induced E_{max}, and Δlog(τ/KA) values were expressed as means ± SEM of the indicated number of experiments (n). Statistical analysis for logEC₅₀ and agonist-induced E_{max} was performed by comparing independent fits with a global fit that shared the selected parameter.

Computational analysis

To quantify similarities between signaling perturbations resulting from each variation, we adapted and implemented the Non-Negative Matrix Factorization (NMF) and K-means clustering process originally described in (391). We performed this analysis on an input matrix of 32 variations and 24 signaling parameters spanning 8 signaling pathways (G α 1 / G α 2 / G α 3 / G α oA / G α oB / G α 12 / G α 15 / β arrestin-2) in response to melatonin. The mean and STD for each phenotypic measure were used to propagate experimental error through the clustering process. Explicitly, 500 input matrices were generated by independently sampling from the experimental error (Mean + STD) for each phenotypic data point. Each of these sampled input matrices were then processed separately using the NMF/K-means method. The values for each phenotype were scaled to avoid bias introduced by differences in phenotype scale using:

$$\text{Standardized Value} = (X_{ij} - \text{minimum}_j) / (\text{maximum}_j - \text{minimum}_j)$$

for every variation i and every parameter j , where maximum_j and minimum_j values were specific to each parameter column (e.g. EC50, E max, τ/K_a). In this way, every parameter was normalized between 0-1. The dimensionality of these 500 input matrices were then independently reduced using NMF to identify the key signaling patterns. K-means clustering was used, as described, to cluster the [mutation x Feature] (32 x K) basis vector. As previously described, clustering results for each sampled matrix were averaged across K=2 to K=10, where K is the number of features for NMF and the number of clusters for K-means ($K_{\text{NMF}}=K_{\text{K-means}}$). Final cluster assignment, quantifying variation similarity, was the average over all 500 sampled matrices. Clustering frequency was converted into distance matrix using Pearson's correlation and visualized as a heatmap and dendrogram.

Radioligand Binding Experiments

Radioligand saturation binding experiments were performed in transient transfected HEK293T cell lines. Saturation binding assays were carried out on crude membrane preparations with increasing concentrations of 2-[125I]MLT(PerkinElmer Life Sciences) to determine dissociation constants (K_d) and total melatonin receptor expression (B_{max}) of WT and variant MT₁ receptors using PRISM software (GraphPad). Non-specific binding was determined using 10 μ M melatonin(Sigma).

Three-dimensional modeling

Three-dimensional models of the melatonin receptor type 1 (MT₁) in inactive and active conformations were built by homology modeling using as respective templates the crystal structure of the human OX2 orexin receptor (OX2R) (PDBid: 4S0V) (392) and the crystal structure of the human mu-opioid receptor in complex with a G α i protein (PDBid: 6DDE) (393). In addition, the second intracellular loop (residues 132-146) in the structure of the human dopamine D3 receptor (PDBid: 3PBL) (394) was used as a structural template to model this region in the inactive MT₁. Also, helix 8 (residues 291-308) in the structure of the human adenosine A(2A) receptor (PDBid: 2YDO) (395) was used as a structural template to model this region in the active MT₁. Structure-based alignments between the MT₁ template and the targets were obtained from the GPCRdb (396). These initial alignments were manually refined using Chimera (397) to adjust some of the gaps in the loop regions. Using these alignments and the structural templates, 3D models of MT₁ in inactive and active conformations were built using Modeller v9.14 (398). The putative cysteine bridge between Cys100^{3.25} in TM3 and Cys177^{ECL2.50} in the second extracellular loop was explicitly defined during model building. All models were subjected to 300 iterations of variable target function method optimization and thorough molecular dynamics and simulated annealing optimization, and scored using the discrete optimized protein energy potential. The 20 best-scoring models were analyzed visually, and a suitable model (in term of low score and structure of the loops) was selected for analysis.

Results

WT- MT₁ signaling profile

To establish an exhaustive profiling of the signaling repertoire of the MT₁ receptor, we used bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensors to assess G protein activation measuring G α protein dissociation from G $\beta\gamma$ complex (399) and β arrestin-2 recruitment to the activated receptor measuring its proximity with the plasma membrane (400). Melatonin stimulation in cells expressing the wild-type (WT) human MT₁ lead to the activation of G α _{i1}, G α _{i2}, G α _{i3}, G α _{oA}, G α _{oB}, G α ₁₂ and G α ₁₅ (Figure 1). This is consistent with previous finding suggesting a G α _i coupling for this receptor. Previous studies, largely based on the detection of MT₁ promoted calcium mobilization or phospholipase C activity, also suggested a coupling to G α _q (146, 401). Nevertheless, except for G α ₁₅, no direct activation of G α _q family member could be detected in the present study. G α ₁₅ which is an atypical G α _q family member as it has been shown to display promiscuous coupling to a large diversity of receptor (402, 403). Because no BRET sensor directly assessing its activation is available, activation was assessed by probing the downstream activation of PKC monitored by BRET (387) upon G α ₁₅ overexpression.

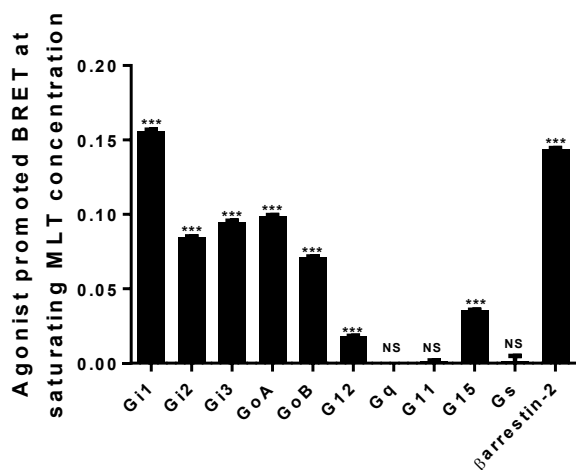


Figure 1. WT-MT₁ activates G α _{i/o}, G α ₁₂, G α ₁₅ and recruits β arrestin-2.

MT₁ response for G α _{i1}, G α _{i2}, G α _{i3}, G α _{oA}, G α _{oB}, G α ₁₂, G α _q, G α ₁₁, G α ₁₅ and G α _s activation and β arrestin-2 recruitment at saturated MLT concentration (100nM). Statistical analysis was performed using One-way Anova followed by a Dunnett's post-hoc test. NS: Non significant, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 relative to control

Variant cell surface expression

In order to assess the putative effects of MT₁ variations, we used ELISA to assess the cell surface expression of the WT and every MT₁ variant in parallel of functional characterization experiments. In Figure 2 we show no significant differences in cell surface expression detected among the variants.

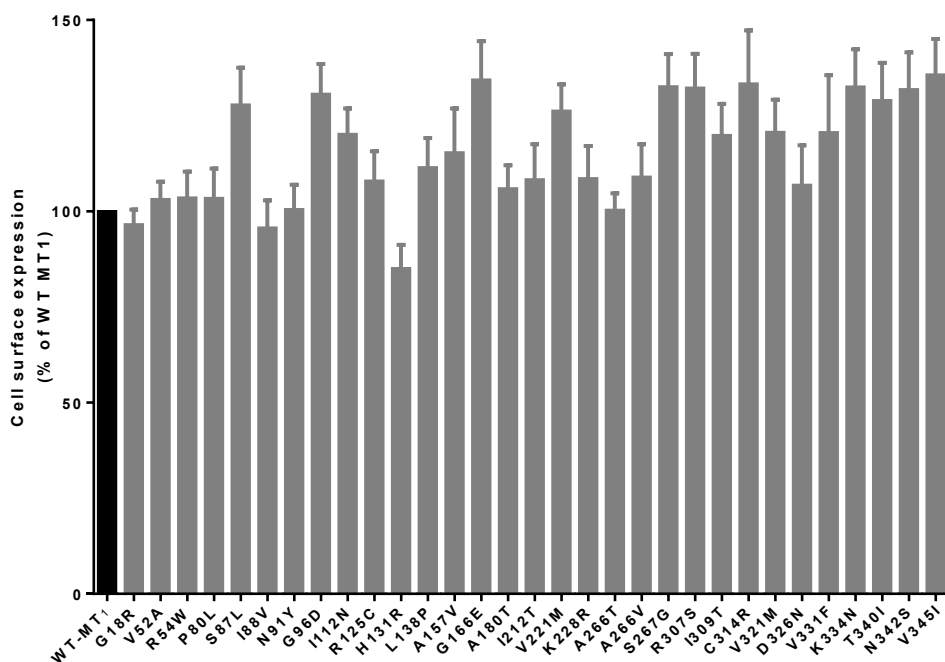


Figure 2. MT₁ receptors cell surface expression.

Cell surface expression of MT₁ variants measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in HEK293 cells in parallel of BRET experiments. Data represents means \pm SEM of at least three experiments.

Signaling profiles of MT₁ variants

Concentration-response curves of the MLT-stimulated activation of G α i1, G α i2, G α i3, G α oA, G α oB, G α 12, G α 15 and β arrestin-2 were generated for the 32 MT₁ variants (Suppl. Figure 1 and Suppl. Table 1). Representative examples of the signaling profiles for the WT and 3 variants are presented in Figure 3 and clearly indicate the differential impact of variants on the signaling activity toward the different pathways.

To provide a visual representation of the relative activity of each of the variants for the different signaling pathways, we use a radial graph representation describing the maximal response (E_{max}) and the potency (EC₅₀) for each pathway (Suppl. Figure 2). Using a matrix factorisation clustering method, the different signaling profiles could be grouped in 5 distinct

clusters. Figure 4 presents the superposition of the individual signaling profiles of each member of a given cluster providing a global view of the cluster signaling characteristics. Cluster 1 comprises 19 variants (G18R^{Nterm}, N91Y^{2.68}, G96D^{3.21}, A157V^{4.55}, A180T^{ECL2}, I212T^{5.63}, V221M^{5.72}, K228R^{6.25}, A266T^{ECL3}, A266V^{ECL3}, S267G^{ECL3}, R307S^{8.55}, D326N^{Cterm}, V321M^{Cterm}, V331F^{Cterm}, K334N^{Cterm}, T340I^{Cterm}, N342S^{Cterm} and V345I^{Cterm}) without any impairment and a signaling profile similar to that of the WT receptor in response to MLT stimulation. Cluster 2 comprises 2 variants (I88V^{2.65} and G166E^{4.64}) without any impairment on Gai1, Gai2, Gai3, GaoA, GaoB activation, but with a slight decrease of β arrestin-2 recruitment as well as a reduction in the activation of either Ga12 or Ga15. Cluster 3, for its part, comprises 6 variants (V52A^{1.57}, R54W^{1.59}, S87L^{2.64}, H131R^{3.56}, I309T^{8.57} and C314R^{Cterm}) with slight and variable impairments for Gai1, Gai2, Gai3, GaoA, GaoB, but with a total loss of β arrestin-2 recruitment and a reduction or loss of Ga12 and/or Ga15 activation. Cluster 4 comprises 3 variants (I112N^{3.37}, L138P^{ICL2}, I257F^{6.54}) with a global loss of potency for all the pathways but in most cases with little impact on their efficacy. Cluster 5 comprises two mutants (P80L^{2.57} and R125C^{3.50}) with a total loss of function in response to MLT stimulation.

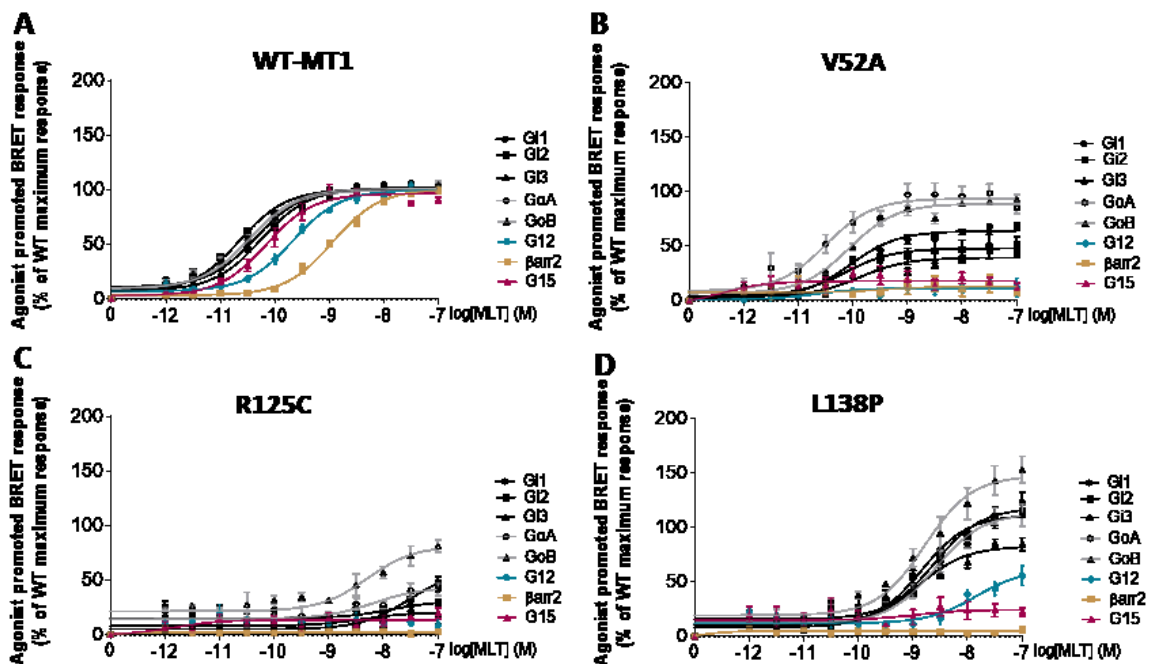


Figure 3. Melatonin concentration-response curves for G protein activations and β arrestin-2 recruitment of the WT and representative receptor variants with distinct signaling profiles.

MLT concentration curves for (A) WT-MT₁, (B) V52A, (C) R125C and (D) L138P receptors.

Data were plotted using non-linear regression curves with a fixed Hill slope. Data points represent means \pm SEM of at least three experiments. Barr2: β arrestin-2, WT: wild-type. See also Suppl. Figure 1.

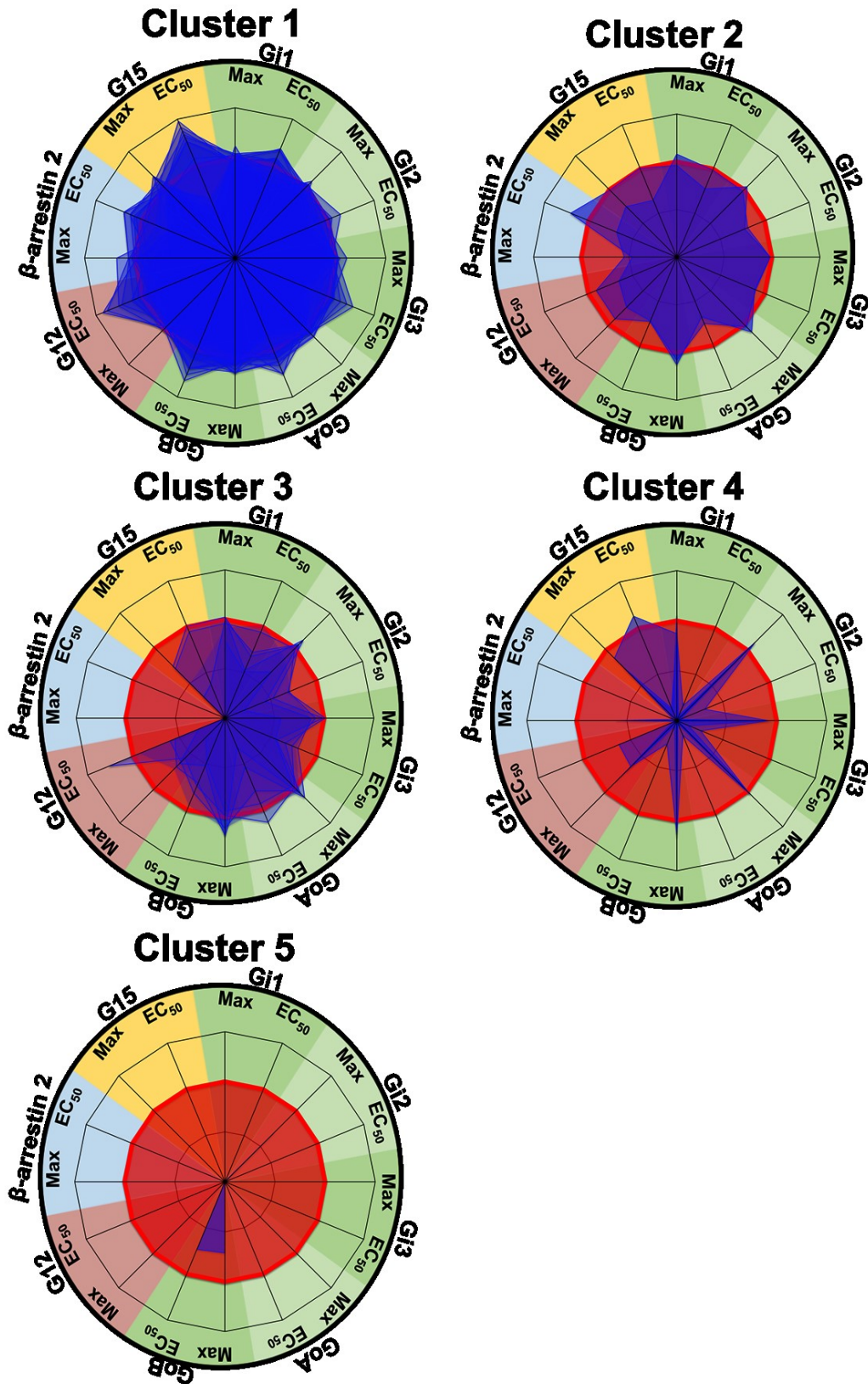


Figure 4. Radial graph representation of the different variant profiles compiled in 5 clusters.

Compilation of the different MT₁ variant radial graph profiles in five clusters. On each radial maximal agonist-induced efficacy (Max) and potency (EC₅₀) obtained by BRET are indicated. The cluster 1 corresponds to the 19 variants with a similar profile to the WT-MT₁ receptor. The cluster 2 groups 2 variants with a slight decrease of β arrestin-2 recruitment and G α 12 or G α 15 activation. The cluster 3 groups 6 variants with a total loss of β arrestin-2 recruitment and generally an impairment of G α 12 and/or G α 15 activation. The cluster 4 groups 3 variants with a defect for every efficacy (Max) but with similar potencies (EC₅₀) to the WT-MT₁. The cluster 5 groups 2 variants with a total loss of function. See also Suppl. Figure 2.

Mutant binding to MLT

To exclude the possibility that differences in the signaling activities observed could result from reduced binding affinity to MLT, we measured it for each variant belonging to one of the cluster with altered signaling. Binding affinities as measured by radioligand binding using 2-(¹²⁵I)-iodomelatonin (¹²⁵I-MLT) as the tracer was not statistically different among the variants except for P80L^{2,57} which showed a complete loss of binding capacity (Figure 5).

Receptors	Kd (pM)±SEM
Wild Type	101±9.3
V52A	99 ± 6,9
R54W	178 ± 25
P80L	No binding
S87L	136 ± 19
I88V	79 ± 4,5
G96D	81 ± 8,7
I112N	244 ± 75
R125C	227 ± 61
H131R	62 ± 11
L138P	171 ± 61
G166E	63 ± 1,2
I212T	101 ± 5,0
I257F	168
A266V	224 ± 43
S267G	186 ± 54
R307S	40 ± 2,5
I309T	75 ± 5,6
C314R	48 ± 7,8
K334N	395 ± 68
N342S	140 ± 43
V345I	69 ± 1,8

Figure 5. MT₁ variant receptors bind to melatonin as well as the WT-MT₁, except P80L.

Melatonin dissociation constant measured by 2-(¹²⁵I)Iodomelatonin binding experiment on MT₁ variants with at least one signaling defect. Data represent means ± SEM of at least three experiments.

Evolutionary action analysis of MT₁ variants

To assess whether the extent of the functional impacts of the naturally occurring variants could be estimated by the evolutionarily predicted impact of the individual substitution we assessed the Evolutionary Action (EA) of the 32 variants. EA is a bioinformatic algorithm predicting the impact of mutational variants (388). The EA score varies from 0 for variations with the most benign predicted impact to 100 for those with the most predicted adverse effects. Figure 6 illustrates a statistically significant correlation ($R^2=0.6553$, $P\leq 0,0001$) between the EA scores and the signaling phenotypic impact for each of the variants indicating that the severity of the functional outcome of SNPs can be reasonably well predicted using trace evolution-based methods such as EA.

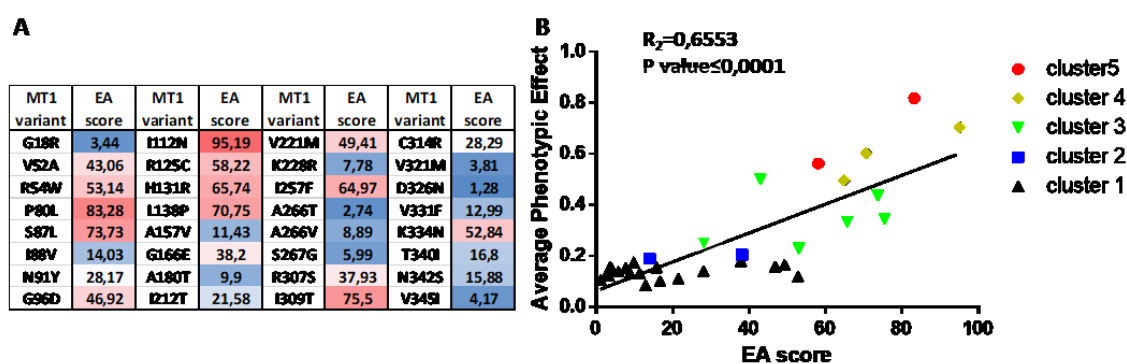


Figure 6. Evolutionary Action of MT₁ variants and correlation with signaling impairment.

(A) An Evolutionary Action (EA) score was calculated for each variant. EA ranges from 0 to 100 with a score of 0 predicted to be benign and a score of 100 predicted to be highly impactful or detrimental to protein function. Scores are colored based on EA (EA=0 (Dark blue) to EA=100 (Red)). (B) Functional EA defects of every MT₁ variant were correlated with the EA score. The 5 clusters were represented with the cluster 1 in black, the cluster 2 in blue, the cluster 3 in green, the cluster 4 in yellow and the cluster 5 in red. Data were fitted in GraphPad Prism by linear regression analysis, P and R^2 values obtained for the overall correlation.

Structural determinants of the functional impact of MT₁ variations

To investigate the possible structural determinants of the functional impact of the variants, we analyzed the position of the individual mutated residues and the topology of Clusters 1-5 on three-dimensional models of inactive and active MT₁ built by homology modelling (see Methods). We expect that these analyses will allow us to gain new insights into the structural determinants of signal transduction, particularly in how these mechanisms may be disrupted leading to malfunction.

Variations in Cluster 1 (with no impact on the receptor signaling profile) are spread throughout the structure (Figure 7A and Suppl. Figure 3), appearing mostly in the surface of the extra- and intracellular domains and far from the receptor core. This is also the case for variations in Cluster 2 – I88V^{2.65} and G166E^{4.64} – (Figure 7B), located in the extracellular part of TM2 and TM4 respectively. While these variations result in modest impacts on β arrestin-2 recruitment and $G\alpha_{12}$ or $G\alpha_{15}$ activation, they are not near the ligand-binding pocket (404) or to any of the known activation microswitches of GPCRs, precluding us to make any inference on the structure/function impact of these variations. It could therefore be proposed that these residues may contribute to an allosteric network between the binding pocket and the microswitches involved in the engagement of β arrestin-2 and either $G\alpha_{12}$ or $G\alpha_{15}$. The fact that these variations do not affect the efficacy or potency of MT₁ to activate the $G_{\alpha i}$ family members rule out the possibility that the defect could result from a general major misfolding of the receptor. Yet we cannot exclude the possibility that a modest non-specific structural impairment may have a more important impact on the pathways that are less efficiently coupled to the receptor. Indeed, the lower potency of MT₁ to activate β arrestin-2, $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{15}$ vs the $G_{\alpha i}$ family members suggests that these pathways are less efficiently coupled to the receptor.

The 6 variations in Cluster 3 are associated to a major reduction of β arrestin-2 recruitment. Interestingly, 4 of these variations are located in the interface between the cytoplasmic side of TM1 (V52A^{1.57} and R54W^{1.59}) and H8 (I309T^{8.57} and C314R^{Cterm}) (Figure 7C). The short amphipathic H8 lies adjacent to the inner leaflet of the plasma membrane, anchored through a palmitoylated cysteine (C314 in MT₁). In other GPCRs, H8 has been shown to play a crucial role in the interaction of the receptor with β arrestin-2 necessary for internalization (405), and its palmytoylation has been shown to enhance the recruitment of β arrestin-2 (406). In our structural models, H8 and intracellular loop 1 in the receptor can interact with the finger loop of β arrestin-2. Thus, we hypothesize that the variations V52A^{1.57}, R54W^{1.59}, I309T^{8.57} and C314R^{Cterm} affect β arrestin-2 recruitment by altering the local environment of H8 in MT₁. Both C314R^{Cterm} and I309T^{8.57} affect directly H8 by removing a palmytoylation site or by weakening hydrophobic interactions with nearby phospholipids. On the other hand, V52A^{1.57} and R54W^{1.59} – located at the interface between TM1 and ICL1 – would affect H8 indirectly. These results are consistent with findings on other GPCRs; for instance, hydrophobic amino acids in H8 of the mouse odorant receptor *mOR-S6* have been suggested

to form an hydrophobic core with TM1 responsible for the good positioning of H8, and variations of these residues increase the flexibility of H8 and destabilize its structure (407). Another variation in Cluster 3 (H131R^{3.56}) is located at the interface between the cytoplasmic end of TM3 and intracellular loop 2, at a location where it could interact directly with β arrestin-2 (Figure 7C). This variation also places a positively charged residue next to the highly conserved Y126^{3.51}, which might alter its function by establishing a spurious cation-pi interaction. Interestingly, this region has been proposed to be a secondary site for β arrestin interactions in other GPCRs (408, 409). The last variation (S87L^{2.64}) of Cluster 3 is located away from known potential functional sites (Figure 7C), so we could not rationalize its effect from a structural point of view.

The three variations of Cluster 4 (L138P^{ICL2}, I257F^{6.54} and I112N^{3.37}) (Figure 7D) have a more severe effect in the signaling profile of MT₁. On the one hand, as in Cluster 3, they completely terminate β arrestin-2 recruitment (Suppl. Figure 1); but, moreover, they result in loss in potency (EC₅₀) –but not in efficacy (E_{max}) – in all signaling pathways compared to WT-MT₁. The idea that this loss of potency could be due to a loss of binding affinity for MLT could be ruled out since we observe no difference of binding affinity for these three variants compared with WT-MT₁. We suggest that these variations lead to a destabilized active state, and, thus, to a less efficient activation.

The variant L138P^{ICL2} is in the cytoplasmic ICL2, which is known to form a short alpha helix in several GPCRs (e.g. rhodopsin, β 1AR, β 2AR with PDBid 4ZWJ, 2VT4 and 3POG respectively) and can interact with β -arrestins (Figure 7E) and G proteins (410) (Figure 7F). The variation of a leucine for a proline is expected to break the α helix or at least prevent its good position leading to a less efficient interaction with β arrestin-2 and G proteins and the observed decrease in potency.

The I257F^{6.54} variation is located at the extracellular side of TM6 (Figure 7D), a site already shown to be important for the active melatonin-bound form of MT₁, favoring the conformational changes necessary for signal transmission (411). Clement et al. proposed that, similarly to rhodopsin (412), ECL2 of MT₁ stabilizes TM5, TM6 and TM7 upon activation, particularly through the interaction between ECL2 and I257^{6.54}. Consequently, we suggest that the variation I257F^{6.54} alters the interactions with ECL2 decreasing the stability of the MT₁ active form. Another hypothesis is that I257^{6.54} is located one turn above the highly conserved proline-kink at P253^{6.50}, which is key in shaping TM6, a key element in the activation mechanism of GPCRs. The extracellular sides of TM6 and TM7 – near

position 257^{6.54} – form important interactions to maintain the fold of the receptor (413). Thus, the I257F^{6.54} variation might destabilize the TM6/7 interface and impair the efficient relocation of TM6 upon receptor activation.

Similarly, I112N^{3.37} is located in the middle of TM3 (Figure 7G), right next the key residues I115^{3.40} and P199^{5.50} that form part of a key switch (the ‘triad’ or PIF motif) in GPCR activation (414). The I112N^{3.37} variation would alter the packing and physico-chemical properties of this region, leading to a less efficient activation of the PIF motif and an impaired transduction of the conformational changes through TM6 and TM5 that lead to the formation of the active state. As in L138P^{ICL2}, these variants (I257F^{6.54} and I112N^{3.37}) can still activate G proteins (E_{max} is not affected), but these events are less efficient due to an impaired TM5 and TM6 leading to the observed decrease in potency.

Cluster 5 comprises two variants with almost complete loss of function. These phenotypes are easier to explain since the P80L^{2.57} variation (located in the ligand-binding site) (Figure 7H) leads to a loss of MLT binding and the R125C^{3.50} variant mutates a key residue in the D/NRY motif, known to be essential for GPCR function and directly involved in the binding of β arrestins and G proteins. R125C^{3.50} variant show a total loss of signaling capacity, except for G α B which remains well activated by this variant form of the receptor. Nevertheless, we can not make any inference on the mechanism which allows this variant to activate only G α B.

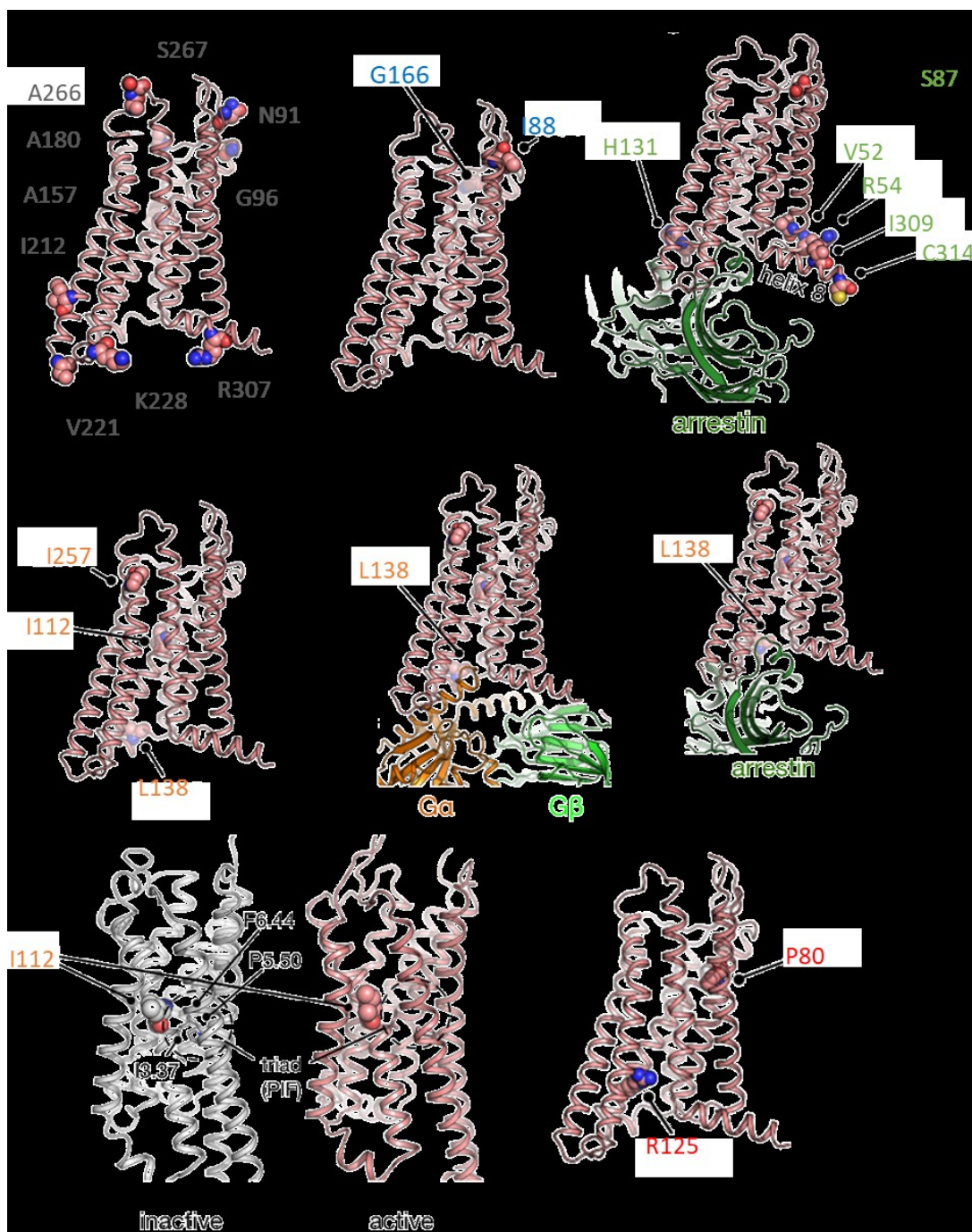


Figure 7. Three-dimensional representation of residues of interest within MT₁ and β arrestin-2.

Three-dimensional representation of MT₁ active form (wheat color), MT₁ inactive form (Grey), β arrestin-2 (Dark green), G α protein (Orange) and G β protein (Light green). Residues from clusters are shown in spheres. (A) Residues N91, G96, A157, A180, I212, V221, K228, A266, S267, R307 from cluster 1. (B) Residues I88 and G166 from cluster 2. (C) Residues V52, R54, S87, H131, I309 and C314 from cluster 3. (D) Residues I112, L138 and I257 from cluster 4. (E) Residue L138 in the MT₁ active form bound to G α protein. (F) Residue L138 in the MT₁ active form bound to β arrestin-2. (G) Residue I112 in inactive (left) and active (right) conformation of MT₁ with the 3 residues forming the “triad” (PIF) motif. (H) Residues P80 and R125 from cluster 5.

Discussion

In this study we report an exhaustive characterization of the MLT-activated MT₁ receptor signaling profile. Upon MLT stimulation, this receptor activates a broad set of pathways, activating G α i1, G α i2, G α i3, G α oA, G α oB, G α 12, G α 15 proteins and recruiting β arrestin-2 in transfected HEK293 cells. Several studies already showed interactions between MT₁ and several G proteins (146), activation of PTX sensitive G α i/o proteins by MT₁, leading to an inhibition of cAMP production by the adenylylase (146) and increase of intracellular Ca²⁺ concentration, most likely due to the activation of the PTX insensitive G α q/11/15 protein family (146) have been previously reported. Our results not only confirm these data, but also provide direct evidence for the engagement of the entire family of G α i proteins and revealed that only G α 15 among the G α q family could be efficiently activated and that neither G α q or G α 11 could be activated. It is noteworthy that G α 15 is an atypical member of the G α q family since it has been found to be activatable by a large proportion of GPCRs (402, 403). The lack of coupling to G α q and G α 11 is not due to a lack of sensitivity of the biosensors or the HEK293 cells used since coupling to the more conventional G α q family members (G α q and G α 11) could be seen in HEK293 cells for other GPCRs (415, 416). The study also reveals for the first time a coupling to G α 12.

The specific signaling profiles obtained for 32 naturally occurring MT₁ variants revealed different signaling signatures allowing us to classify the variants in 5 different clusters: no effect (cluster 1), modest impacts on β arrestin-2 recruitment and G α 12 or G α 15 activation (cluster 2), major reduction of β arrestin-2 recruitment and G α 12 and/or G α 15 activation (cluster 3), severe impairing of signaling (cluster 4), and total impairing of signaling (cluster 5). Interestingly, EA scores matched with our experimental results reciprocally validating the experimental signaling profiles observed and the predictive power of evolutionary-based approaches.

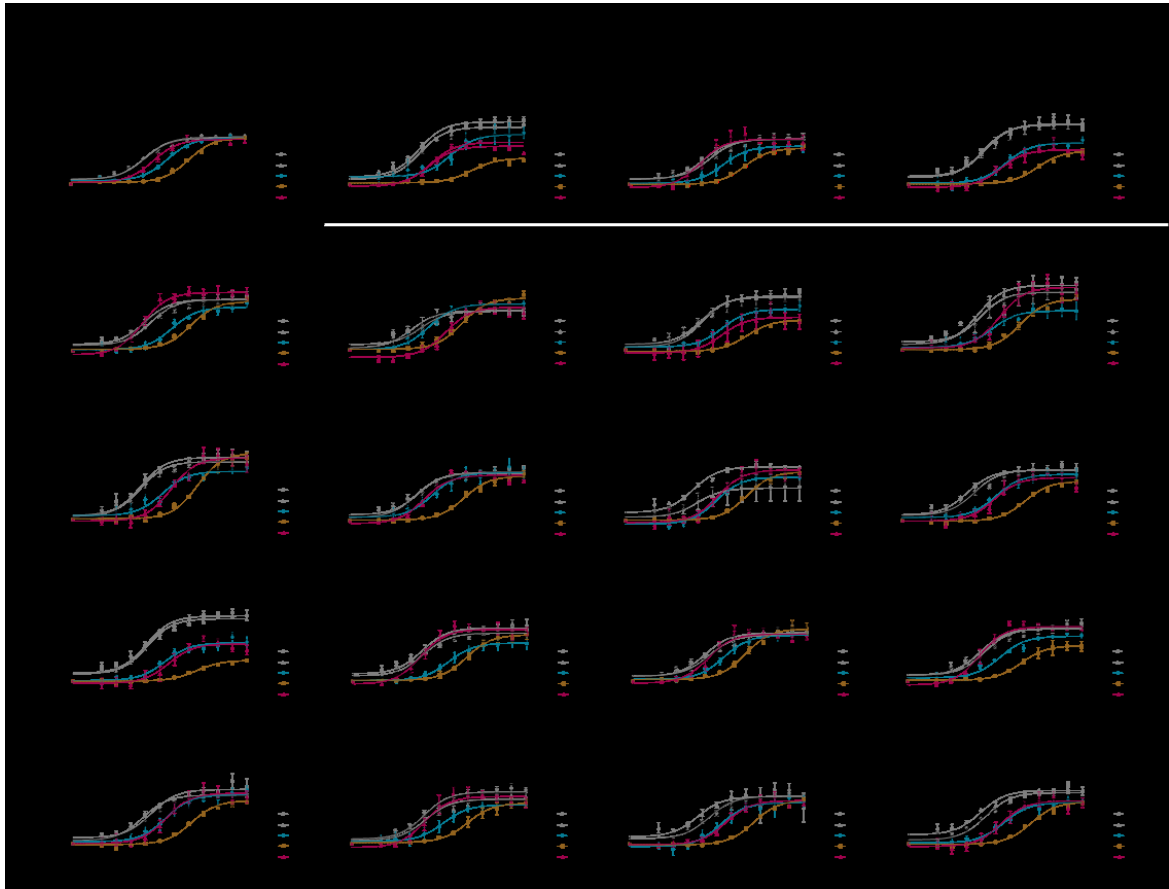
The study of the location of these different clusters in three-dimensional structural models of inactive and active MT₁ allowed us to propose specific mechanisms for the effect of the variations on receptor activation and signaling. The effects in Cluster 3 can be explained in most of the cases by direct alterations of the receptor- β arrestin-2 interactions (through H8 and ICL2). On the other hand, each variation in Cluster 4 is located near key regions in GPCR activation (The helical ICL2, the extracellular TM6/7 interface, and the PIF motif); these variations may thus alter the signaling profile by altering the environment of these

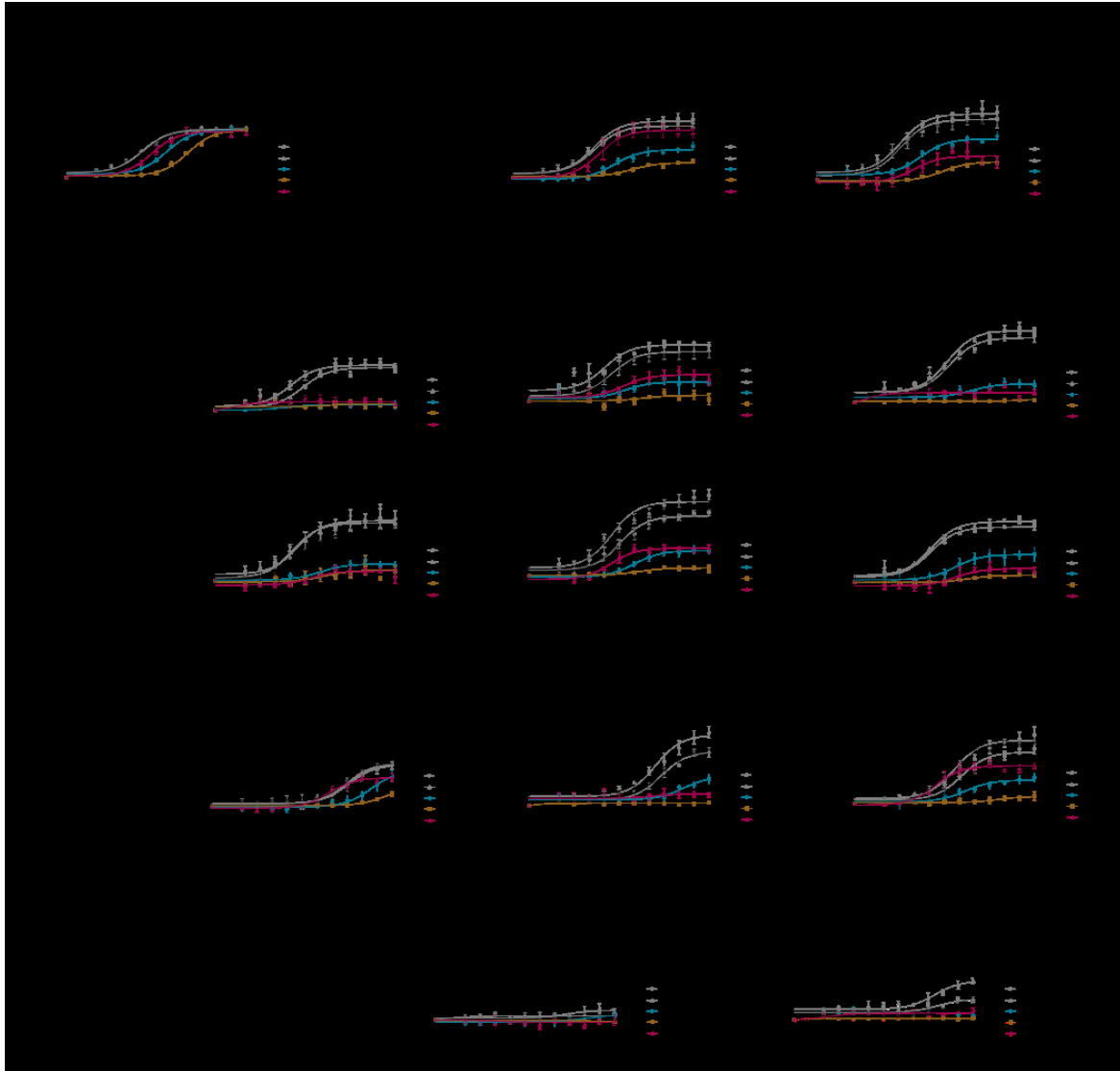
activation switches. Finally, variations in Cluster 5 alter either the ligand- or the G protein/ β arrestin-binding sites.

The different clusters revealed crucial regions of the MT₁ receptor involved in G protein activation and β arrestin-2 recruitment highlighting specific residues that had greater impact on β arrestin-2 supporting the notion that distinct allosteric networks and interactions domains maybe involved in the selective engagement of distinct signaling pathways, a concept known as functional selectivity.

As we have shown in this study, computational analysis is a valuable tool to identify important regions or residues within a receptor and to predict effect of mutations. Nevertheless, natural variants can bring unexpected and precious information to decrypt the mechanism of action of a receptor. In our case, we found natural MT₁ variants in apparently healthy people with signaling defects. Keeping in mind that MLT is known to act mainly through its 2 receptors MT₁ and MT₂ and to be involved in many diseases, we can therefore wonder how the whole organism can adapt to this decrease of MT₁ activity. It would be easy to think about a compensation from MT₂ activity, but it was recently shown that MT₂ can only activate G α i and G α z proteins and to recruit β arrestin-2 (372). This compensation would therefore lead to a partial signaling in response to MLT production.

Supplementary material



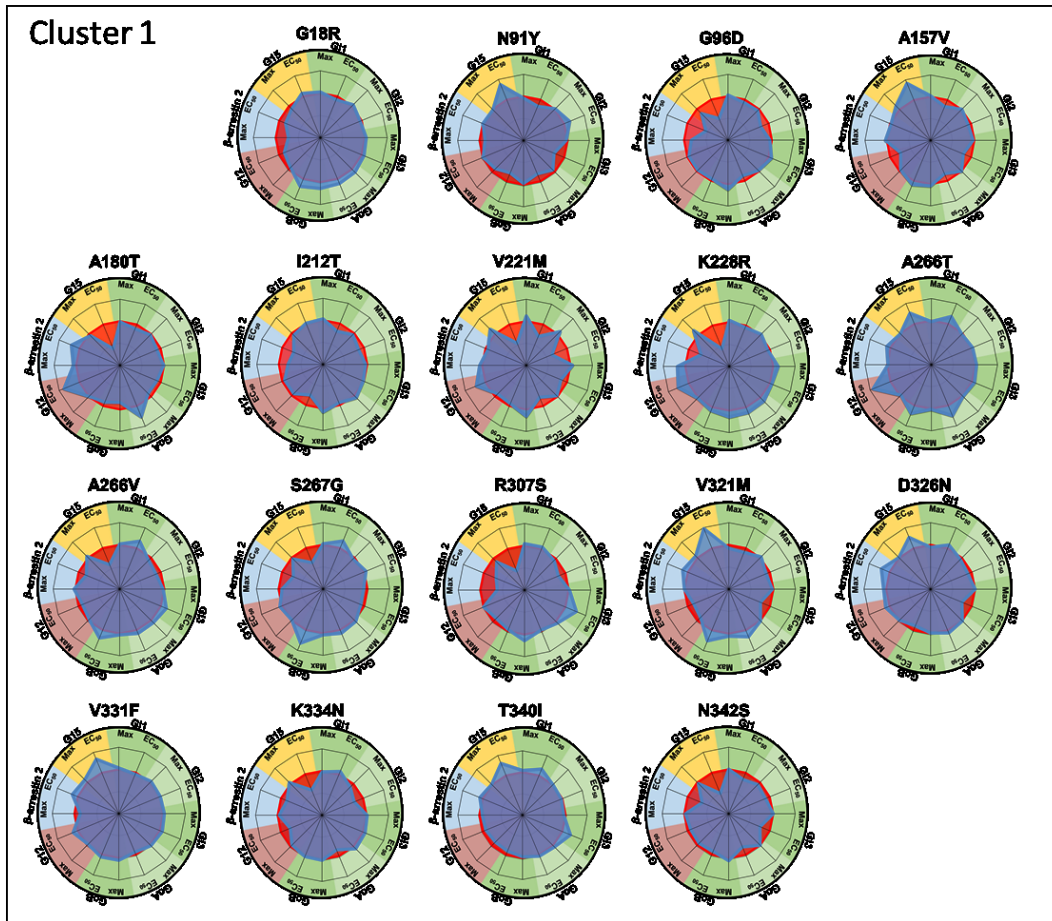


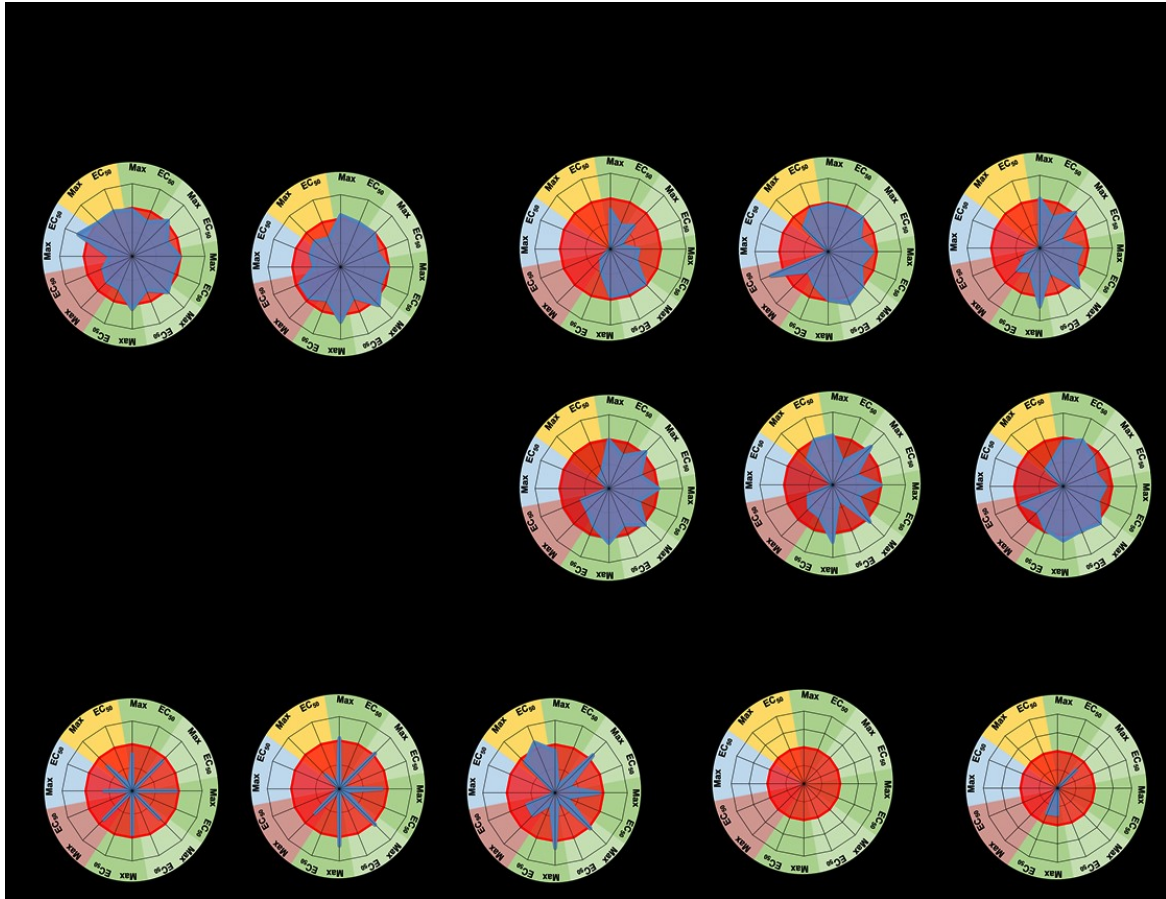
Supplementary figure 1. Melatonin concentration-response curves for G protein activations and β -arrestin 2 recruitment of the WT and the different variant profiles grouped in 5 clusters.

(A) Functional profile of the WT-MT₁ receptor and the first cluster corresponding to the 19 variants with a similar profile to the WT-MT₁ receptor. (B) The cluster 2 groups 2 variants with a slight decrease of β arrestin-2 recruitment and G α 12 or G α 15 activation. The cluster 3 groups 6 variants with a total loss of β arrestin-2 recruitment and generally an impairment of G α 12 and/or G α 15 activation. The cluster 4 groups 3 variants with a defect for every efficacy (Max) but with similar potencies (EC₅₀) to the WT-MT₁. The cluster 5 groups 2 variants with a total loss of function. Cell surface expression of each variant was adjusted to WT-MT₁ and monitored by ELISA. Experiments were repeated at least 3 times.

Data were plotted using non-linear regression with a fixed Hill slope. Data points represent means \pm SEM of at least three experiments. WT; wild-type.

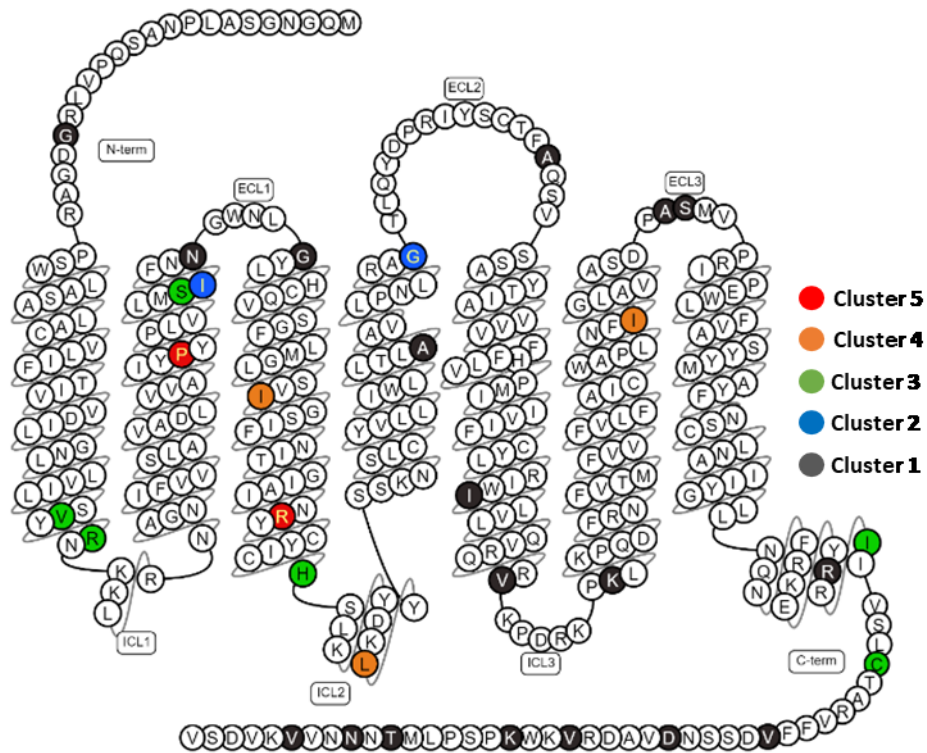
A





Supplementary figure 2. Radial graph representation of the different variant profiles grouped in 5 clusters.

On each radial graph for each MT₁ variant, maximal agonist-induced efficacy (Max) and potency (EC₅₀) obtained by BRET are indicated. The five clusters were made regarding the profile of each variant. Cell surface expression of each variant was adjusted to WT-MT₁ and monitored by ELISA. Experiments were repeated at least 3 times.



Supplementary Figure 3. Snake plot representation of WT-MT₁ with the position of the different variants.

MT₁ representation with the different variants of Cluster 1 (Dark grey), Cluster 2 (Blue), Cluster 3 (Green), Cluster 4 (Orange) and Cluster 5 (Red).

A

Receptor	Gi1			Gi2			Gi3		
	Emax (% of WT)	LogEC50	Log(Tau/Ka)	Emax (% of WT)	LogEC50	Log(Tau/Ka)	Emax (% of WT)	LogEC50	Log(Tau/Ka)
WT-MT1		-10,54 ± 0,04	10,44 ± 0,05						
G18R	104,9 ± 3,9	-10,47 ± 0,11	10,39 ± 0,08	108,3 ± 2,3	-10,72 ± 0,06	10,65 ± 0,07	106,1 ± 2,5	-10,45 ± 0,06	10,38 ± 0,06
V52A	64,0 ± 1,7	-10,07 ± 0,07	9,77 ± 0,16	49,33 ± 4,2	-9,81 ± 0,22	9,401 ± 0,16	39,25 ± 1,7	-9,98 ± 0,12	9,47 ± 0,18
R54W	91,8 ± 3,0	-10,49 ± 0,09	10,35 ± 0,11	98,79 ± 3,9	-10,48 ± 0,11	10,38 ± 0,08	84,44 ± 3,0	-10,16 ± 0,10	9,99 ± 0,10
P80L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S87L	104,9 ± 3,4	-10,25 ± 0,09	10,17 ± 0,1	108,7 ± 4,0	-10,2 ± 0,10	10,13 ± 0,08	77,33 ± 4,1	-10,22 ± 0,14	10,01 ± 0,10
I88V	92,9 ± 4,5	-10,34 ± 0,13	10,21 ± 0,09	108,7 ± 2,4	-10,55 ± 0,06	10,48 ± 0,08	95,67 ± 4,0	-10,31 ± 0,12	10,19 ± 0,07
N91Y	92,7 ± 2,7	-10,4 ± 0,085	10,27 ± 0,09	103,6 ± 3,3	-10,87 ± 0,09	10,78 ± 0,08	94,15 ± 2,6	-10,18 ± 0,07	10,05 ± 0,07
G96D	106,1 ± 3,3	-10,48 ± 0,09	10,4 ± 0,09	91,39 ± 2,9	-10,58 ± 0,09	10,43 ± 0,08	91,5 ± 3,1	-10,46 ± 0,10	10,33 ± 0,09
I112N	65,8 ± 5,6	-8,555 ± 0,16	8,27 ± 0,15	83,08 ± 3,2	-8,71 ± 0,07	8,528 ± 0,11	89,65 ± 3,2	-8,49 ± 0,06	8,34 ± 0,08
R125C	ND	ND	ND	53,06 ± 6,8	-7,798 ± 0,17	7,42 ± 0,22	ND	ND	ND
H131R	97,6 ± 2,6	-10,29 ± 0,07	10,17 ± 0,10	111,6 ± 3,1	-10,47 ± 0,08	10,42 ± 0,07	102,5 ± 3,1	-10,09 ± 0,08	10,01 ± 0,08
L138P	111,7 ± 6,5	-8,948 ± 0,12	8,89 ± 0,1	109,1 ± 4,0	-9,015 ± 0,07	8,951 ± 0,08	78,62 ± 3,7	-9,23 ± 0,11	9,03 ± 0,11
A157V	103,9 ± 5,0	-10,4 ± 0,14	10,32 ± 0,08	101,5 ± 3,6	-10,69 ± 0,10	10,6 ± 0,07	94,42 ± 2,0	-10,23 ± 0,05	10,11 ± 0,07
G166E	116,9 ± 3,8	-10,53 ± 0,09	10,49 ± 0,09	95,86 ± 1,7	-10,58 ± 0,05	10,46 ± 0,09	95,91 ± 2,4	-10,3 ± 0,07	10,19 ± 0,08
A180T	97,3 ± 3,4	-10,45 ± 0,10	10,34 ± 0,10	95,66 ± 2,0	-10,67 ± 0,06	10,55 ± 0,08	98,31 ± 2,3	-10,32 ± 0,07	10,21 ± 0,08
I212T	106,2 ± 4,9	-10,38 ± 0,13	10,3 ± 0,09	91,02 ± 2,2	-10,64 ± 0,07	10,5 ± 0,09	93,22 ± 2,2	-10,39 ± 0,06	10,26 ± 0,09
V221M	126,8 ± 2,5	-10,28 ± 0,05	10,28 ± 0,08	117,8 ± 4,8	-10,41 ± 0,11	10,38 ± 0,06	110,3 ± 4,8	-10,27 ± 0,12	10,22 ± 0,06
K228R	108,7 ± 2,7	-10,5 ± 0,07	10,44 ± 0,09	105,7 ± 4,0	-10,71 ± 0,11	10,64 ± 0,07	125,2 ± 4,0	-10,44 ± 0,09	10,44 ± 0,07
I257F	77,2 ± 5,1	-9,482 ± 0,16	9,26 ± 0,12	124,3 ± 3,1	-9,998 ± 0,06	9,991 ± 0,07	85,21 ± 3,7	-9,57 ± 0,10	9,40 ± 0,08
A266T	95,0 ± 4,3	-10,7 ± 0,13	10,57 ± 0,08	95,82 ± 2,6	-10,76 ± 0,08	10,64 ± 0,07	104,6 ± 2,9	-10,45 ± 0,08	10,37 ± 0,06
A266V	103,5 ± 2,2	-10,69 ± 0,06	10,6 ± 0,08	85,24 ± 3,4	-10,65 ± 0,12	10,48 ± 0,09	95,83 ± 2,8	-10,52 ± 0,08	10,41 ± 0,08
S267G	103,7 ± 2,9	-10,69 ± 0,08	10,6 ± 0,10	92,13 ± 1,9	-10,79 ± 0,06	10,66 ± 0,08	84,38 ± 2,0	-10,33 ± 0,06	10,16 ± 0,09
R307S	109,4 ± 2,7	-10,58 ± 0,07	10,51 ± 0,09	89,15 ± 1,7	-10,6 ± 0,05	10,45 ± 0,08	103,1 ± 2,7	-10,64 ± 0,07	10,56 ± 0,08
I309T	104,1 ± 2,8	-10,09 ± 0,07	10 ± 0,08	126,5 ± 2,8	-10,3 ± 0,06	10,3 ± 0,07	97,78 ± 2,5	-9,99 ± 0,06	9,88 ± 0,08
C314R	84,2 ± 4,1	-10,56 ± 0,14	10,38 ± 0,12	75,89 ± 2,8	-10,49 ± 0,10	10,27 ± 0,11	76,46 ± 1,7	-10,2 ± 0,06	9,98 ± 0,10
V321M	85,6 ± 3,0	-10,45 ± 0,10	10,28 ± 0,10	106 ± 4,2	-10,67 ± 0,11	10,59 ± 0,08	96,09 ± 2,3	-10,2 ± 0,06	10,09 ± 0,08
D326N	90,0 ± 2,7	-10,61 ± 0,09	10,46 ± 0,10	90,44 ± 1,5	-10,67 ± 0,05	10,53 ± 0,1	101,1 ± 2,5	-10,19 ± 0,06	10,1 ± 0,08
V331F	105,9 ± 3,6	-10,51 ± 0,10	10,43 ± 0,08	105,8 ± 1,5	-10,76 ± 0,04	10,68 ± 0,08	105,3 ± 3,1	-10,45 ± 0,08	10,37 ± 0,06
K334N	95,7 ± 2,3	-10,6 ± 0,07	10,48 ± 0,09	81,25 ± 3,3	-10,56 ± 0,12	10,37 ± 0,11	103 ± 2,5	-10,44 ± 0,07	10,35 ± 0,08
T340I	108,5 ± 2,5	-10,68 ± 0,07	10,61 ± 0,08	100,3 ± 2,3	-10,73 ± 0,06	10,63 ± 0,09	92,25 ± 3,8	-10,58 ± 0,12	10,44 ± 0,07
N342S	100,9 ± 3,4	-10,4 ± 0,09	10,3 ± 0,10	86,42 ± 2,2	-10,66 ± 0,07	10,49 ± 0,10	100,8 ± 2,1	-10,19 ± 0,05	10,1 ± 0,08
V345I	88,5 ± 4,0	-10,53 ± 0,13	10,37 ± 0,10	88,46 ± 2,1	-10,77 ± 0,07	10,62 ± 0,08	95,68 ± 1,9	-10,39 ± 0,05	10,27 ± 0,08

B

Receptor	GoA			GoB		
	Emax (% of WT)	LogEC50	Log(Tau/Ka)	Emax (% of WT)	LogEC50	Log(Tau/Ka)
WT-MT1		-10,65 ± 0,04	10,53 ± 0,04			
G18R	121,9 ± 2,1	-10,75 ± 0,05	10,71 ± 0,07	132,4 ± 2,8	-10,84 ± 0,06	10,79 ± 0,06
V52A	93,59 ± 3,2	-10,59 ± 0,10	10,45 ± 0,09	88,61 ± 2,4	-10,18 ± 0,07	9,95 ± 0,10
R54W	98,04 ± 6,2	-10,77 ± 0,20	10,65 ± 0,10	96,33 ± 4,3	-10,45 ± 0,13	10,27 ± 0,09
P80L	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S87L	131,2 ± 4,4	-10,21 ± 0,09	10,21 ± 0,08	147,3 ± 4,6	-10,22 ± 0,08	10,22 ± 0,07
I88V	106,8 ± 3,0	-10,43 ± 0,08	10,34 ± 0,08	116,7 ± 3,3	-10,43 ± 0,08	10,33 ± 0,07
N91Y	89,74 ± 2,1	-10,49 ± 0,06	10,33 ± 0,12	94,97 ± 2,5	-10,5 ± 0,07	10,31 ± 0,09
G96D	95,62 ± 5,7	-10,54 ± 0,17	10,4 ± 0,11	126,5 ± 2,9	-10,64 ± 0,06	10,58 ± 0,08
I112N	71,23 ± 4,5	-8,34 ± 0,11	8,08 ± 0,14	87,96 ± 3,5	-8,63 ± 0,07	8,41 ± 0,11
R125C	ND	ND	ND	55,41 ± 4,5	-10,44 ± 0,23	10 ± 0,18
H131R	108,2 ± 5,8	-10,47 ± 0,16	10,39 ± 0,09	124,4 ± 5,0	-10,52 ± 0,12	10,45 ± 0,07
L138P	109,2 ± 5,5	-8,82 ± 0,10	8,74 ± 0,10	140 ± 7,2	-9,12 ± 0,11	9,10 ± 0,07
A157V	99,66 ± 2,1	-10,5 ± 0,06	10,38 ± 0,10	108,5 ± 2,6	-10,76 ± 0,07	10,62 ± 0,08
G166E	124,9 ± 4,8	-10,36 ± 0,11	10,34 ± 0,08	128,7 ± 4,2	-10,44 ± 0,09	10,38 ± 0,07
A180T	82,55 ± 2,6	-10,88 ± 0,11	10,68 ± 0,14	72,56 ± 1,9	-10,6 ± 0,08	10,29 ± 0,15
I212T	113,7 ± 4,8	-10,6 ± 0,12	10,54 ± 0,09	116,3 ± 2,8	-10,46 ± 0,06	10,35 ± 0,09
V221M	95,85 ± 5,8	-10,46 ± 0,18	10,33 ± 0,11	136,7 ± 3,9	-10,63 ± 0,09	10,6 ± 0,07
K228R	124,4 ± 3,0	-10,76 ± 0,08	10,73 ± 0,09	133,5 ± 3,7	-10,75 ± 0,09	10,71 ± 0,08
I257F	105,9 ± 4,1	-9,58 ± 0,09	9,48 ± 0,09	130,1 ± 4,4	-9,83 ± 0,09	9,78 ± 0,07
A266T	102,7 ± 2,8	-10,87 ± 0,08	10,77 ± 0,08	101,5 ± 1,9	-10,85 ± 0,05	10,69 ± 0,08
A266V	115,3 ± 3,0	-10,72 ± 0,08	10,67 ± 0,09	106,8 ± 3,5	-10,85 ± 0,10	10,71 ± 0,08
S267G	108,1 ± 3,6	-10,72 ± 0,10	10,64 ± 0,10	107,3 ± 2,4	-10,97 ± 0,07	10,83 ± 0,09
R307S	111,5 ± 3,8	-10,63 ± 0,18	10,56 ± 0,09	132,8 ± 3,2	-10,65 ± 0,07	10,6 ± 0,07
I309T	118,6 ± 2,6	-9,92 ± 0,05	9,88 ± 0,09	143,3 ± 3,8	-10,42 ± 0,07	10,41 ± 0,07
C314R	113,8 ± 2,1	-10,63 ± 0,05	10,57 ± 0,09	125,3 ± 3,0	-10,64 ± 0,07	10,57 ± 0,08
V321M	102 ± 2,4	-10,79 ± 0,07	10,69 ± 0,09	112,6 ± 3,0	-10,91 ± 0,08	10,79 ± 0,08
D326N	102,5 ± 2,9	-10,71 ± 0,08	10,6 ± 0,09	97,87 ± 2,6	-10,59 ± 0,07	10,41 ± 0,09
V331F	104,6 ± 2,6	-10,6 ± 0,07	10,5 ± 0,10	110,9 ± 3,2	-10,73 ± 0,08	10,61 ± 0,08
K334N	115 ± 4,2	-10,52 ± 0,10	10,46 ± 0,09	104,2 ± 2,0	-10,69 ± 0,05	10,54 ± 0,08
T340I	110,6 ± 2,8	-10,68 ± 0,07	10,61 ± 0,08	94,81 ± 2,6	-10,6 ± 0,08	10,41 ± 0,09
N342S	100,9 ± 2,7	-10,48 ± 0,07	10,36 ± 0,10	112,4 ± 3,7	-10,61 ± 0,09	10,5 ± 0,08
V345I	109,3 ± 2,5	-10,47 ± 0,06	10,39 ± 0,09	112,4 ± 2,9	-10,85 ± 0,08	10,15 ± 0,07

C

Receptor	G12			Barrestin-2			G15		
	Emax (% of WT)	LogEC50	Log(Tau/Ka)	Emax (% of WT)	LogEC50	Log(Tau/Ka)	Emax (% of WT)	LogEC50	Log(Tau/Ka)
WT-MT1		-9,84 ± 0,04	9,82 ± 0,04		-9 ± 0,03	8,88 ± 0,02		-9,14 ± 0,05	8,99 ± 0,06
G18R	89,46 ± 5,6	-9,73 ± 0,16	9,67 ± 0,11	55,8 ± 1,9	-8,86 ± 0,09	8,53 ± 0,10	83,5 ± 2,0	-9,20 ± 0,06	8,99 ± 0,11
V52A	15,86 ± 5,9	-7,95 ± 0,54	7,14 ± 0,78	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R54W	39,75 ± 4,0	-10,08 ± 0,2	9,66 ± 0,25	ND	ND	ND	54,33 ± 4,0	-9,09 ± 0,20	8,69 ± 0,20
P80L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S87L	48,06 ± 4,1	-9,06 ± 0,18	8,73 ± 0,22	ND	ND	ND	ND	ND	ND
I88V	58,97 ± 2,8	-9,53 ± 0,11	9,29 ± 0,15	30,39 ± 1,7	-9,18 ± 0,12	8,53 ± 0,19	98,43 ± 5,1	-9,15 ± 0,14	9,01 ± 0,11
N91Y	82,38 ± 4,2	-9,84 ± 0,13	9,74 ± 0,09	78,17 ± 2,1	-9,00 ± 0,05	8,76 ± 0,07	97,41 ± 4,6	-9,48 ± 0,13	9,33 ± 0,12
G96D	94,22 ± 2,8	-9,81 ± 0,07	9,77 ± 0,10	71,62 ± 1,7	-8,57 ± 0,05	8,35 ± 0,07	75,22 ± 4,2	-8,70 ± 0,14	8,44 ± 0,14
I112N	75,89 ± 12,5	-7,66 ± 0,20	7,53 ± 0,15	43,35 ± 8,3	-7,27 ± 0,18	6,78 ± 0,21	60,19 ± 3,3	-8,00 ± 0,12	7,65 ± 0,21
R125C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H131R	45,54 ± 3,8	-9,47 ± 0,20	9,12 ± 0,22	ND	ND	ND	17,84 ± 3,6	-8,50 ± 0,49	7,61 ± 0,58
L138P	56,13 ± 7,3	-8,26 ± 0,22	7,99 ± 0,17	ND	ND	ND	26,54 ± 5,1	-7,89 ± 0,40	7,17 ± 0,46
A157V	93,69 ± 3,4	-9,61 ± 0,09	9,57 ± 0,09	106,2 ± 2,1	-8,98 ± 0,04	8,87 ± 0,05	126,5 ± 4,0	-9,52 ± 0,09	9,49 ± 0,09
G166E	83,89 ± 3,3	-9,76 ± 0,10	9,68 ± 0,10	37,96 ± 1,2	-8,71 ± 0,07	8,21 ± 0,13	60,05 ± 3,3	-8,82 ± 0,14	8,46 ± 0,20
A180T	99,08 ± 2,2	-10,19 ± 0,06	10,17 ± 0,09	112,6 ± 3,6	-9,17 ± 0,07	9,13 ± 0,05	90,96 ± 5,8	-8,55 ± 0,15	8,37 ± 0,11
I212T	87,93 ± 3,4	-9,79 ± 0,10	9,72 ± 0,10	65,79 ± 1,8	-8,74 ± 0,07	8,48 ± 0,07	88,05 ± 4,1	-9,15 ± 0,12	8,96 ± 0,13
V221M	84,5 ± 4,9	-10,04 ± 0,15	9,96 ± 0,12	110,9 ± 2,5	-8,94 ± 0,05	8,84 ± 0,05	136,2 ± 6,7	-8,71 ± 0,12	8,71 ± 0,08
K228R	102,7 ± 4,0	-10,07 ± 0,10	10,07 ± 0,10	143,5 ± 4,8	-8,72 ± 0,07	8,80 ± 0,05	134,2 ± 6,4	-8,58 ± 0,12	8,57 ± 0,07
I257F	47,84 ± 3,6	-9,50 ± 0,18	9,17 ± 0,21	ND	ND	ND	79,14 ± 3,0	-9,25 ± 0,10	9,02 ± 0,14
A266T	94,77 ± 5,3	-10,24 ± 0,15	10,21 ± 0,09	96,25 ± 2,4	-9,07 ± 0,06	8,94 ± 0,05	97,98 ± 2,4	-9,37 ± 0,07	9,23 ± 0,09
A266V	94,74 ± 2,9	-9,76 ± 0,08	9,72 ± 0,09	105,9 ± 1,9	-8,83 ± 0,04	8,78 ± 0,04	109,6 ± 5,4	-8,77 ± 0,12	8,67 ± 0,09
S267G	98,97 ± 3,8	-9,89 ± 0,10	9,87 ± 0,09	85,42 ± 1,8	-8,75 ± 0,05	8,59 ± 0,05	93,02 ± 4,7	-8,82 ± 0,13	8,65 ± 0,11
R307S	82,27 ± 3,5	-9,84 ± 0,11	9,75 ± 0,10	44,72 ± 1,0	-8,72 ± 0,05	8,31 ± 0,11	80,99 ± 5,2	-8,62 ± 0,16	8,4 ± 0,13
I309T	52,89 ± 2,9	-9,41 ± 0,13	9,13 ± 0,17	ND	ND	ND	58,42 ± 3,1	-9,14 ± 0,13	8,78 ± 0,20
C314R	57,12 ± 4,9	-9,78 ± 0,22	9,52 ± 0,15	ND	ND	ND	33,11 ± 2,9	-8,75 ± 0,23	8,13 ± 0,36
V321M	82,19 ± 4,2	-9,72 ± 0,13	9,62 ± 0,10	99,99 ± 2,6	-9,10 ± 0,08	8,97 ± 0,06	112,4 ± 3,8	-9,59 ± 0,10	9,51 ± 0,10
D326N	98,68 ± 3,2	-9,92 ± 0,08	9,90 ± 0,09	112,5 ± 4,0	-9,17 ± 0,08	9,09 ± 0,05	101,9 ± 3,3	-9,37 ± 0,09	9,25 ± 0,11
V331F	95,75 ± 2,8	-9,94 ± 0,07	9,91 ± 0,09	76,52 ± 3,9	-9,11 ± 0,11	8,87 ± 0,07	118,6 ± 3,3	-9,44 ± 0,08	9,38 ± 0,09
K334N	91,81 ± 3,7	-9,65 ± 0,10	9,60 ± 0,09	93,33 ± 1,8	-8,87 ± 0,05	8,75 ± 0,05	109 ± 5,5	-8,79 ± 0,13	8,69 ± 0,09
T340I	80,05 ± 4,5	-9,77 ± 0,14	9,66 ± 0,12	87,13 ± 4,0	-9,06 ± 0,10	8,87 ± 0,07	102,1 ± 4,9	-9,417 ± 0,1	9,29 ± 0,11
N342S	89,22 ± 5,6	-9,77 ± 0,16	9,71 ± 0,10	95,11 ± 1,8	-8,68 ± 0,04	8,55 ± 0,05	93,31 ± 3,6	-8,66 ± 0,09	8,49 ± 0,11
V345I	93,51 ± 3,1	-9,7 ± 0,08	9,65 ± 0,09	90,83 ± 2,0	-8,74 ± 0,05	8,62 ± 0,05	93,19 ± 5,7	-8,72 ± 0,15	8,56 ± 0,11

Supplementary table 1. Data from the functional characterization of variants.

Summary of the functional profiling of (A) $G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 3$, (B) $G\alpha oA$, $G\alpha oB$, (C) $G\alpha 12$ and $G\alpha 15$ activation and β arrestin-2 recruitment by WT-MT₁ and MT₁ variants. Data represents the mean ± SEM of 3-13 independent experiments with repeats in quadruplicate. ND denotes that the experimental parameter could not be determined due to lack of a concentration-response curve. The data were analyzed by comparing independent curves.

Résumé du chapitre 4 – Article 3

Dans ce manuscrit, nous avons :

- Identifié que MT_1 pouvait activer les protéines $G_{\alpha 1}$, $G_{\alpha 2}$, $G_{\alpha 3}$, $G_{\alpha oA}$, $G_{\alpha oB}$, $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha 15}$ et était capable de recruter la β arrestine-2.
- Identifié 32 variations génétiques naturelles de MT_1 en séquençant son gène chez 9393 personnes.
- Caractérisé les 32 variants naturels de MT_1 précédemment identifiés. Nous avons ainsi mesuré leur capacité à activer les protéines G précédemment nommées ainsi qu'à recruter la β arrestine-2 suite à leur liaison à la MLT.
- Généré des profils de signalisation pour chaque variant et les avons classés en 4 groupes selon leurs similitudes.
- Montré que les analyses informatiques de prédiction de l'impact de mutations (EA score) sont des outils robustes et pouvant être très utiles.
- Généré de nouveaux modèles 3D de MT_1 sous ses formes inactive et active.
- Identifié des régions du récepteur MT_1 importantes spécifiquement dans l'activation des protéines $G_{\alpha 12}$ et $G_{\alpha 15}$ et dans le recrutement de la β arrestine-2.

Ce troisième manuscrit apporte ainsi des informations précises quant au profil de signalisation du récepteur MT_1 et ses mécanismes d'action suite à son activation par la MLT. L'ensemble de ces 3 manuscrits apporte de nombreuses informations sur les rôles et la compréhension des récepteurs à la mélatonine et permet ainsi d'offrir de nouvelles perspectives pour la recherche sur le système mélatoninergique. Ces points seront notamment discutés plus en détails dans la section suivante (chapitre 5).

Chapitre 5

Discussion et conclusion générales

Lorsque j'ai débuté ma thèse, la MLT était connue pour réguler de nombreuses fonctions physiologiques dans le corps humain. Je me suis alors impliqué dans la compréhension de ses mécanismes de régulation du système dopaminergique et de l'homéostasie glycémique en lien avec le DT2, deux fonctions qui étaient alors connues mais qui restaient floues.

I. Discussion sur le premier projet de la thèse

Dans le premier article de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la régulation du système dopaminergique par le système mélatoninergique. Comme indiqué dans l'introduction de cette thèse, DAT est le principal régulateur de la dopamine extracellulaire et la compréhension de sa régulation représente donc un intérêt majeur pour la recherche de nouveaux traitements pour les maladies neurodégénératives comme la MP, pour le TDAH et pour l'addiction aux drogues ciblant le système dopaminergique comme la cocaïne ou l'amphétamine.

A. Discussion sur les interactions entre DAT et les MTRs

Nous avons révélé des interactions entre les MTRs et DAT, responsables d'une baisse d'expression de DAT à la surface cellulaire par sa rétention au niveau du réticulum endoplasmique (figure 1). Pour ce faire, nous avons utilisés des cellules HEK293 et HeLa mais également des synaptosomes de striatum de souris afin de valider ces interactions dans un modèle plus physiologique. Nous avons ainsi réalisé des co-immunoprécipitations, de l'immunofluorescence ou encore du BRET. Néanmoins, ces techniques ne nous permettent pas de dire si ces interactions sont directes ou indirectes au sein d'un complexe protéique. Il serait donc intéressant de purifier les MTRs et DAT, par chromatographie d'affinité par exemple, puis revérifier par co-immunoprécipitation si nous pouvons toujours observer ces interactions dans une solution ne contenant aucune autre protéine. Nous avons également tenté de découvrir des sites d'interactions entre ces protéines. La partie N-terminale de DAT était connue pour interagir avec différentes protéines comme la syntaxine 1A (417) ou la synaptogrine-3 (418). C'est pourquoi nous avons décidé de créer un transporteur DAT dépourvu de sa partie N-terminale afin de vérifier si cette partie est également responsable des interactions avec les MTRs. Néanmoins, nous n'avons vu aucune différence entre le DAT entier et le DAT dépourvu de sa partie N-terminale. La partie C-terminale de DAT contient une séquence de liaison aux protéines PDZ (PSD-95/Discs-large/ZO-1) (-LKV) (419) qui est connue pour être importante pour des interactions avec des protéines

d'échafaudage comme PICK-1 (Protéine Interagissant avec la kinase C 1) (309, 420) et régulant ainsi le trafic des protéines vers la surface cellulaire. Dans de futures études, il serait donc intéressant de muter cette séquence -LKV afin d'observer si elle est responsable des interactions avec MT₁ et MT₂. Nous pourrions envisager par la suite d'essayer de découvrir si des interactions directes entre cette séquence PDZ et les MTRs sont responsables de la rétention de DAT, par exemple en empêchant les interactions avec PICK-1, nécessaires pour son expression à la surface cellulaire (309, 420). D'autres acides aminés de la partie C terminale de DAT sont également importants pour son trafic vers la membrane cellulaire ou au contraire responsables de sa rétention lorsque mutés (421) et devraient également être étudiés pour voir s'ils sont responsables des interactions avec les MTRs.

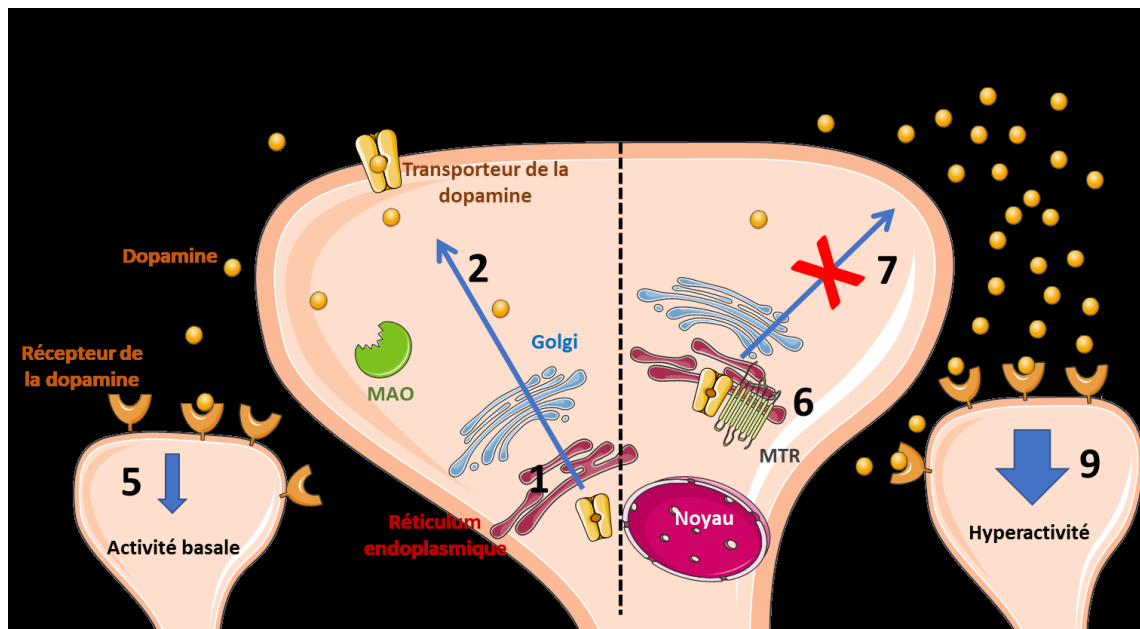


Figure 1. Modèle de régulation du système dopaminergique par les récepteurs de la mélatonine.

En condition basale et après sa synthèse, (1) DAT migre à travers le RE et le Golgi (2) pour aller s'exprimer à la surface du neurone présynaptique. (3) DAT peut ainsi recapter la dopamine extracellulaire vers le neurone présynaptique (4) afin de diminuer la quantité de dopamine dans l'espace intersynaptique et donc (5) d'éviter une suractivation des récepteurs dopaminergiques. En revanche, lorsque la cellule produit également les MTRs, (6) ces derniers interagissent avec DAT et entraînent sa rétention dans le RE (7) diminuant ainsi son expression à la surface cellulaire. (8) La diminution du nombre de DAT à la surface neuronale entraîne ainsi une accumulation de la dopamine dans l'espace intersynaptique (9) menant à une suractivation des récepteurs de la dopamine.

B. Discussion sur les effets *in vivo* des interactions entre DAT et les MTRs

Après avoir rapporté que les MTRs renaient DAT au niveau du réticulum endoplasmique et diminuaient donc la recapture de la dopamine dans les neurones, nous avons étudié les effets de cette baisse d'activité de DAT *in vivo* sur le comportement de souris. Nous avons pour cela provoqué l'hypermotilité de souris sauvages ou déficientes en MT₁ ou MT₂ en leur injectant de l'amphétamine. Nous avons ainsi démontré que les mécanismes observés *in vitro* étaient retrouvés *in vivo* avec une hypermotilité réduite chez les souris déficientes en MT₁ ou MT₂ comparativement aux souris sauvages, un effet dû à une plus forte quantité de DAT à la surface des neurones permettant d'éliminer plus rapidement la dopamine extracellulaire. Dans la continuité de cette constatation, il serait intéressant d'étudier les différences d'addiction à la cocaïne ou à l'amphétamine chez des souris sauvages ou déficientes en MT₁ ou MT₂. Nous pouvons alors penser que si le système de recapture de la dopamine extracellulaire est plus efficace chez les souris déficientes en MTRs, alors celles-ci sont moins susceptibles de devenir dépendantes de ces drogues. Ces informations pourraient être utiles dans le cadre de traitements contre l'addiction.

C. Intérêt de cette découverte pour le traitement de la MP

De manière intéressante, deux des causes majeures de la MP sont une insuffisance en dopamine au niveau du cerveau et la mort des neurones dopaminergiques due à un stress oxydatif accru (422). Or, il a été montré qu'avec l'âge, la quantité de MTRs diminuait dans le cerveau (218, 423), laissant alors penser que l'expression de DAT à la surface cellulaire serait facilitée. Ceci aurait alors pour conséquence de diminuer la quantité de dopamine extracellulaire et d'augmenter la quantité de dopamine dans les neurones présynaptiques. Une trop forte quantité de dopamine intracellulaire entraînerait alors une augmentation de radicaux libres et de peroxyde d'hydrogène due à son oxydation et à sa dégradation enzymatique (268, 318, 424) aboutissant à la mort des neurones. Notre découverte de régulation d'expression de DAT par les MTRs permet ainsi d'ouvrir de nouvelles voies à la recherche de traitements contre la MP.

D. Discussion sur la régulation des interactions entre DAT et les MTRs dans le corps

Suite aux résultats de cet article, nous pouvons nous demander comment la régulation du nombre de DAT à la surface cellulaire est effectuée. En effet, les MTRs les retiennent dans le réticulum endoplasmique mais nous ne savons pas comment ces interactions sont régulées. Comme expliqué dans l'introduction de cette thèse, la quantité de MTRs à la surface cellulaire diminue lorsqu'ils sont stimulés par la MLT. Nous pouvons donc prédire qu'à la fin de la nuit biologique, la quantité de MTRs étant moindre, la quantité de DAT augmente à la surface cellulaire, augmentant par conséquent la recapture de la dopamine. Cette hypothèse est concordante avec l'étude de Ferris (425) qui montre un maximum de recapture de la dopamine vers 6h contrairement à 18h où elle est au minimum et correspondant aux heures auxquelles les quantités de MTRs exprimés à la surface cellulaire sont faibles et élevées respectivement (426). Afin de confirmer que les interactions entre MTRs et DAT varient pendant la journée, il serait intéressant de réaliser les expériences de recapture de la dopamine dans les synaptosomes de souris prélevés à différents temps de la journée et de la nuit. En effet, nos prélèvements et préparations de synaptosomes ont toujours été effectués le matin vers 8h. Nous pouvons alors prédire que des prélèvements à 18h par exemple, montreraient une augmentation des interactions entre DAT et les MTRs et donc une diminution de l'activité de DAT dans les souris sauvages comparativement aux synaptosomes préparés à 8h.

E. Utilisation de nouveaux anticorps anti-MTRs de souris

Lors de notre étude sur les interactions entre DAT et les MTRs de souris, nous avons participé à la caractérisation de nouveaux anticorps. Ces derniers sont spécifiques et les interactions avec les MTRs sont faibles mais suffisantes pour immunoprécipiter les MTRs et observer la co-immunoprécipitation de DAT. Nous avons tout de même essayé d'optimiser les étapes d'extraction et de purification des protéines DAT et MTRs en utilisant différents détergents plus ou moins forts et différents temps d'incubation mais les résultats montrés dans cette thèse sont les plus pertinents observés. La découverte de nouveaux anticorps ayant encore plus d'affinité que ceux utilisés dans notre article reste donc difficile mais cruciale pour les futures études sur les MTRs.

II. Discussion sur le second projet de la thèse

Non seulement la MLT est connue pour avoir des impacts sur les maladies et les troubles neurologiques comme indiqué dans l'article 1, mais elle est également impliquée dans les maladies métaboliques comme le DT2. Antérieurement à ma thèse, une étude de séquençage du gène codant pour MT₂ chez des personnes normoglycémiques et des patients DT2 avait révélé 40 variants rares génétiques de ce récepteur (213). Dans le second projet de cette thèse, notre but était alors de caractériser de manière précise l'ensemble de ces variants MT₂ afin de relier un ou plusieurs défauts de signalisation à un risque accru de développer le DT2.

A. Caractérisation du récepteur sauvage MT₂

Nous avons tout d'abord caractérisé le récepteur sauvage MT₂ en utilisant la technique de BRET afin de mesurer l'activation des protéines G, la technique PathHunter de Discover X pour le recrutement de la β arrestine-2, la technique Surefire de PerkinElmer pour la phosphorylation de ERK et la technique d'HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence) en utilisant le kit "cAMP femto2" de Cisbio pour mesurer la production d'AMPc. Ces caractérisations nous ont permis d'obtenir le profil de signalisation de MT₂ à en absence et en présence de MLT. Nous pouvons ainsi observer que MT₂ active les protéines Gai/o et Gaz et recrute également la β arrestine-2.

B. Caractérisation des variants naturels MT₂ et lien avec le DT2

Dans cette étude nous avons ensuite caractérisé les 40 mutants découverts précédemment en testant 5 voies de signalisation activées par le récepteur sauvage, les voies Gai1, Gaz, β arrestin-2, AMPc et ERK. Nous avons ainsi pu relier la perte d'activation des protéines Gai1 et Gaz engendrée par la MLT ainsi que la perte de recrutement spontané de la β arrestine-2 à un risque accru de développer le DT2. Ces informations offrent de nouvelles perspectives dans le développement de traitements personnalisés contre cette maladie. Notre étude se limite néanmoins aux cellules HEK293 qui sont couramment utilisées lors d'études sur les RCPGs mais qui restent éloignées de notre système d'étude sur le DT2. C'est pourquoi, il serait intéressant de mesurer l'inhibition de la sécrétion d'insuline dans des cellules β -pancréatiques INS1 dans lesquelles les récepteurs endogènes MT₂ auraient préalablement été remplacés par les mutants MT₂ associés au développement du DT2,

notamment grâce à la technique CRISPR (Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées). L'inhibition de la sécrétion d'insuline dans ces cellules serait alors comparée à celle obtenue dans les mêmes cellules mais transfectées avec le récepteur sauvage ou les variants sans incidence sur les risques de développement de DT2.

Comme indiqué dans l'introduction de cette thèse, il est aujourd'hui connu que certains ligands peuvent entraîner une signalisation biaisée du récepteur. Dans notre cas, il serait intéressant de développer des composés pouvant agir comme modulateurs allostériques positifs capables de restaurer la signalisation défective des variants identifiés comme étant associés à des risques accrus de développer le DT2 mais aussi leur capacité à restaurer l'inhibition de la sécrétion d'insuline.

III. Discussion sur le troisième projet de la thèse

En ce qui concerne le dernier projet de cette thèse, sur l'étude de la structure et des mécanismes d'action de MT_1 , nous avons, à l'origine, planifié un projet semblable à celui sur MT_2 avec l'identification de variants naturels puis leur caractérisation afin de relier un ou plusieurs défauts de signalisation à un risque accru de développer le DT2. Seulement, nous n'avons pas trouvé de lien avec la maladie. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser les données récoltées afin de mieux comprendre les mécanismes de fonctionnement de ce récepteur.

A. Caractérisation du récepteur sauvage MT_1

Nous avons dans un premier temps caractérisé le récepteur MT_1 sauvage en utilisant la technique de BRET afin de mesurer l'activation des protéines G et le recrutement de la β arrestine-2. Cette caractérisation nous a permis d'obtenir le profil de signalisation de ce récepteur capable d'activer les protéines $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha 15}$ et de recruter la β arrestine-2. Des études sur MT_1 avaient déjà montré que ce récepteur était capable d'activer les protéines $G_{\alpha i}$, notamment grâce à leur capacité à inhiber la production d'AMPc dans la cellule. Ici, nous avons montré que MT_1 est capable d'activer l'ensemble des protéines $G_{\alpha i/o}$ sensibles à la toxine Pertussis. MT_1 était également connu pour activer la phospholipase C par le biais des protéines $G_{\alpha q/11}$. Dans cette étude, nous avons pu démontrer que MT_1 était capable d'activer la phospholipase C seulement via la protéine $G_{\alpha 15}$ et non $G_{\alpha q}$ ou $G_{\alpha 11}$ dans nos cellules HEK293. Pour la première fois, nous avons également montré une activation de la

protéine $G\alpha_{12}$ par le récepteur MT_1 . La protéine $G\alpha_{12}$ est importante puisqu'elle permet l'activation de la protéine RhoGEF impliquée dans la prolifération et la mobilité cellulaire (427).

B. Caractérisation des variants naturels MT_1

Nous avons ensuite séquencé le gène codant pour MT_1 chez 9393 personnes et révélé 32 variants génétiques naturels de ce récepteur. Leur caractérisation en utilisant les mêmes expériences que pour le récepteur sauvage nous a alors permis de dévoiler des profils de signalisation identiques au sein des variants. En utilisant une méthode de factorisation matricielle, nous avons alors regroupé les variants en 5 groupes distincts dépendamment de leurs profils de signalisation. Le groupe 1 rassemble 19 variants avec un profil de signalisation similaire à celui du récepteur sauvage, mais les 4 autres contiennent des variants avec différents défauts de signalisation. En visualisant l'emplacement de ces variants sur notre nouveau modèle 3D de MT_1 , nous avons alors pu identifier des régions du récepteur impliquées spécifiquement dans l'activation de certaines protéines. Par exemple, nous avons pu observer que l'ICL2, la partie proche de la surface intracellulaire du TM1 et l'H8 étaient très importants pour le recrutement de la β arrestine-2, mais aussi pour l'activation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{15}$. Ces 2 protéines semblent en effet avoir un profil d'activation différent des autres protéines G, mais proche de celui de la β arrestine-2. C'est la première fois qu'un lien entre ces protéines est reporté. Nous avons ainsi pu observer que la puissance qu'a MT_1 à activer ou recruter les différentes protéines testées dans ce projet varie, avec une puissance (EC_{50}) plus faible pour la β arrestine-2, la $G\alpha_{12}$ et la $G\alpha_{15}$ comparativement aux protéines $G\alpha_{i/o}$. Cette observation peut notamment expliquer l'effet plus délétère de certaines variations sur l'activation des protéines moins bien couplées comparativement aux protéines $G\alpha_{i/o}$.

Nous avons également observé que le milieu du TM3 (I112N) et la partie extracellulaire du TM6 (I257F) étaient importants pour la stabilisation de la forme active de MT_1 . La première de ces régions comporte le motif conservé chez les RCPGs "PIF" connu pour être clé dans le changement conformationnel des récepteurs vers leur forme active. La seconde région se situe au niveau du TM6, un autre élément clé dans le changement conformationnel des RCPGs vers leur forme active. La variation I257F^{6.54} se situant à proximité du résidu conservé P253^{6.50}, son effet drastique sur la signalisation de MT_1 était prédictible.

Par la suite, il serait intéressant de simuler par dynamique moléculaire les effets de ces variations sur la stabilité de la forme active du récepteur afin de tester nos hypothèses.

C. Discussion sur les limites de l'analyse de corrélation entre effets phénotypiques et prédictions informatiques

Lors de l'analyse de la corrélation entre le score d'effet phénotypique (Average phenotypic effect) et le score d'action d'évolution (EA score), nous avons pu observer une phase de latence correspondant à un score phénotypique inférieur aux prédictions du EA score pour certains variants du groupe 1 ayant un EA score entre 40 et 60 environ (Figure 2). Cette phase de latence peut être expliquée par le fait que notre essai n'était peut-être pas assez sensible pour mesurer de faibles variations fonctionnelles.

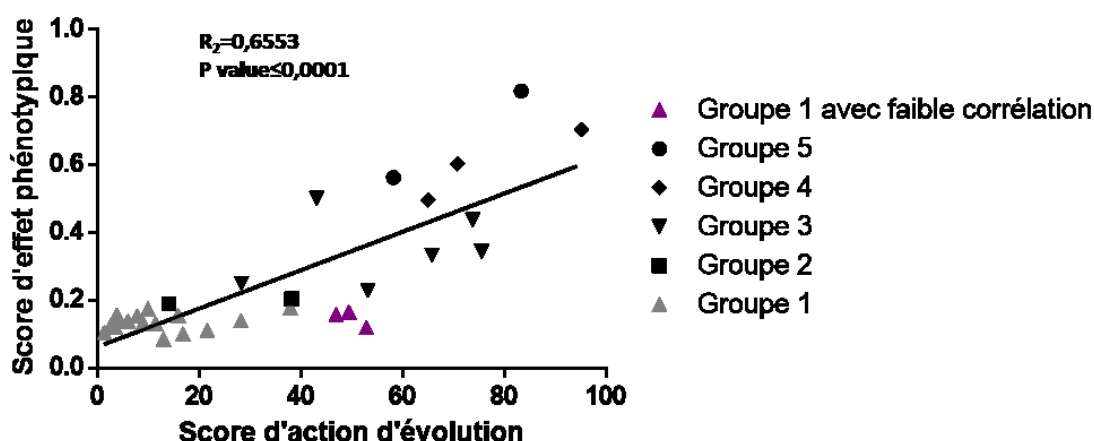


Figure 2. Score d'effet phénotypique en fonction du score d'action d'évolution. Représentation graphique de la corrélation entre score d'effet phénotypique et le score d'action d'évolution des 5 groupes de variants naturels de MT₁. En violet, les membres du groupe 1 ayant un faible score d'effet phénotypique comparativement au score d'action d'évolution.

IV. Discussion sur les liens entre les projets 2 et 3

A. Discussion sur la comparaison des profils de signalisation des récepteurs MT₁ et MT₂

Le point commun entre les projets 2 et 3 est la caractérisation des récepteurs MT₁ et MT₂ sauvages en utilisant les différentes techniques citées précédemment, nous permettant

d'obtenir le profil de signalisation de ces 2 récepteurs. Il reste néanmoins difficile de comparer leurs profils puisque certaines techniques diffèrent entre les 2 récepteurs. De plus, la mesure de la phosphorylation de ERK et de la production d'AMPc n'a été réalisée que dans le cadre de l'étude sur le récepteur MT₂. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que l'étude sur MT₂ est antérieure à l'étude sur MT₁ et certains biosenseurs utilisés dans la caractérisation de ce dernier n'existaient alors pas. Ces 2 récepteurs étant impliqués dans des maladies et troubles parfois différents, il serait donc intéressant de refaire la caractérisation de ces 2 récepteurs de manière similaire afin de pouvoir les comparer, comprendre les rôles différents qu'ils jouent dans le développement des maladies et réfléchir aux stratégies qui pourraient être adoptées pour parer les défauts de signalisation associés.

B. Discussion sur la comparaison des mécanismes d'activation des récepteurs MT₁ et MT₂

Nous avons démontré dans le troisième projet de cette thèse qu'il était possible de révéler des mécanismes d'activation grâce à la caractérisation fonctionnelle de variants naturels. Ayant déjà obtenu la caractérisation fonctionnelle de variants MT₂, il serait maintenant intéressant de réaliser un nouveau modèle 3D par homologie du récepteur MT₂ et d'essayer de comprendre ses modes de fonctionnement de la même manière que le travail réalisé sur MT₁. Ce travail pourrait ainsi permettre de comparer les mécanismes de ces 2 récepteurs qui sont proches, mais qui ont des profils de signalisation différents, dans le but final de pouvoir développer de nouvelles molécules capables d'activer, ou d'inhiber certaines voies spécifiques et sur un seul de ces 2 récepteurs. En attendant, nous pouvons nous baser sur les précédents modèles 3D de MT₂.

Au cours de ma thèse, nous avons identifié des régions spécifiques des récepteurs MT₁ et MT₂ importantes pour l'activation de la β arrestine-2 (figure 3). Lorsque nous comparons leurs positions au sein de ces deux récepteurs, nous pouvons voir que certaines de ces régions sont similaires et d'autres différentes. En effet, la région regroupant l'H8 et la partie proche de la surface intracellulaire du TM1 ainsi que la partie proche de la surface extracellulaire du TM1 et TM2 semblent importantes à la fois pour MT₁ et MT₂ afin de recruter efficacement la β arrestine-2 (Figure 3A et B). En revanche, la région de MT₁ regroupant l'ICL2 et la partie proche de la surface intracellulaire du TM4 (Figure 3B) semble importante pour MT₁ mais pas pour MT₂, tout comme la partie proche de la partie médiane du TM3 et

la partie extracellulaire du TM6 (Figure 3C). La partie proche de la surface intracellulaire du TM6 (Figure 3-C), quant à elle, ne semble importante que pour MT₂. Toutes ces informations semblent nous indiquer des mécanismes d'action semblables entre MT₁ et MT₂, mais avec des spécificités propres à chacun de ces deux récepteurs. Il reste néanmoins difficile de tirer des conclusions quant aux différences entre MT₁ et MT₂ puisque les variations génétiques ne sont pas les mêmes entre ces deux récepteurs. C'est pourquoi, même si des régions semblent plus importantes pour un récepteur que pour l'autre d'après notre caractérisation, ces différences pourraient seulement provenir de la position des variations génétiques ou de la nature même du changement d'acide aminé. Après avoir montré durant ma thèse que les analyses computationnelles étaient très efficaces afin de prédire l'effet de mutations, nous pourrions réutiliser cette technique afin de prédire les variations de MT₁ sur MT₂ et vice-versa. Nous pourrions ainsi identifier de manière plus précise les différences de mécanismes entre ces deux récepteurs. Néanmoins, la meilleure manière afin de pouvoir comparer les mécanismes de signalisation de ces 2 récepteurs serait de muter les mêmes résidus et de refaire une caractérisation fonctionnelle des mutants.

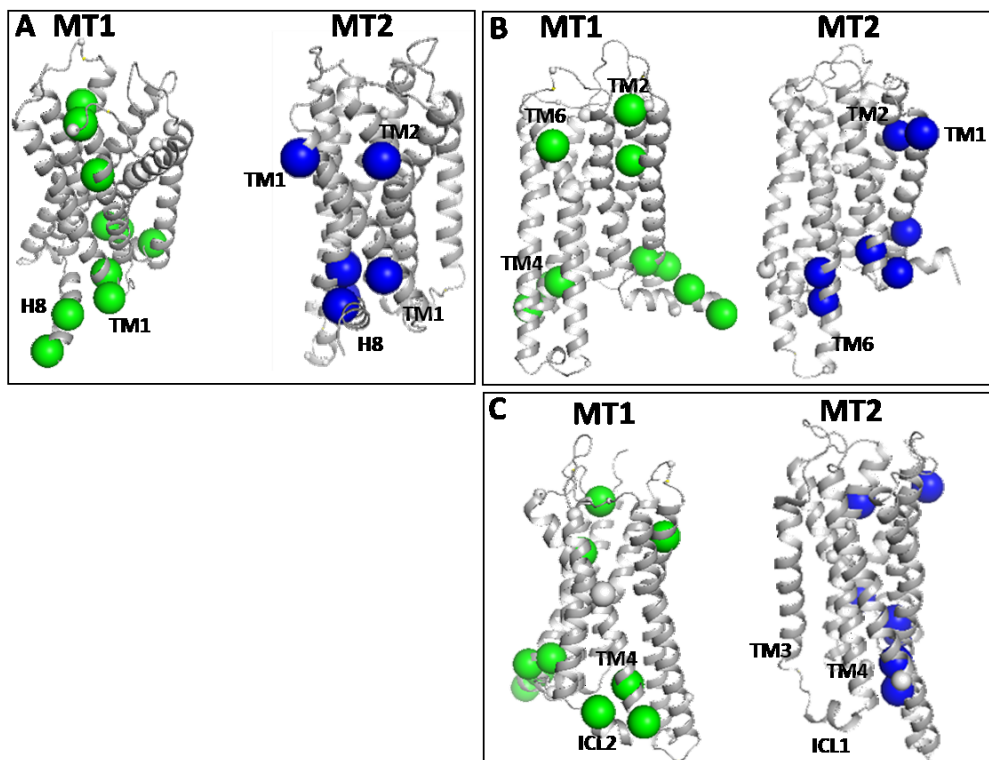


Figure 3. Variants MT₁ et MT₂ ayant un défaut de recrutement de la β arrestine-2. Représentation sphérique des variants MT₁ (Vert) et MT₂ (Bleu) ayant des défauts majeurs de recrutement de la β arrestine-2 révélés lors des caractérisations fonctionnelles. Les figures A, B et C représentent 3 différents points de vue des récepteurs.

V. Conclusion générale

En conclusion, cette thèse a permis de révéler une des premières interactions entre les MTRs et un transporteur, dans notre cas DAT, régulant ainsi son trafic vers la membrane cellulaire et donc la recapture de la dopamine de l'espace intersynaptique vers le neurone présynaptique. Nous avons également caractérisé fonctionnellement de manière précise les récepteurs MT₁ et MT₂ médiant la réponse de la MLT dans les cellules et avons identifié 3 voies de signalisation de MT₂ impliquées dans le développement du DT2. Nous avons également créé de nouveaux modèles 3D de MT₁ inactif et actif et avons pu identifier des régions précises de MT₁ importantes dans la signalisation spécifique des protéines G α 12, G α 15 et β arrestine-2. En outre, durant ma thèse, nous avons permis une avancée conséquente dans la compréhension des mécanismes régulant le système mélatoninergique ouvrant sur de nouvelles perspectives de recherche pour les scientifiques s'intéressant à la MLT.

VI. Bibliographie

1. Aaron B. Lerner JDC, Yoshiyata Takahashi, Teh H. Lee, and Wataru Mori. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958;80, 10, 2587-2587.
2. Lerner AB, Case, J.D. et Heinzelman, R.V. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc.* 1959;81, 6084-5.
3. Dubocovich ML. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;246(3):902-10.
4. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 1991;12(2):151-80.
5. Melatonin. Monograph. *Altern Med Rev.* 2005;10(4):326-36.
6. Barrenetxe J, Delagrangé P, Martínez JA. Physiological and metabolic functions of melatonin. *J Physiol Biochem.* 2004;60(1):61-72.
7. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 1994;13(5):1177-85.
8. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(19):8734-8.
9. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.* 2011;93(3):350-84.
10. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia.* 1993;49(8):665-70.
11. Poeggeler RHaB. Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry.* 2007;vol. 7, no. 4, pp. 289– 303.
12. Karasek M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol.* 2004;39(11-12):1723-9.
13. Facciola G, Hidestrand M, von Bahr C, Tybring G. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;56(12):881-8.
14. Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(1):17-24.
15. Semak I, Naumova M, Korik E, Terekhovitch V, Wortsman J, Slominski A. A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome C. *Biochemistry.* 2005;44(26):9300-7.
16. Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem.* 1974;249(4):1311-3.
17. Fischer TW, Sweatman TW, Semak I, Sayre RM, Wortsman J, Slominski A. Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *FASEB J.* 2006;20(9):1564-6.
18. Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangé P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(8):412-9.

19. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod.* 1998;3(1):13-22.
20. Cardinali DP. Melatonin. I A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev.* 1981;2(3):327-46.
21. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(2):79-94.
22. Attwood TK, Findlay JB. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 1994;7(2):195-203.
23. Kolakowski LF, Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels.* 1994;2(1):1-7.
24. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1256-72.
25. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):60-71.
26. Lambert NA. Dissociation of heterotrimeric g proteins in cells. *Sci Signal.* 2008;1(25):re5.
27. Zhang P, Mende U. Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets. *Circ Res.* 2011;109(3):320-33.
28. Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem.* 1958;232(2):1077-91.
29. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:281-312.
30. Kadamur G, Ross EM. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:127-54.
31. Rajagopal S, Shenoy SK. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal.* 2018;41:9-16.
32. Tsao P, Cao T, von Zastrow M. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(2):91-6.
33. Bouvier M, Collins S, O'Dowd BF, Campbell PT, de Blasi A, Kobilka BK, et al. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J Biol Chem.* 1989;264(28):16786-92.
34. Thomsen ARB, Jensen DD, Hicks GA, Bunnett NW. Therapeutic Targeting of Endosomal G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2018.
35. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(2):1261-73.
36. Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(4):913-22.
37. Ferguson SS, Downey WE, 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science.* 1996;271(5247):363-6.
38. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, et al. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature.* 1996;383(6599):447-50.

39. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, et al. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3712-7.
40. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*. 1990;248(4962):1547-50.
41. Wilden U, Hall SW, Kuhn H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(5):1174-8.
42. Cao TT, Mays RW, von Zastrow M. Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. *J Biol Chem*. 1998;273(38):24592-602.
43. von Zastrow M, Kobilka BK. Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem*. 1992;267(5):3530-8.
44. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(22):17201-10.
45. Walther C, Ferguson SS. Arrestins: role in the desensitization, sequestration, and vesicular trafficking of G protein-coupled receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;118:93-113.
46. Diviani D, Lattion AL, Abuin L, Staub O, Cotecchia S. The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J Biol Chem*. 2003;278(21):19331-40.
47. Fan GH, Yang W, Wang XJ, Qian Q, Richmond A. Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization. *Biochemistry*. 2001;40(3):791-800.
48. Fraile-Ramos A, Kohout TA, Waldhoer M, Marsh M. Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway. *Traffic*. 2003;4(4):243-53.
49. Paing MM, Temple BR, Trejo J. A tyrosine-based sorting signal regulates intracellular trafficking of protease-activated receptor-1: multiple regulatory mechanisms for agonist-induced G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem*. 2004;279(21):21938-47.
50. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:857-902.
51. Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(28):17744-8.
52. Haasemann M, Cartaud J, Muller-Esterl W, Dunia I. Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J Cell Sci*. 1998;111 (Pt 7):917-28.
53. Kifor O, Diaz R, Butters R, Kifor I, Brown EM. The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J Biol Chem*. 1998;273(34):21708-13.
54. Ishizaka N, Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension*. 1998;32(3):459-66.
55. Boucrot E, Ferreira AP, Almeida-Souza L, Debard S, Vallis Y, Howard G, et al. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*. 2015;517(7535):460-5.

56. Renard HF, Simunovic M, Lemiere J, Boucrot E, Garcia-Castillo MD, Arumugam S, et al. Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*. 2015;517(7535):493-6.
57. Kenakin T. Signaling bias in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2017;12(4):321-33.
58. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, et al. Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;335(3):572-9.
59. DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, et al. A G protein-biased ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;344(3):708-17.
60. Luttrell LM, Maudsley S, Bohn LM. Fulfilling the Promise of "Biased" G Protein-Coupled Receptor Agonism. *Mol Pharmacol*. 2015;88(3):579-88.
61. Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrange P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*. 2008;154(6):1182-95.
62. von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, et al. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci*. 2002;5(3):234-8.
63. von Gall C, Weaver DR, Moek J, Jilg A, Stehle JH, Korf HW. Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1040:508-11.
64. Cardinali DP, Vacas MI, Boyer EE. Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology*. 1979;105(2):437-41.
65. Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*. 1984;306, 782-4.
66. Vakkuri O, Lamsa E, Rahkamaa E, Ruotsalainen H, et Leppaluoto J. Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and proton NMR spectroscopy. *Anal Biochem*. 1984;142, 284-9.
67. Laudon MeZ, N. Characterization of central melatonin receptors using ¹²⁵I-melatonin. *FEBS Lett*. 1986;197, 9-12.
68. Dubocovich ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J*. 1988;2(12):2765-73.
69. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(13):6133-7.
70. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):343-80.
71. Heydenreich FM, Vuckovic Z, Matkovic M, Veprintsev DB. Stabilization of G protein-coupled receptors by point mutations. *Front Pharmacol*. 2015;6:82.
72. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4903-8.
73. Michino M, Abola E, participants GD, Brooks CL, 3rd, Dixon JS, Moulton J, et al. Community-wide assessment of GPCR structure modelling and ligand docking: GPCR Dock 2008. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(6):455-63.

74. Kufareva I, Rueda M, Katritch V, Stevens RC, Abagyan R, participants GD. Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment. *Structure*. 2011;19(8):1108-26.
75. Beuming T, Sherman W. Current assessment of docking into GPCR crystal structures and homology models: successes, challenges, and guidelines. *J Chem Inf Model*. 2012;52(12):3263-77.
76. Johnston JM, Filizola M. Showcasing modern molecular dynamics simulations of membrane proteins through G protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol*. 2011;21(4):552-8.
77. Gillette MU, Mitchell JW. Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):99-107.
78. Moore RY. Organization of the mammalian circadian system. *Ciba Found Symp*. 1995;183:88-99; discussion 100-6.
79. Fujieda H, Scher J, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM. Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: immunocytochemical study of mt1 melatonin receptor in guinea pig retina. *Vis Neurosci*. 2000;17(1):63-70.
80. Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(3):889-97.
81. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29(5):325-33.
82. Peters JL, Cassone VM. Melatonin regulates circadian electroretinogram rhythms in a dose- and time-dependent fashion. *J Pineal Res*. 2005;38(3):209-15.
83. Rufiange M, Dumont M, Lachapelle P. Correlating retinal function with melatonin secretion in subjects with an early or late circadian phase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(7):2491-9.
84. Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. *Bioessays*. 2008;30(7):624-33.
85. Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S, Sauri DM. 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1997;355(3):365-75.
86. Sengupta A, Baba K, Mazzoni F, Pozdeyev NV, Strettoi E, Iuvone PM, et al. Localization of melatonin receptor 1 in mouse retina and its role in the circadian regulation of the electroretinogram and dopamine levels. *PLoS One*. 2011;6(9):e24483.
87. Baba K, Benleulmi-Chaachoua A, Journe AS, Kamal M, Guillaume JL, Dussaud S, et al. Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci Signal*. 2013;6(296):ra89.
88. Baba K, Pozdeyev N, Mazzoni F, Contreras-Alcantara S, Liu C, Kasamatsu M, et al. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(35):15043-8.
89. Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem*. 1993;53(4):373-82.
90. Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, et al. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*. 1997;19(1):91-102.
91. Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, et al. Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol*. 2003;23(3):1054-60.

92. Lacoste B, Angeloni D, Dominguez-Lopez S, Calderoni S, Mauro A, Fraschini F, et al. Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. *J Pineal Res.* 2015;58(4):397-417.
93. Uz T, Akhisaroglu M, Ahmed R, Manev H. The pineal gland is critical for circadian Period1 expression in the striatum and for circadian cocaine sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(12):2117-23.
94. Wang X, Sirianni A, Pei Z, Cormier K, Smith K, Jiang J, et al. The melatonin MT1 receptor axis modulates mutant Huntingtin-mediated toxicity. *J Neurosci.* 2011;31(41):14496-507.
95. Zisapel N. Melatonin-dopamine interactions: from basic neurochemistry to a clinical setting. *Cell Mol Neurobiol.* 2001;21(6):605-16.
96. Adi N, Mash DC, Ali Y, Singer C, Shehadeh L, Papapetropoulos S. Melatonin MT1 and MT2 receptor expression in Parkinson's disease. *Med Sci Monit.* 2010;16(2):BR61-7.
97. Ng KY, Leong MK, Liang H, Paxinos G. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct Funct.* 2017;222(7):2921-39.
98. Weaver DR, Stehle JH, Stopa EG, Reppert SM. Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(2):295-301.
99. Dubocovich ML, Benloucif S, Masana MI. Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Behav Brain Res.* 1996;73(1-2):141-7.
100. Pandi-Perumal SR, Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Poeggeler, B. et, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 2006;273, 2813-38.
101. Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Reiter RJ. Physiological ischemia/reperfusion phenomena and their relation to endogenous melatonin production: a hypothesis. *Endocrine.* 2005;27(2):149-58.
102. Dominguez-Alonso A, Valdes-Tovar M, Solis-Chagoyan H, Benitez-King G. Melatonin stimulates dendrite formation and complexity in the hilar zone of the rat hippocampus: participation of the Ca⁺⁺/Calmodulin complex. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):1907-27.
103. Ramirez-Rodriguez G, Ortiz-Lopez L, Dominguez-Alonso A, Benitez-King GA, Kempermann G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res.* 2011;50(1):29-37.
104. Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res.* 2000;28(3):156-64.
105. Peschke E, Muhlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewicz E, Peschke D. Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res.* 2002;33(2):63-71.
106. Kemp DM, Ubeda M, Habener JF. Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;191(2):157-66.
107. Muhlbauer E, Peschke E. Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res.* 2007;42(1):105-6.
108. Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Muhlbauer E. Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res.* 2007;42(4):350-8.

109. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spiegel P, et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet.* 2009;41(1):82-8.
110. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet.* 2009;41(1):77-81.
111. Nagorny CL, Sathanoori R, Voss U, Mulder H, Wierup N. Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2011;50(4):412-7.
112. Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J, Marchand M, et al. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* 2009;41(1):89-94.
113. Staiger H, Machicao F, Schafer SA, Kirchhoff K, Kantartzis K, Guthoff M, et al. Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS One.* 2008;3(12):e3962.
114. Li C, Shi Y, You L, Wang L, Chen ZJ. Melatonin receptor 1A gene polymorphism associated with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 2011;72(2):130-4.
115. Bahr I, Muhlbauer E, Albrecht E, Peschke E. Evidence of the receptor-mediated influence of melatonin on pancreatic glucagon secretion via the Galphaq protein-coupled and PI3K signaling pathways. *J Pineal Res.* 2012;53(4):390-8.
116. Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Huang GC, et al. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2008;44(3):273-9.
117. Kosa E, Maurel D, Siaud P. Effects of pinealectomy on glucagon responsiveness to hypoglycaemia induced by insulin injections in fed rats. *Exp Physiol.* 2001;86(5):617-20.
118. Bahr I, Muhlbauer E, Schucht H, Peschke E. Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. *J Pineal Res.* 2011;50(3):336-44.
119. Gottlieb DJ, Punjabi NM, Newman AB, Resnick HE, Redline S, Baldwin CM, et al. Association of sleep time with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Arch Intern Med.* 2005;165(8):863-7.
120. Donga E, van Dijk M, van Dijk JG, Biermasz NR, Lammers GJ, van Kralingen KW, et al. A single night of partial sleep deprivation induces insulin resistance in multiple metabolic pathways in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(6):2963-8.
121. Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, et al. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res.* 2006;40(2):135-43.
122. O'Brien IA, Lewin IG, O'Hare JP, Arendt J, Corrall RJ. Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1986;24(4):359-64.
123. Peschke E, Peschke D. Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 1998;41(9):1085-92.
124. Delattre E, Cipolla-Neto J, Boschero AC. Diurnal variations in insulin secretion and K⁺ permeability in isolated rat islets. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(7):505-10.
125. Allaman-Pillet N, Roduit R, Oberson A, Abdelli S, Ruiz J, Beckmann JS, et al. Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;226(1-2):59-66.
126. Picinato MC, Hirata AE, Cipolla-Neto J, Curi R, Carvalho CR, Anhe GF, et al. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2008;44(1):88-94.

127. Bizot-Espiard JG, Double A, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangé P, Ktorza A, Penicaud L. Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. *Diabetes Metab.* 1998;24(3):235-40.
128. la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, van der Vliet J, Buijs RM. Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. *J Neuroendocrinol.* 2001;13(12):1025-32.
129. Contreras-Alcantara S, Baba K, Tosini G. Removal of melatonin receptor type 1 induces insulin resistance in the mouse. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(9):1861-3.
130. Stumpf I, Muhlbauer E, Peschke E. Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res.* 2008;45(3):318-27.
131. Csaba G, Nagy SU. The regulatory role of the pineal gland on the thyroid gland, adrenal medulla and islets of Langerhans. *Acta Biol Med Ger.* 1973;31(4):617-9.
132. Nelson RJ, Drazen DL. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:404-15.
133. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004;18(3):537-9.
134. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(2):167-79.
135. Skwarlo-Sonta K, Majewski P, Markowska M, Oblap R, Olszanska B. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81(4):342-9.
136. Drazen DL, Bilu D, Bilbo SD, Nelson RJ. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(5):R1476-82.
137. Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol.* 2001;430(2-3):351-7.
138. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N, Rodriguez-Rodriguez A, Guerrero JM. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):8638-83.
139. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res.* 2007;43(4):365-71.
140. Gerdin MJ, Masana MI, Rivera-Bermudez MA, Hudson RL, Earnest DJ, Gillette MU, et al. Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB J.* 2004;18(14):1646-56.
141. Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int.* 1994;24(2):101-46.
142. MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA. Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(4):587-95.
143. Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal

- transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology*. 1998;139(7):3064-71.
144. Jones MP, Melan MA, Witt-Enderby PA. Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner. *Cancer Lett*. 2000;151(2):133-43.
145. Roka F, Brydon L, Waldhoer M, Strosberg AD, Freissmuth M, Jockers R, et al. Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol*. 1999;56(5):1014-24.
146. Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, et al. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol*. 1999;13(12):2025-38.
147. Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol*. 1999;58(4):633-9.
148. Godson C, Reppert SM. The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology*. 1997;138(1):397-404.
149. Nelson CS, Ikeda M, Gompf HS, Robinson ML, Fuchs NK, Yoshioka T, et al. Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagine-124. *Mol Endocrinol*. 2001;15(8):1306-17.
150. Slanar O, Pelisek V, Vanecek J. Melatonin inhibits pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-induced increase of cyclic AMP accumulation and [Ca²⁺]_i in cultured cells of neonatal rat pituitary. *Neurochem Int*. 2000;36(3):213-9.
151. Hunt AE, Al-Ghoul WM, Gillette MU, Dubocovich ML. Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(1):C110-8.
152. Peschke E, Schucht H, Muhlbauer E. Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Pineal Res*. 2010;49(4):373-81.
153. Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E. Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res*. 2009;46(2):140-7.
154. Bach AG, Wolgast S, Muhlbauer E, Peschke E. Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca²⁺ release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res*. 2005;39(3):316-23.
155. Peschke E, Bach AG, Muhlbauer E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res*. 2006;40(2):184-91.
156. Dijk DJ, Czeisler CA. Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and wakefulness in humans. *Neurosci Lett*. 1994;166(1):63-8.
157. Cajochen C, Khalsa SB, Wyatt JK, Czeisler CA, Dijk DJ. EEG and ocular correlates of circadian melatonin phase and human performance decrements during sleep loss. *Am J Physiol*. 1999;277(3 Pt 2):R640-9.
158. Krauchi K, Cajochen C, Werth E, Wirz-Justice A. Functional link between distal vasodilation and sleep-onset latency? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;278(3):R741-8.
159. Nakagawa H, Sack RL, Lewy AJ. Sleep propensity free-runs with the temperature, melatonin and cortisol rhythms in a totally blind person. *Sleep*. 1992;15(4):330-6.
160. Lockley SW, Skene DJ, Tabandeh H, Bird AC, DeFrance R, Arendt J. Relationship between napping and melatonin in the blind. *J Biol Rhythms*. 1997;12(1):16-25.

161. McArthur AJ, Lewy AJ, Sack RL. Non-24-hour sleep-wake syndrome in a sighted man: circadian rhythm studies and efficacy of melatonin treatment. *Sleep*. 1996;19(7):544-53.
162. Uchiyama M, Okawa M, Shibui K, Kim K, Tagaya H, Kudo Y, et al. Altered phase relation between sleep timing and core body temperature rhythm in delayed sleep phase syndrome and non-24-hour sleep-wake syndrome in humans. *Neurosci Lett*. 2000;294(2):101-4.
163. Davis FC. Melatonin: role in development. *J Biol Rhythms*. 1997;12(6):498-508.
164. Cajochen C, Krauchi K, Wirz-Justice A. The acute soporific action of daytime melatonin administration: effects on the EEG during wakefulness and subjective alertness. *J Biol Rhythms*. 1997;12(6):636-43.
165. Deacon S, Arendt J. Melatonin-induced temperature suppression and its acute phase-shifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans. *Brain Res*. 1995;688(1-2):77-85.
166. Krauchi K, Cajochen C, Wirz-Justice A. A relationship between heat loss and sleepiness: effects of postural change and melatonin administration. *J Appl Physiol* (1985). 1997;83(1):134-9.
167. Krauchi K, Cajochen C, Danilenko KV, Wirz-Justice A. The hypothermic effect of late evening melatonin does not block the phase delay induced by concurrent bright light in human subjects. *Neurosci Lett*. 1997;232(1):57-61.
168. Cajochen C, Krauchi K, Danilenko KV, Wirz-Justice A. Evening administration of melatonin and bright light: interactions on the EEG during sleep and wakefulness. *J Sleep Res*. 1998;7(3):145-57.
169. Redman JR. Circadian entrainment and phase shifting in mammals with melatonin. *J Biol Rhythms*. 1997;12(6):581-7.
170. Lockley SW, Skene DJ, James K, Thapan K, Wright J, Arendt J. Melatonin administration can entrain the free-running circadian system of blind subjects. *J Endocrinol*. 2000;164(1):R1-6.
171. Sack RL, Brandes RW, Kendall AR, Lewy AJ. Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med*. 2000;343(15):1070-7.
172. Radziuk J, McDonald TJ, Rubenstein D, Dupre J. Initial splanchnic extraction of ingested glucose in normal man. *Metabolism*. 1978;27(6):657-69.
173. Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Dose-response characteristics for effects of insulin on production and utilization of glucose in man. *Am J Physiol*. 1981;240(6):E630-9.
174. Willemsen G, Ward KJ, Bell CG, Christensen K, Bowden J, Dalgard C, et al. The Concordance and Heritability of Type 2 Diabetes in 34,166 Twin Pairs From International Twin Registers: The Discordant Twin (DISCOTWIN) Consortium. *Twin Res Hum Genet*. 2015;18(6):762-71.
175. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton KJ, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*. 2016;536(7614):41-7.
176. Borai A, Livingstone C, Ferns GA. The biochemical assessment of insulin resistance. *Ann Clin Biochem*. 2007;44(Pt 4):324-42.
177. Parhon CI. *Congrès d'Endocrinologie de Bucarest*. 1939;vol. I, 187.
178. Parhon CIP, I.; Felix, E.; Boeru, V. Influenta epifisectomiei si a administrarii de extract epifisar asupra unor data metabolice privind mineralele (Ca, K, P, Si, Mg), lipidele, protidele si glucidele, la sobolanul alb adult. *Stud Cercet Endocr*. 1952;3, 321-329.
179. Milcou IN, L.; Marcean, R. De l'existence d'une hormone hypoglycémianté épiphysaire synergique de l'insuline. *Ann Endocrinol*. 1957;18, 612-620.

180. Milcu SM. Role de l'épiphyse dans le métabolisme glucidique . . J Annu Diabetol Dieu. 1968;9, 163–180.
181. Milcu SMM, I. Über ein hypoglykämisch wirkendes Hormon in der Zirbeldrüse. Medizinische. 1958;17, 711–715.
182. Milcu IN, L.; Marcean, R.; Sitaru, S. L'action de l'extrait pinéal et de la pinéalectomie sur le glycogène hépatique et musculaire après infusion prolongée de glucose. Stud Cercet Endocr 1963;14, 651–655.
183. Milcu SMM, I.; Nanu, L. . Le role de la glande pinéale dans le métabolisme des glucides. Ann Endocrinol. 1963;24, 233–254.
184. Lerner ABC, J.D.; Takahashi, Y.; Lee, T.H.; Mori, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J Am Chem Soc 1958;80, 2587.
185. Milcu I, Nanu L, Marcean R, Sitaru S. [Research on the Diabetogenic Effects of Epiphysectomy in the Lamb]. Stud Cercet Endocrinol. 1964;15:507-13.
186. Milcu SMN-I, L.; Milcu, I. The Effect of Pinealectomy on Plasma Insulin in Rats. GEW Wolstenholme, J Knight (Eds), The Pineal Gland, Churchill Livingstone, London. 1971;pp. 345–357.
187. Diaz B, Blazquez E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. Horm Metab Res. 1986;18(4):225-9.
188. Mellado MCR, M.V.; Diaz, B.; de Diego, J.G.; Alvarez, E.; Blázquez, E. . Role of the Pineal Gland in the Normal Maintenance of Circulating Levels and of Liver Receptor Concentrations of Insulin and Glucagon in the Rat. In Proceedings of the Workshop on the Pineal Gland, Salamanca, Spain. 26–28 May 1986;pp. 52–56.
189. Rodriguez V, Mellado C, Alvarez E, De Diego JG, Blazquez E. Effect of pinealectomy on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. J Pineal Res. 1989;6(1):77-88.
190. Munoz Barragán LLG, J.A.; Toranzo, D.; Blázquez, J.L.; Pizarro, M.D.L.; Pastor, F.E.; Mosqueira, M.I. The Pineal Gland: A Neuroendocrine “Crossroad”. In Proceedings of the Workshop on the Pineal Gland, Salamanca, Spain. 26–28 May 1986;pp. 57–61.
191. Munoz Barragán LT, D.; Blázquez, E.; Ghigliione, M.; Pastor, F.E. Role of the pineal gland on insulin and glucagon release of control and diabetic rats. Diabetes. 1983;32, 141A.
192. Munoz Barragán LT, D.; Blázquez, E.; Pastor, F.E.; Mosqueira, M.I.; López, J.A.; Blázquez, J.J. A radio-immunoanalytical and immunocytochemical study on A and B insular cells in response to pinealectomy or pineal denervation. Diabetologia. 1984;27, 313A.
193. de Lima LM, dos Reis LC, de Lima MA. Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. Braz J Biol. 2001;61(2):333-40.
194. Quay WB, Gorray KC. Pineal effects on metabolism and glucose homeostasis: evidence for lines of humoral mediation of pineal influences on tumor growth. J Neural Transm. 1980;47(2):107-20.
195. Conti A, Maestroni GJ. Melatonin rhythms in mice: role in autoimmune and lymphoproliferative diseases. Ann N Y Acad Sci. 1998;840:395-410.
196. Conti A, Maestroni GJ. Role of the pineal gland and melatonin in the development of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. J Pineal Res. 1996;20(3):164-72.
197. Benson B, Miller CW, Sorrentino S, Jr. Effects of blinding on blood glucose and serum insulin-like activity in rats. Tex Rep Biol Med. 1971;29(4):513-25.
198. Burns JK. Serum sodium and potassium and blood glucose levels in cynomolgus monkeys after administration of melatonin. J Physiol. 1973;232(2):84P-5P.
199. Csaba G, Barath P. Are Langerhan's islets influenced by the pineal body? Experientia. 1971;27(8):962.

200. Dhar M, Dayal SS, Ramesh Babu CS, Arora SR. Effect of melatonin on glucose tolerance and blood glucose circadian rhythm in rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1983;27(2):109-17.
201. Cagnacci A, Arangino S, Renzi A, Paoletti AM, Melis GB, Cagnacci P, et al. Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;54(3):339-46.
202. Champney TH, Steger RW, Christie DS, Reiter RJ. Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res.* 1985;338(1):25-32.
203. Champney TH, Brainard GC, Richardson BA, Reiter RJ. Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1983;76(1):199-201.
204. Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 1):E246-52.
205. Champney TH, Holtorf AP, Craft CM, Reiter RJ. Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1986;83(2):391-5.
206. John TM, Viswanathan M, George JC, Scanes CG. Influence of chronic melatonin implantation on circulating levels of catecholamines, growth hormone, thyroid hormones, glucose, and free fatty acids in the pigeon. *Gen Comp Endocrinol.* 1990;79(2):226-32.
207. Lynch HJ, Hsuan M, Wurtman RJ. Sympathetic neural control of indoleamine metabolism in the rat pineal gland. *Adv Exp Med Biol.* 1975;54:93-114.
208. Tannenbaum MG, Reiter RJ, Vaughan MK, Troiani ME, Gonzalez-Brito A. Adrenalectomy prevents changes in rat pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity induced by acute insulin stress. *J Pineal Res.* 1987;4(4):395-402.
209. Mahata SK, Mandal A, Ghosh A. Influence of age and splanchnic nerve on the action of melatonin in the adrenomedullary catecholamine content and blood glucose level in the avian group. *J Comp Physiol B.* 1988;158(5):601-7.
210. Mahata SK. Effect of insulin on serotonin, 5-hydroxyindole-acetic acid, norepinephrine, epinephrine and corticosterone contents in chick. *Neurosci Lett.* 1991;121(1-2):115-8.
211. Maitra SK, Dey M, Dutta S, Bhattacharya S, Dey R, Sengupta A. Influences of graded dose of melatonin on the levels of blood glucose and adrenal catecholamines in male roseringed parakeets (*Psittacula krameri*) under different photoperiods. *Arch Physiol Biochem.* 2000;108(5):444-50.
212. Maitra SK, Dey M, Dey R, Bhattacharya S, Sengupta A. Influence of photoperiods on glycemic and adrenal catecholaminergic responses to melatonin administrations in adult male roseringed parakeets, *Psittacula krameri* Neumann. *Indian J Exp Biol.* 2000;38(11):1111-6.
213. Bonnefond A, Clement N, Fawcett K, Yengo L, Vaillant E, Guillaume JL, et al. Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2012;44(3):297-301.
214. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med.* 2001;58(11):747-52.
215. Ha E, Yim SV, Chung JH, Yoon KS, Kang I, Cho YH, et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J Pineal Res.* 2006;41(1):67-72.

216. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4453-8.
217. Knutson KL, Ryden AM, Mander BA, Van Cauter E. Role of sleep duration and quality in the risk and severity of type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2006;166(16):1768-74.
218. Wu YH, Zhou JN, Van Heerikhuize J, Jockers R, Swaab DF. Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28(8):1239-47.
219. Wu YH, Ursinus J, Zhou JN, Scheer FA, Ai-Min B, Jockers R, et al. Alterations of melatonin receptors MT1 and MT2 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus during depression. *J Affect Disord*. 2013;148(2-3):357-67.
220. Savaskan E, Olivieri G, Meier F, Brydon L, Jockers R, Ravid R, et al. Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J Pineal Res*. 2002;32(1):59-62.
221. Zhou JN, Liu RY, Kamphorst W, Hofman MA, Swaab DF. Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. *J Pineal Res*. 2003;35(2):125-30.
222. Comai S, Ochoa-Sanchez R, Dominguez-Lopez S, Bambico FR, Gobbi G. Melancholic-Like behaviors and circadian neurobiological abnormalities in melatonin MT1 receptor knockout mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18(3).
223. Weil ZM, Hotchkiss AK, Gatién ML, Pieke-Dahl S, Nelson RJ. Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like behaviors and deficits in sensorimotor gating. *Brain Res Bull*. 2006;68(6):425-9.
224. Escribano BM, Colin-Gonzalez AL, Santamaria A, Tunez I. The role of melatonin in multiple sclerosis, Huntington's disease and cerebral ischemia. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(6):1096-119.
225. Pinato L, da Silveira Cruz-Machado S, Franco DG, Campos LM, Cecon E, Fernandes PA, et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Struct Funct*. 2015;220(2):827-40.
226. Tchekalarova J, Nenchovska Z, Atanasova D, Atanasova M, Kortenska L, Stefanova M, et al. Consequences of long-term treatment with agomelatine on depressive-like behavior and neurobiological abnormalities in pinealectomized rats. *Behav Brain Res*. 2016;302:11-28.
227. O'Neal-Moffitt G, Pilli J, Kumar SS, Olcese J. Genetic deletion of MT(1)/MT(2) melatonin receptors enhances murine cognitive and motor performance. *Neuroscience*. 2014;277:506-21.
228. Wang LM, Suthana NA, Chaudhury D, Weaver DR, Colwell CS. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci*. 2005;22(9):2231-7.
229. Larson J, Jessen RE, Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, et al. Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neurosci Lett*. 2006;393(1):23-6.
230. Comai S, Gobbi G. Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. *J Psychiatry Neurosci*. 2014;39(1):6-21.
231. Medeiros CA, Carvalhede Bruin PF, Lopes LA, Magalhaes MC, de Lourdes Seabra M, de Bruin VM. Effect of exogenous melatonin on sleep and motor dysfunction in Parkinson's disease. A randomized, double blind, placebo-controlled study. *J Neurol*. 2007;254(4):459-64.

232. Naskar A, Prabhakar V, Singh R, Dutta D, Mohanakumar KP. Melatonin enhances L-DOPA therapeutic effects, helps to reduce its dose, and protects dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. *J Pineal Res.* 2015;58(3):262-74.
233. Joshi N, Biswas J, Nath C, Singh S. Promising Role of Melatonin as Neuroprotectant in Neurodegenerative Pathology. *Mol Neurobiol.* 2015;52(1):330-40.
234. Wade AG, Farmer M, Harari G, Fund N, Laudon M, Nir T, et al. Add-on prolonged-release melatonin for cognitive function and sleep in mild to moderate Alzheimer's disease: a 6-month, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Clin Interv Aging.* 2014;9:947-61.
235. Jin KL, Shiotani Y, Kawai Y, Kiyama H. Immunohistochemical demonstration of tyrosine hydroxylase (TH)-positive but dopamine beta-hydroxylase (DBH)-negative neuron-like cells in the pineal gland of golden hamsters. *Neurosci Lett.* 1988;93(1):28-31.
236. Fujiwara M, Inagaki C, Miwa S, Takaori S, Saeki Y, Nozaki M. Diurnal variation of dopamine content in the rat pineal gland. *Life Sci.* 1980;26(1):71-8.
237. Govitrapong P, Hama Y, Pfeiffer R, Ebadi M. Status of dopamine in bovine pineal glands and the stimulation of N-acetyltransferase activity by D2-dopaminergic receptor agonists in the rat pineal glands in culture. *J Pineal Res.* 1989;6(1):17-31.
238. Miguez JM, Recio J, Vivien-Roels B, Pevet P. Daily variation in the content of indoleamines, catecholamines and related compounds in the pineal gland of Syrian hamsters kept under long and short photoperiods. *J Pineal Res.* 1995;19(3):139-48.
239. Miguez JM, Recio J, Vivien-Roels B, Pevet P. Diurnal changes in the content of indoleamines, catecholamines, and methoxyindoles in the pineal gland of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): effect of photoperiod. *J Pineal Res.* 1996;21(1):7-14.
240. Simonneaux V, Murrin LC, Ebadi M. Characterization of D1 dopamine receptors in the bovine pineal gland with [³H]SCH 23390. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253(1):214-20.
241. Govitrapong P, Murrin LC, Ebadi M. Characterization of dopaminergic receptor sites in bovine pineal gland. *J Pineal Res.* 1984;1(3):215-26.
242. Axelrod J, Shein HM, Wurtman RJ. Stimulation of C¹⁴-melatonin synthesis from C¹⁴-tryptophan by noradrenaline in rat pineal in organ culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;62(2):544-9.
243. Zisapel N, Egozi Y, Laudon M. Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res.* 1982;246(1):161-3.
244. Richardson SB, Hollander CS, Prasad JA, Hirooka Y. Somatostatin release from rat hypothalamus in vitro: effects of melatonin and serotonin. *Endocrinology.* 1981;109(2):602-6.
245. Glass JD, Lynch GR. Melatonin: identification of sites of antigonadal action in mouse brain. *Science.* 1981;214(4522):821-3.
246. Goldman B, Hall V, Hollister C, Roychoudhury P, Tamarkin L, Westrom W. Effects of melatonin on the reproductive system in intact and pinealectomized male hamster maintained under various photoperiods. *Endocrinology.* 1979;104(1):82-8.
247. Fertl E, Auff E, Doppelbauer A, Waldhauser F. Circadian secretion pattern of melatonin in de novo parkinsonian patients: evidence for phase-shifting properties of l-dopa. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1993;5(3):227-34.
248. Ishibashi K, Oda K, Ishiwata K, Ishii K. Comparison of dopamine transporter decline in a patient with Parkinson's disease and normal aging effect. *J Neurol Sci.* 2014;339(1-2):207-9.

249. Uguz AC, Demirci K, Espino J. The Importance of Melatonin and Mitochondria Interaction in Mood Disorders and Schizophrenia: A Current Assessment. *Curr Med Chem.* 2016;23(20):2146-58.
250. Fusar-Poli P, Meyer-Lindenberg A. Striatal presynaptic dopamine in schizophrenia, Part I: meta-analysis of dopamine active transporter (DAT) density. *Schizophr Bull.* 2013;39(1):22-32.
251. Fusar-Poli P, Meyer-Lindenberg A. Striatal presynaptic dopamine in schizophrenia, part II: meta-analysis of [(18)F/(11)C]-DOPA PET studies. *Schizophr Bull.* 2013;39(1):33-42.
252. Bendz LM, Scates AC. Melatonin treatment for insomnia in pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Ann Pharmacother.* 2010;44(1):185-91.
253. Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* 1999;354(9196):2132-3.
254. D'Haenen H A, Bossuyt A. Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry.* 1994;35(2):128-32.
255. Laatikainen LM, Sharp T, Harrison PJ, Tunbridge EM. Sexually dimorphic effects of catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibition on dopamine metabolism in multiple brain regions. *PLoS One.* 2013;8(4):e61839.
256. Rashid AJ, O'Dowd BF, Verma V, George SR. Neuronal Gq/11-coupled dopamine receptors: an uncharted role for dopamine. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(11):551-5.
257. Perreault ML, O'Dowd BF, George SR. Dopamine receptor homooligomers and heterooligomers in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther.* 2011;17(1):52-7.
258. Keabian JW. Multiple classes of dopamine receptors in mammalian central nervous system: the involvement of dopamine-sensitive adenylyl cyclase. *Life Sci.* 1978;23(5):479-83.
259. Spano PF, Govoni S, Trabucchi M. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1978;19:155-65.
260. Massey SC, Redburn DA. Transmitter circuits in the vertebrate retina. *Prog Neurobiol.* 1987;28(1):55-96.
261. Djamgoz MB, Wagner HJ. Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem Int.* 1992;20(2):139-91.
262. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol.* 2004;108(1):17-40.
263. Nguyen-Legros J, Chanut E, Versaux-Botteri C, Simon A, Trouvin JH. Dopamine inhibits melatonin synthesis in photoreceptor cells through a D2-like receptor subtype in the rat retina: biochemical and histochemical evidence. *J Neurochem.* 1996;67(6):2514-20.
264. Harnois C, Di Paolo T. Decreased dopamine in the retinas of patients with Parkinson's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(11):2473-5.
265. Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev.* 2007;56(1):27-78.
266. Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res.* 2002;137(1-2):75-114.
267. Uhart M, Wand GS. Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research. *Addict Biol.* 2009;14(1):43-64.
268. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):331-49.

269. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998;78(1):189-225.
270. Rosati G, Maioli M, Aiello I, Farris A, Agnetti V. Effects of long-term L-dopa therapy on carbohydrate metabolism in patients with Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 1976;14(3):229-39.
271. Ericson LE, Hakanson R, Lundquist I. Accumulation of dopamine in mouse pancreatic B-cells following injection of L-DOPA. Localization to secretory granules and inhibition of insulin secretion. *Diabetologia.* 1977;13(2):117-24.
272. Zern RT, Bird JL, Feldman JM. Effect of increased pancreatic islet norepinephrine, dopamine and serotonin concentration on insulin secretion in the golden hamster. *Diabetologia.* 1980;18(4):341-6.
273. Arneric SP, Long JP, Williams M, Goodale DB, Mott J, Lakoski JM, et al. RDS-127 (2-di-n-propylamino-4,7-dimethoxyindane): central effects of a new dopamine receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983;224(1):161-70.
274. Ahren B, Lundquist I. Effects of L-dopa-induced dopamine accumulation on 45Ca^{2+} efflux and insulin secretion in isolated rat islets. *Pharmacology.* 1985;30(2):71-82.
275. Shankar E, Santhosh KT, Paulose CS. Dopaminergic regulation of glucose-induced insulin secretion through dopamine D2 receptors in the pancreatic islets in vitro. *IUBMB Life.* 2006;58(3):157-63.
276. Borelli MI, Gagliardino JJ. Possible modulatory effect of endogenous islet catecholamines on insulin secretion. *BMC Endocr Disord.* 2001;1(1):1.
277. Borelli MI, Rubio M, Garcia ME, Flores LE, Gagliardino JJ. Tyrosine hydroxylase activity in the endocrine pancreas: changes induced by short-term dietary manipulation. *BMC Endocr Disord.* 2003;3(1):2.
278. Raffo A, Hancock K, Polito T, Xie Y, Andan G, Witkowski P, et al. Role of vesicular monoamine transporter type 2 in rodent insulin secretion and glucose metabolism revealed by its specific antagonist tetrabenazine. *J Endocrinol.* 2008;198(1):41-9.
279. Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, et al. VMAT2 identified as a regulator of late-stage beta-cell differentiation. *Nat Chem Biol.* 2014;10(2):141-8.
280. Rubi B, Ljubicic S, Pournourmohammadi S, Carobbio S, Armanet M, Bartley C, et al. Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin secretion. *J Biol Chem.* 2005;280(44):36824-32.
281. Ustione A, Piston DW. Dopamine synthesis and D3 receptor activation in pancreatic beta-cells regulates insulin secretion and intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations. *Mol Endocrinol.* 2012;26(11):1928-40.
282. Garcia-Tornadu I, Ornstein AM, Chamson-Reig A, Wheeler MB, Hill DJ, Arany E, et al. Disruption of the dopamine d2 receptor impairs insulin secretion and causes glucose intolerance. *Endocrinology.* 2010;151(4):1441-50.
283. Garcia-Tornadu I, Perez-Millan MI, Recouvreux V, Ramirez MC, Luque G, Risso GS, et al. New insights into the endocrine and metabolic roles of dopamine D2 receptors gained from the *Drd2* mouse. *Neuroendocrinology.* 2010;92(4):207-14.
284. Chen Y, Hong F, Chen H, Fan RF, Zhang XL, Zhang Y, et al. Distinctive expression and cellular distribution of dopamine receptors in the pancreatic islets of rats. *Cell Tissue Res.* 2014;357(3):597-606.
285. Buttarelli FR, Fanciulli A, Pellicano C, Pontieri FE. The dopaminergic system in peripheral blood lymphocytes: from physiology to pharmacology and potential applications to neuropsychiatric disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2011;9(2):278-88.

286. Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun*. 2010;24(4):525-8.
287. Aperia AC. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:621-47.
288. Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiol Genomics*. 2004;19(3):233-46.
289. Amara SG, Sonders MS. Neurotransmitter transporters as molecular targets for addictive drugs. *Drug Alcohol Depend*. 1998;51(1-2):87-96.
290. Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(1):13-25.
291. Manepalli S, Surratt CK, Madura JD, Nolan TL. Monoamine transporter structure, function, dynamics, and drug discovery: a computational perspective. *AAPS J*. 2012;14(4):820-31.
292. Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):197-219.
293. German CL, Baladi MG, McFadden LM, Hanson GR, Fleckenstein AE. Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacol Rev*. 2015;67(4):1005-24.
294. Schmitt KC, Reith ME. Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1187:316-40.
295. Ramamoorthy S, Shippenberg TS, Jayanthi LD. Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation. *Pharmacol Ther*. 2011;129(2):220-38.
296. Guptaroy B, Fraser R, Desai A, Zhang M, Gnegy ME. Site-directed mutations near transmembrane domain 1 alter conformation and function of norepinephrine and dopamine transporters. *Mol Pharmacol*. 2011;79(3):520-32.
297. Guptaroy B, Zhang M, Bowton E, Binda F, Shi L, Weinstein H, et al. A juxtamembrane mutation in the N terminus of the dopamine transporter induces preference for an inward-facing conformation. *Mol Pharmacol*. 2009;75(3):514-24.
298. Sucic S, Dallinger S, Zdrzil B, Weissensteiner R, Jorgensen TN, Holy M, et al. The N terminus of monoamine transporters is a lever required for the action of amphetamines. *J Biol Chem*. 2010;285(14):10924-38.
299. Foster JD, Pananusorn B, Vaughan RA. Dopamine transporters are phosphorylated on N-terminal serines in rat striatum. *J Biol Chem*. 2002;277(28):25178-86.
300. Cervinski MA, Foster JD, Vaughan RA. Psychoactive substrates stimulate dopamine transporter phosphorylation and down-regulation by cocaine-sensitive and protein kinase C-dependent mechanisms. *J Biol Chem*. 2005;280(49):40442-9.
301. Foster JD, Vaughan RA. Palmitoylation controls dopamine transporter kinetics, degradation, and protein kinase C-dependent regulation. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5175-86.
302. Fog JU, Khoshbouei H, Holy M, Owens WA, Vaegter CB, Sen N, et al. Calmodulin kinase II interacts with the dopamine transporter C terminus to regulate amphetamine-induced reverse transport. *Neuron*. 2006;51(4):417-29.
303. Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB. Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J*. 2001;15(6):916-26.
304. Mszczynska A, Saleh J, Zhang H, Vukusic B, Lee FJ, Liu F. Parkin disrupts the alpha-synuclein/dopamine transporter interaction: consequences toward dopamine-induced toxicity. *J Mol Neurosci*. 2007;32(3):217-27.

305. Horn AS. Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. *Prog Neurobiol.* 1990;34(5):387-400.
306. Giros B, Caron MG. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14(2):43-9.
307. Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem.* 1993;218(1):1-27.
308. Kukuruzinska MA, Lennon K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):415-48.
309. Torres GE, Carneiro A, Seamans K, Fiorentini C, Sweeney A, Yao WD, et al. Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2731-9.
310. Li LB, Chen N, Ramamoorthy S, Chi L, Cui XN, Wang LC, et al. The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J Biol Chem.* 2004;279(20):21012-20.
311. Tejeda HA, Shippenberg TS, Henriksson R. The dynorphin/kappa-opioid receptor system and its role in psychiatric disorders. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(6):857-96.
312. Lee FJ, Pei L, Moszczynska A, Vukusic B, Fletcher PJ, Liu F. Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *EMBO J.* 2007;26(8):2127-36.
313. Garcia-Olivares J, Torres-Salazar D, Owens WA, Baust T, Siderovski DP, Amara SG, et al. Inhibition of dopamine transporter activity by G protein betagamma subunits. *PLoS One.* 2013;8(3):e59788.
314. Caudle WM, Richardson JR, Wang MZ, Taylor TN, Guillot TS, McCormack AL, et al. Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *J Neurosci.* 2007;27(30):8138-48.
315. Chen MK, Kuwabara H, Zhou Y, Adams RJ, Brasic JR, McGlothan JL, et al. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2008;105(1):78-90.
316. Masoud ST, Vecchio LM, Bergeron Y, Hossain MM, Nguyen LT, Bermejo MK, et al. Increased expression of the dopamine transporter leads to loss of dopamine neurons, oxidative stress and l-DOPA reversible motor deficits. *Neurobiol Dis.* 2015;74:66-75.
317. Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, et al. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron.* 2009;62(2):218-29.
318. Goldstein DS, Sullivan P, Holmes C, Miller GW, Alter S, Strong R, et al. Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2013;126(5):591-603.
319. Rees JN, Florang VR, Eckert LL, Doorn JA. Protein reactivity of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, a toxic dopamine metabolite, is dependent on both the aldehyde and the catechol. *Chem Res Toxicol.* 2009;22(7):1256-63.
320. Kristal BS, Conway AD, Brown AM, Jain JC, Ulluci PA, Li SW, et al. Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(8):924-31.
321. Mattammal MB, Haring JH, Chung HD, Raghu G, Strong R. An endogenous dopaminergic neurotoxin: implication for Parkinson's disease. *Neurodegeneration.* 1995;4(3):271-81.
322. Wey MC, Fernandez E, Martinez PA, Sullivan P, Goldstein DS, Strong R. Neurodegeneration and motor dysfunction in mice lacking cytosolic and mitochondrial

aldehyde dehydrogenases: implications for Parkinson's disease. *PLoS One*. 2012;7(2):e31522.

323. Goldstein DS, Sullivan P, Holmes C, Kopin IJ, Basile MJ, Mash DC. Catechols in post-mortem brain of patients with Parkinson disease. *Eur J Neurol*. 2011;18(5):703-10.

324. Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol*. 1978;14(4):633-43.

325. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S-8.

326. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(4):368-76.

327. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.

328. Gowrishankar R, Hahn MK, Blakely RD. Good riddance to dopamine: roles for the dopamine transporter in synaptic function and dopamine-associated brain disorders. *Neurochem Int*. 2014;73:42-8.

329. Cook EH, Jr., Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, et al. Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet*. 1995;56(4):993-8.

330. Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M. Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry*. 1997;2(4):311-3.

331. Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY. A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B(4):541-50.

332. Michelhaugh SK, Fiskerstrand C, Lovejoy E, Bannon MJ, Quinn JP. The dopamine transporter gene (SLC6A3) variable number of tandem repeats domain enhances transcription in dopamine neurons. *J Neurochem*. 2001;79(5):1033-8.

333. Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I. Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet*. 2002;114(8):975-9.

334. Mazei-Robison MS, Bowton E, Holy M, Schmudermaier M, Freissmuth M, Sitte HH, et al. Anomalous dopamine release associated with a human dopamine transporter coding variant. *J Neurosci*. 2008;28(28):7040-6.

335. Mergy MA, Gowrishankar R, Gresch PJ, Gantz SC, Williams J, Davis GL, et al. The rare DAT coding variant Val559 perturbs DA neuron function, changes behavior, and alters in vivo responses to psychostimulants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(44):E4779-88.

336. Sakrikar D, Mazei-Robison MS, Mergy MA, Richtand NW, Han Q, Hamilton PJ, et al. Attention deficit/hyperactivity disorder-derived coding variation in the dopamine transporter disrupts microdomain targeting and trafficking regulation. *J Neurosci*. 2012;32(16):5385-97.

337. Sagvolden T, Johansen EB, Aase H, Russell VA. A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sci*. 2005;28(3):397-419; discussion -68.

338. Volkow ND, Wang GJ, Newcorn JH, Kollins SH, Wigal TL, Telang F, et al. Motivation deficit in ADHD is associated with dysfunction of the dopamine reward pathway. *Mol Psychiatry*. 2011;16(11):1147-54.

339. Eshel N, Tian J, Bukwich M, Uchida N. Dopamine neurons share common response function for reward prediction error. *Nat Neurosci*. 2016;19(3):479-86.

340. Wise RA. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res.* 2008;14(2-3):169-83.
341. Pandit R, Omrani A, Luijendijk MC, de Vrind VA, Van Rozen AJ, Ophuis RJ, et al. Melanocortin 3 Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Increases the Motivation for Food Reward. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41(9):2241-51.
342. Chang CH, Grace AA. Amygdala-ventral pallidum pathway decreases dopamine activity after chronic mild stress in rats. *Biol Psychiatry.* 2014;76(3):223-30.
343. Koob GF, Stinus L, Le Moal M, Bloom FE. Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neurosci Biobehav Rev.* 1989;13(2-3):135-40.
344. Koob GF, Le Moal M. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363(1507):3113-23.
345. Belujon P, Jakobowski NL, Dollish HK, Grace AA. Withdrawal from Acute Amphetamine Induces an Amygdala-Driven Attenuation of Dopamine Neuron Activity: Reversal by Ketamine. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41(2):619-27.
346. Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature.* 2013;493(7433):537-41.
347. Friedman AK, Walsh JJ, Juarez B, Ku SM, Chaudhury D, Wang J, et al. Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. *Science.* 2014;344(6181):313-9.
348. Miller GW, Gainetdinov RR, Levey AI, Caron MG. Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20(10):424-9.
349. Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science.* 1987;237(4819):1219-23.
350. Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, et al. The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat Neurosci.* 2008;11(7):780-9.
351. Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol.* 2005;75(6):406-33.
352. Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci.* 1995;15(5 Pt 2):4102-8.
353. Donovan DM, Miner LL, Perry MP, Revay RS, Sharpe LG, Przedborski S, et al. Cocaine reward and MPTP toxicity: alteration by regional variant dopamine transporter overexpression. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;73(1-2):37-49.
354. Howell LL, Kimmel HL. Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(1):196-217.
355. Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A. Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(7):375-83.
356. Learned-Coughlin SM, Bergstrom M, Savitcheva I, Ascher J, Schmith VD, Langstrom B. In vivo activity of bupropion at the human dopamine transporter as measured by positron emission tomography. *Biol Psychiatry.* 2003;54(8):800-5.
357. Volkow ND, Fowler JS, Logan J, Alexoff D, Zhu W, Telang F, et al. Effects of modafinil on dopamine and dopamine transporters in the male human brain: clinical implications. *JAMA.* 2009;301(11):1148-54.

358. Korpi ER, den Hollander B, Farooq U, Vashchinkina E, Rajkumar R, Nutt DJ, et al. Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol Rev.* 2015;67(4):872-1004.
359. Ward LD, Kellis M. Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nat Biotechnol.* 2012;30(11):1095-106.
360. MacArthur DG, Balasubramanian S, Frankish A, Huang N, Morris J, Walter K, et al. A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science.* 2012;335(6070):823-8.
361. Nelson MR, Wegmann D, Ehm MG, Kessner D, St Jean P, Verzilli C, et al. An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. *Science.* 2012;337(6090):100-4.
362. Cooper GM, Shendure J. Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat Rev Genet.* 2011;12(9):628-40.
363. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet.* 2012;90(1):7-24.
364. Rohland N, Reich D. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Res.* 2012;22(5):939-46.
365. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061-73.
366. DePristo MA, Weinreich DM, Hartl DL. Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution. *Nat Rev Genet.* 2005;6(9):678-87.
367. Sanders CR, Myers JK. Disease-related misassembly of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2004;33:25-51.
368. Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, et al. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11406-11.
369. Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, et al. Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 2006;281(16):10856-64.
370. Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Lam CM, Dewire SM, et al. Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Mol Pharmacol.* 2011;80(3):367-77.
371. Lei S, Clydesdale L, Dai A, Cai X, Feng Y, Yang D, et al. Two distinct domains of the glucagon-like peptide-1 receptor control peptide-mediated biased agonism. *J Biol Chem.* 2018;293(24):9370-87.
372. Karamitri A, Plouffe B, Bonnefond A, Chen M, Gallion J, Guillaume JL, et al. Type 2 diabetes-associated variants of the MT2 melatonin receptor affect distinct modes of signaling. *Sci Signal.* 2018;11(545).
373. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 1993;49(8):654-64.
374. Zawilska J, Nowak JZ. Regulation of melatonin biosynthesis in vertebrate retina: involvement of dopamine in the suppressive effects of light. *Folia Histochem Cytobiol.* 1991;29(1):3-13.
375. Djeridane Y, Touitou Y. Melatonin synthesis in the rat harderian gland: age- and time-related effects. *Exp Eye Res.* 2001;72(4):487-92.

376. Benleulmi-Chaachoua A, Hegron A, Le Boulch M, Karamitri A, Wierzbicka M, Wong V, et al. Melatonin receptors limit dopamine reuptake by regulating dopamine transporter cell-surface exposure. *Cell Mol Life Sci*. 2018.
377. Bubenik GA, Brown GM, Grota LJ. Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia*. 1977;33(5):662-3.
378. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*. 1996;61(2):65-8.
379. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev*. 1980;1(2):109-31.
380. Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*. 1983;219(4588):1089-91.
381. Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL, Goldman BD. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res*. 1993;15(4):161-90.
382. Slotten HA, Pitrosky B, Pevet P. Influence of the mode of daily melatonin administration on entrainment of rat circadian rhythms. *J Biol Rhythms*. 1999;14(5):347-53.
383. Wyatt JK, Dijk DJ, Ritz-de Cecco A, Ronda JM, Czeisler CA. Sleep-facilitating effect of exogenous melatonin in healthy young men and women is circadian-phase dependent. *Sleep*. 2006;29(5):609-18.
384. Muhlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E. Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol*. 2009;606(1-3):61-71.
385. Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, et al. Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem*. 2007;282(40):29089-100.
386. Armando S, Quoyer J, Lukashova V, Maiga A, Percherancier Y, Heveker N, et al. The chemokine CXC4 and CC2 receptors form homo- and heterooligomers that can engage their signaling G-protein effectors and betaarrestin. *FASEB J*. 2014;28(10):4509-23.
387. Yoon Namkung CL, Sahil Kumar, Yubo Cao, Larissa B. Teixeira, Viktoria Lukashova, Sarah C. Simões⁴ Jean-Michel Longpré, Dominic Devost, Terry E. Hébert, Graciela Piñeyro, Richard Leduc, Claudio M. Costa-Neto, Michel Bouvier* and Stéphane A. Laporte*. Functional selectivity profiling of the Angiotensin II type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors. *Science Signaling*. in press.
388. Katsonis P, Lichtarge O. A formal perturbation equation between genotype and phenotype determines the Evolutionary Action of protein-coding variations on fitness. *Genome Res*. 2014;24(12):2050-8.
389. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(3):205-16.
390. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(3):193-203.
391. Schonegge AM, Gallion J, Picard LP, Wilkins AD, Le Gouill C, Audet M, et al. Evolutionary action and structural basis of the allosteric switch controlling beta2AR functional selectivity. *Nat Commun*. 2017;8(1):2169.
392. Yin J, Mobarec JC, Kolb P, Rosenbaum DM. Crystal structure of the human OX2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant. *Nature*. 2015;519(7542):247-50.

393. Koehl A, Hu H, Maeda S, Zhang Y, Qu Q, Paggi JM, et al. Structure of the micro-opioid receptor-Gi protein complex. *Nature*. 2018;558(7711):547-52.
394. Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, et al. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science*. 2010;330(6007):1091-5.
395. Lebon G, Warne T, Edwards PC, Bennett K, Langmead CJ, Leslie AG, et al. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature*. 2011;474(7352):521-5.
396. Isberg V, de Graaf C, Bortolato A, Cherezov V, Katritch V, Marshall FH, et al. Generic GPCR residue numbers - aligning topology maps while minding the gaps. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(1):22-31.
397. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605-12.
398. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci*. 2016;86:2 9 1-2 9 37.
399. Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(9):778-86.
400. Namkung Y, Le Guill C, Lukashova V, Kobayashi H, Hogue M, Khoury E, et al. Monitoring G protein-coupled receptor and beta-arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. *Nat Commun*. 2016;7:12178.
401. Ahmed R, Mahavadi S, Al-Shboul O, Bhattacharya S, Grider JR, Murthy KS. Characterization of signaling pathways coupled to melatonin receptors in gastrointestinal smooth muscle. *Regul Pept*. 2013;184:96-103.
402. Giannone F, Malpeli G, Lisi V, Grasso S, Shukla P, Ramarli D, et al. The puzzling uniqueness of the heterotrimeric G15 protein and its potential beyond hematopoiesis. *J Mol Endocrinol*. 2010;44(5):259-69.
403. Milligan G, Marshall F, Rees S. G16 as a universal G protein adapter: implications for agonist screening strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17(7):235-7.
404. Pala D, Lodola A, Bedini A, Spadoni G, Rivara S. Homology models of melatonin receptors: challenges and recent advances. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):8093-121.
405. Feierler J, Wirth M, Welte B, Schussler S, Jochum M, Faussner A. Helix 8 plays a crucial role in bradykinin B(2) receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem*. 2011;286(50):43282-93.
406. Charest PG, Bouvier M. Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem*. 2003;278(42):41541-51.
407. Sato T, Kawasaki T, Mine S, Matsumura H. Functional Role of the C-Terminal Amphipathic Helix 8 of Olfactory Receptors and Other G Protein-Coupled Receptors. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11).
408. Marion S, Oakley RH, Kim KM, Caron MG, Barak LS. A beta-arrestin binding determinant common to the second intracellular loops of rhodopsin family G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 2006;281(5):2932-8.
409. Raman D, Osawa S, Gurevich VV, Weiss ER. The interaction with the cytoplasmic loops of rhodopsin plays a crucial role in arrestin activation and binding. *J Neurochem*. 2003;84(5):1040-50.

410. Dror RO, Arlow DH, Borhani DW, Jensen MO, Piana S, Shaw DE. Identification of two distinct inactive conformations of the beta2-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(12):4689-94.
411. Clement N, Renault N, Guillaume JL, Cecon E, Journe AS, Laurent X, et al. Importance of the second extracellular loop for melatonin MT1 receptor function and absence of melatonin binding in GPR50. *Br J Pharmacol*. 2017.
412. Ahuja S, Hornak V, Yan EC, Syrett N, Goncalves JA, Hirshfeld A, et al. Helix movement is coupled to displacement of the second extracellular loop in rhodopsin activation. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(2):168-75.
413. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494(7436):185-94.
414. Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature*. 2011;469(7329):175-80.
415. Zimmerman B, Beautrait A, Aguila B, Charles R, Escher E, Claing A, et al. Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci Signal*. 2012;5(221):ra33.
416. Mende F, Hundahl C, Plouffe B, Skov LJ, Sivertsen B, Madsen AN, et al. Translating biased signaling in the ghrelin receptor system into differential in vivo functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018.
417. Binda F, Dipace C, Bowton E, Robertson SD, Lute BJ, Fog JU, et al. Syntaxin 1A interaction with the dopamine transporter promotes amphetamine-induced dopamine efflux. *Mol Pharmacol*. 2008;74(4):1101-8.
418. Egana LA, Cuevas RA, Baust TB, Parra LA, Leak RK, Hochendoner S, et al. Physical and functional interaction between the dopamine transporter and the synaptic vesicle protein synaptogyrin-3. *J Neurosci*. 2009;29(14):4592-604.
419. Rickhag M, Hansen FH, Sorensen G, Strandfelt KN, Andresen B, Gotfryd K, et al. A C-terminal PDZ domain-binding sequence is required for striatal distribution of the dopamine transporter. *Nat Commun*. 2013;4:1580.
420. Torres GE, Yao WD, Mohn AR, Quan H, Kim KM, Levey AI, et al. Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron*. 2001;30(1):121-34.
421. Miranda M, Sorkina T, Grammatopoulos TN, Zawada WM, Sorkin A. Multiple molecular determinants in the carboxyl terminus regulate dopamine transporter export from endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30760-70.
422. Segura-Aguilar J, Paris I, Munoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2014;129(6):898-915.
423. Ahmad R, Gupta S, Haldar C. Age dependent expression of melatonin membrane receptor (MT1, MT2) and its role in regulation of nitrosative stress in tropical rodent *Funambulus pennanti*. *Free Radic Res*. 2012;46(2):194-203.
424. Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 1996;47(6 Suppl 3):S161-70.
425. Ferris MJ, Espana RA, Locke JL, Konstantopoulos JK, Rose JH, Chen R, et al. Dopamine transporters govern diurnal variation in extracellular dopamine tone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(26):E2751-9.
426. Gupta S, Haldar C. Nycthemeral variation in melatonin receptor expression in the lymphoid organs of a tropical seasonal breeder *Funambulus pennanti*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2014;200(12):1045-55.

427. Miller NL, Kleinschmidt EG, Schlaepfer DD. RhoGEFs in cell motility: novel links between Rgnef and focal adhesion kinase. *Curr Mol Med.* 2014;14(2):221-34.

Titre : Involvement of melatonin receptors in neurological disorders and type 2 diabetes and identification of key regions mediating MT₁ functional selectivity.

Keywords : Melatonin, G protein-coupled receptors, dopamine, transporter, neurobiology, type 2 diabetes, genetic variant, structure, signaling

Summary : Melatonin is a neurohormone mainly released from the pineal gland in a circadian manner acting through two G protein-coupled receptors (GPCRs) called MT₁ and MT₂. Melatonin regulates many important physiological functions. Regulation of dopamine (DA) and glucose levels are two of them but how they do this is not clear.

Extracellular DA levels are mainly regulated by its transporter (DAT) which mediates DA re-uptake into presynaptic nerve termini to prevent DA receptor hyperactivation in the presynaptic cleft. Consequently, we verified the role of DAT in the regulation of the DA system by melatonin. We showed that MT₁ and MT₂, by interacting with the immature non-glycosylated form of DAT retain DAT in the endoplasmic reticulum thus regulating DAT cell surface expression and DA reuptake. Consistently, mice with targeted deletion of MT₁ and MT₂ show markedly enhanced DA uptake in striatal synaptosomes and decreased amphetamine-induced locomotor activity. Collectively, we revealed here a molecular link between the melatonin and DA systems, which is based on the formation of a molecular complex between melatonin receptors and DAT.

To better understand the role of melatonin on the regulation of glucose levels, we studied the involvement of genetic variants of MT₂ in the development of type 2 diabetes (T2D). Previous studies showed that natural loss-of-function variants of MT₂ associate with T2D risk. To determine more precisely the defective properties linked to T2D risk we monitored spontaneous and melatonin-induced activation of different signaling pathways by 40 MT₂ variants. We show that defects in melatonin-induced G α i and G α z activation and spontaneous β arrestin-2 recruitment are most significantly associated to T2D risk. Experimental results correlated well with those predicted by evolutionary lineage analysis. This work will help to propose personalized treatments for MT₂ variant carriers to recover their defective responses.

Sequencing of MT₁ gene of 9393 individuals resulted in the identification of 32 natural MT₁ variants. MT₁ wild-type and variants were functionally characterized in bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays. We showed that MT₁ activates G α i/o, G α 12 and G α 15 proteins and recruits β arrestin-2. Analyses of results by non-linear matrix factorization revealed the existence of 5 clusters characterized by different signaling profiles. Computational homology modeling of the 3D model of MT₁ helped to determine the impact of each variant on receptor activation and interaction with G proteins and β arrestin-2. Collectively, our data illustrate that natural variants are powerful tools to understand the molecular basis of GPCR function.

Overall, this work contributes to our understanding of the function of melatonin receptors and highlights their importance in the regulation of the DA system and glucose homeostasis. Our results will open new, personalized therapeutic options for patient suffering from a defective DA system or T2D.



Titre : Implication des récepteurs de la mélatonine dans les troubles neurologiques et le diabète de type 2 et identification de régions clés du récepteur MT₁ responsables de sa sélectivité fonctionnelle.

Mots-clés : Mélatonine, récepteurs couplés aux protéines G, dopamine, transporteur, neurobiologie, diabète de type 2, variant génétique, structure, signalisation

Résumé : La mélatonine est une neurohormone produite principalement par la glande pinéale de manière circadienne et agissant par l'activation de deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) appelés MT₁ et MT₂. La mélatonine régule de nombreuses fonctions physiologiques importantes. La régulation des niveaux de dopamine (DA) et de glucose en font partie mais nous ne savons pas clairement comment la mélatonine les régule.

Les niveaux de DA extracellulaire sont principalement régulés par son transporteur (DAT) responsable de sa recapture dans les neurones présynaptiques afin de prévenir d'une hyperactivation des récepteurs dopaminergiques. Par conséquent, nous avons vérifié le rôle de DAT dans la régulation du système dopaminergique par le système mélatoninergique. Nous avons montré qu'en interagissant avec la forme immature non-glycosylée de DAT, MT₁ et MT₂ le retiennent dans le réticulum endoplasmique régulant ainsi son expression à la surface cellulaire et donc la recapture de la DA. De la même manière, les souris déficientes en MT₁ ou MT₂ ont montré une augmentation de la recapture de la DA dans les synaptosomes de striatum et une baisse de l'hypermotilité induite par l'amphétamine. Dans ce projet nous avons ainsi révélé un nouveau lien entre les systèmes mélatoninergiques et dopaminergiques basé sur la formation de complexes moléculaires entre les récepteurs de la mélatonine et DAT.

Afin de mieux comprendre le rôle de la mélatonine dans la régulation des niveaux de glucose, nous avons ensuite étudié l'implication de variants génétiques de MT₂ dans le développement du diabète de type 2 (DT2). Des études antérieures avaient montré que des variants naturels défectueux fonctionnellement étaient associés à un risque de développer le DT2. Afin de déterminer plus précisément les propriétés défectueuses en lien avec le DT2, nous avons mesuré l'activation spontanée et celle induite par la mélatonine de 40 variants MT₂. Nous avons ainsi montré que des défauts d'activation des protéines Gαi et Gαz induite par la mélatonine et de recrutement spontané de la βarrestine-2 sont significativement reliés à un risque de développer le DT2. Les résultats expérimentaux corrélaient avec les prédictions de l'analyse sur le score d'évolution. Ce travail permettra de nouvelles avancées dans la recherche de traitements personnalisés pour les personnes portant les mutations sur MT₂ afin qu'il retrouve une réponse non défectueuse.

Le séquençage du gène codant pour MT₁ chez 9393 personnes a permis l'identification de 32 variants naturels MT₁. Le récepteur MT₁ sauvage et les variants ont ainsi été caractérisés grâce aux techniques de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET). Nous avons montré que MT₁ active les protéines Gαi/o, Gα12 et Gα15 et recrute la βarrestine-2. L'analyse des résultats par factorisation matricielle non linéaire a révélé l'existence de 5 clusters caractérisés par différents profils de signalisation. La modélisation 3D par homologie de MT₁ a permis de déterminer l'impact de chaque variant sur l'activation du récepteur et ses interactions avec les protéines G et la βarrestine-2. Ce projet a ainsi permis de démontrer que des variants naturels sont très intéressants afin de comprendre les mécanismes d'action des RCPGs.

En résumé, ce travail contribue à la compréhension des fonctions des récepteurs à la mélatonine et souligne leur importance dans la régulation du système dopaminergique et de l'homéostasie glucidique. Nos résultats offrent de nouvelles perspectives dans la recherche de nouveaux traitements personnalisés pour les patients souffrant d'un dérèglement du système dopaminergique ou de DT2.

