

Analyse approfondie du lien entre le récepteur MT₂ de la mélatonine et le diabète de type 2

Alan Hegron¹⁻³, Ralf Jockers¹⁻³

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014, Paris, France.

²CNRS UMR 8104, Paris, France.

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.
ralf.jockers@inserm.fr

La mélatonine (MLT), ou 5-méthoxy-N-acétyltryptamine, également appelée hormone du sommeil, est une hormone qui régule de nombreuses fonctions physiologiques dans le corps humain. Elle est principalement synthétisée par les pinéaloctes localisés dans la glande pinéale des mammifères. Ces cellules utilisent en effet le tryptophane pour le transformer en sérotonine de manière constitutive, sérotonine qui sera elle-même transformée en MLT durant la nuit, régulant ainsi le cycle jour/nuit chez l'homme. Une fois sécrétée, la MLT est libérée dans le système sanguin lui permettant d'atteindre différentes régions du corps humain afin d'entraîner une réponse physiologique adéquate. La MLT nocturne endogène régule les rythmes circadiens. Elle affecte l'initiation et l'architecture du sommeil, les fonctions rétinienne, l'homéostasie du glucose, les fonctions immunitaires et la reproduction saisonnière [1]. La majeure partie de ses actions est transduite par l'activation de ses deux récepteurs exprimés par ses cellules cibles. Les récepteurs de la MLT appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) [2]. Deux récepteurs de haute affinité de la MLT ont été identifiés chez les mammifères : MT₁ (anciennement nommé Mel1a ou ML1A) et MT₂ (anciennement Mel1b ou ML1B).

Les récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG forment le plus grand et le plus varié des groupes de récepteurs membranaires chez les eucaryotes. Ces récepteurs

de surface cellulaire transduisent les signaux de nombreux messagers comme des peptides, des lipides, des métabolites, des sucres ou encore des protéines, ou de la lumière (Figure 1). Ces messagers renseignent les cellules sur leur environnement. Leurs récepteurs jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques et la compréhension de leur fonctionnement a eu un important impact en médecine moderne. Environ 30 % des médicaments actuellement sur le marché sont en effet des molécules liant ces RCPG. Les hommes, à eux seuls, expriment environ 800 de ces récepteurs, dont plusieurs sont coexprimés en même temps dans chaque cellule du corps. Les RCPG sont également appelés « récepteurs à sept domaines transmembranaires », domaines qui sont reliés entre eux par des boucles intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3) et extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3) (Figure 1). Les mutations touchant les gènes codant ces récepteurs sont impliquées dans de très nombreuses maladies, notamment le diabète de type 2 (DT2) [3, 4] (→).

Les protéines G et les β-arrestines : outils de signalisation des RCPG

Comme leur nom l'indique, les RCPG interagissent avec les protéines G au niveau de la membrane plasmique. Lorsqu'un ligand se lie à un RCPG, il induit un changement conformationnel du récepteur, conduisant à des interactions de proximité avec les protéines G. Les protéines G s'associant aux RCPG sont hétérotri-

mériques. Elles sont constituées de trois sous-unités différentes : une sous-unité alpha, une bêta et une gamma. Les sous-unités alpha et gamma sont liées à la membrane plasmique par des ancrages lipidiques ; la sous-unité alpha, selon sa conformation, lie le GTP (forme active) ou le GDP (forme inactive). En l'absence de signal, le GDP est lié à la sous-unité alpha et ce complexe est lui-même lié aux RCPG. Cette conformation inactive persiste jusqu'à ce qu'une molécule de signalisation se lie au récepteur et entraîne le remplacement du GDP par le GTP et la dissociation du complexe triprotéique en deux parties : la sous-unité alpha liée au GTP d'une part, et le dimère bêta-gamma d'autre part (Figure 1). Il faut néanmoins noter que le complexe RCPG/protéine G n'est pas figé. Même en l'absence de ligand, la conformation du RCPG change en effet de manière plus ou moins importante, lui permettant d'activer certaines protéines G. C'est ce que l'on appelle l'activité spontanée ou constitutive du récepteur.

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), ou l'activation des cascades de kinases comme celles régulées par un signal extérieur (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*) qui coordonnent les voies de signalisation intracellulaires.

Le modèle principal de la signalisation des RCPG postule que, suite à la stimulation par l'agoniste et à la génération du second messenger, la protéine G est

(→) Voir la Synthèse de N. Bouatia-Naj et al., *m/s* n° 11, novembre 2009, page 897

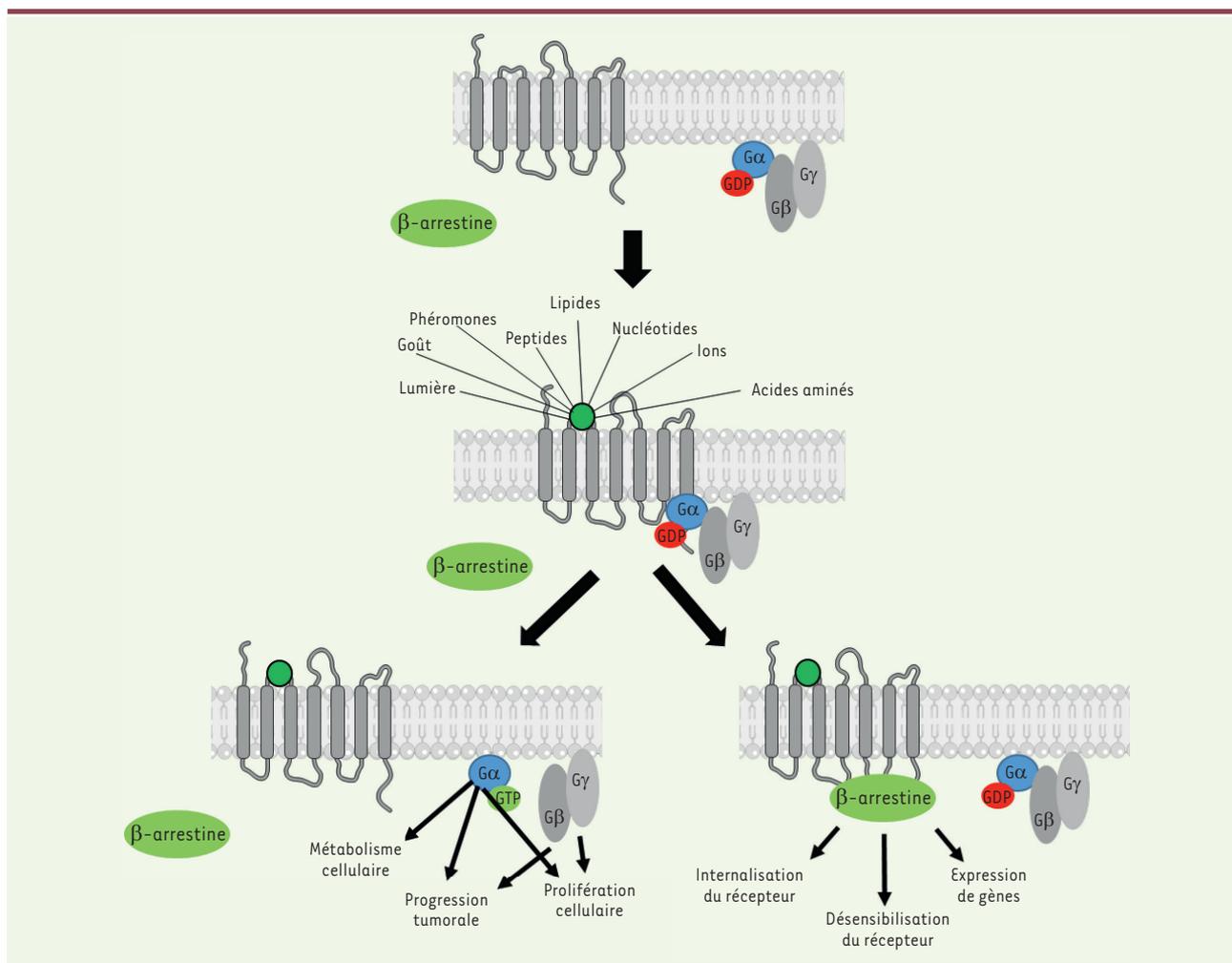


Figure 1. Schéma d'un récepteur couplé aux protéines G avant et après son activation. Le récepteur couplé aux protéines G est représenté sous sa forme inactive. La sous-unité α est couplée au GDP (guanosine di-phosphate) et les protéines $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ sont liées au sein du même complexe. Lorsque le récepteur prend sa forme active, de façon spontanée ou stabilisé par la liaison d'un ligand agoniste, il entraîne le remplacement du GDP lié à la sous-unité α par le GTP (guanosine tri-phosphate) et la dissociation du complexe $\alpha/\beta/\gamma$. L'activation du récepteur va ainsi entraîner l'activation de plusieurs voies de signalisation dépendantes des protéines $G\alpha$ ou $G\beta\gamma$. Finalement, la β -arrestine est recrutée par le récepteur et entraîne sa désensibilisation, son internalisation et une signalisation spécifique de cette protéine.

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 spécifiques du RCPG (GRK, *G-protein-coupled receptor kinases*) et d'autres kinases qui phosphorylent les résidus sérine et thréonine situés dans les boucles intracellulaires et au niveau C-terminal des récepteurs activés. Les récepteurs phosphorylés vont alors activer et recruter vers la membrane plasmique les protéines

β -arrestines du cytoplasme, entraînant la fin de la signalisation dépendante des protéines G, l'internalisation du récepteur et une signalisation dépendant de la β -arrestine (Figure 1).

Lien entre la mélatonine et le diabète de type 2

Le DT2 est une pathologie multifactorielle dont le développement dépend du patrimoine génétique et de l'environnement de l'individu [4]. Pour comprendre le lien entre la MLT et le DT2, il faut savoir que cette hormone peut avoir plusieurs

types d'effets. Ses effets peuvent être immédiats, suite à sa sécrétion nocturne, mais également prospectifs ou retardés, généralement amorcés pendant la nuit, avec des conséquences fonctionnelles pendant la journée ; des effets chronobiologiques reposant sur l'action directe de la MLT sur l'horloge circadienne et saisonniers (dépendant de la durée de la nuit) sont également décrits [5]. Il est fortement probable que le dysfonctionnement de l'un ou de plusieurs de ces effets contribue au développement du DT2. En effet, la dérégulation des cycles

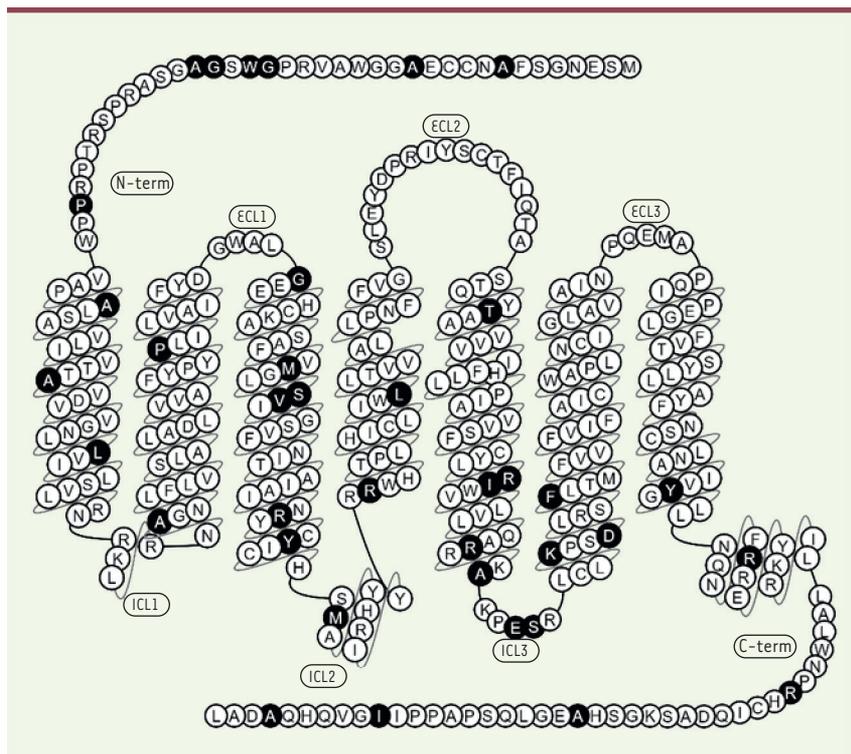


Figure 2. Représentation du récepteur MT₂ et de la position des différents variants rares identifiés. En noir sont représentées les positions des différents variants identifiés dans l'étude précédente menée par Bonnefond *et al.* [3].

de sécrétion de la MLT [6], des dérégulations du rythme circadien [7] ou encore un sommeil insuffisant [8] augmentent le risque de développer le DT2.

Dans ce contexte de relation complexe entre la MLT et le DT2, la génétique humaine a permis d'apporter des avancées majeures ces dix dernières années. Un variant fréquent (rs10830963) positionné au niveau de l'intron du gène *MTNR1B* codant le récepteur MT₂ a été associé à la dérégulation de l'homéostasie glycémique, augmentant ainsi le risque de développer un DT2 [9] (→).

L'effet de l'allèle de risque du variant rs10830963 commence probablement précocement, lors du développement de l'hyperglycémie à jeun chez les sujets prédiabétiques, en affectant la sécrétion d'insuline [10]. Ces observations ont permis de formuler l'hypothèse d'un éventuel dysfonctionnement du récepteur MT₂ dans le DT2.

(→) Voir la Synthèse d'A. Karamitri *et al.*, m/s n° 8-9, août-septembre 2013, page 778

Les deux exons du gène *MTNR1B* ont été séquencés chez des personnes normoglycémiques et diabétiques et 40 variants rares ont été découverts (Figure 2). Ce travail collaboratif entre le laboratoire du Pr Froguel et le nôtre a permis de montrer que les variants ayant une perte de fonction étaient associés à un risque accru de développement du DT2 [3]. Cette étude, s'appuyant sur un grand nombre de variants MT₂ naturels, a fourni une opportunité unique de caractériser avec une grande précision un RCPG associé au développement du DT2 [11].

Profilage transdisciplinaire des variants du récepteur MT₂

Pour appréhender la nature du(des) défaut(s) fonctionnel(s) augmentant le risque des porteurs de variants rares dans le gène *MTNR1B* de développer un DT2, nous avons conjugué une analyse cellulaire et pharmacologique avec une analyse bioinformatique.

Profilage fonctionnel

Nous avons dans un premier temps identifié l'ensemble des voies de signalisation activées par le récepteur MT₂ sauvage, en l'absence (correspondant à son activité constitutive) et en présence de son ligand. Cette étude a été réalisée dans les cellules HEK293, un contexte cellulaire non-différencié exprimant une large collection de protéines de signalisation, ce qui a permis de déterminer le profil de signalisation d'un RCPG avec précision. Nous avons ainsi révélé que le récepteur sauvage MT₂ était capable d'activer les protéines Gαi/o et Gαz, de recruter la β-arrestine 2, d'entraîner la phosphorylation d'ERK et d'inhiber la production d'AMPc. Après avoir enregistré la signature de signalisation du récepteur MT₂ sauvage, nous nous sommes intéressés à l'ensemble des 40 variants. Nous avons pu observer que certaines variations avaient un impact sur l'activité spontanée du récepteur ou sur sa puissance (DE₅₀)¹ ou son efficacité (réponse maximale transduite par la MLT, ou E_{max}) à activer ou recruter une protéine suite à la liaison de la MLT. Selon le profil de signalisation de chacun des variants, nous les avons classés en 8 catégories : (1) les variants ayant une perte de liaison à la MLT ; (2) les variants ayant une perte de signalisation de toutes les voies ; (3) ceux ayant une perte d'activation de 2 voies ou plus ; (4) ceux ayant une perte d'activation spécifique des protéines G lors de stimulation par la MLT ; (5) ceux ayant une perte spécifique de recrutement de la β-arrestine 2 ; (6) ceux ayant un défaut spécifique d'activation d'ERK ; (7) ceux ayant un gain de fonction ; et enfin (8) ceux ayant un profil de signalisation similaire à celui du récepteur MT₂ sauvage.

¹La puissance est la dose d'agoniste qui permet d'obtenir 50 % de l'effet maximum (dose efficace).

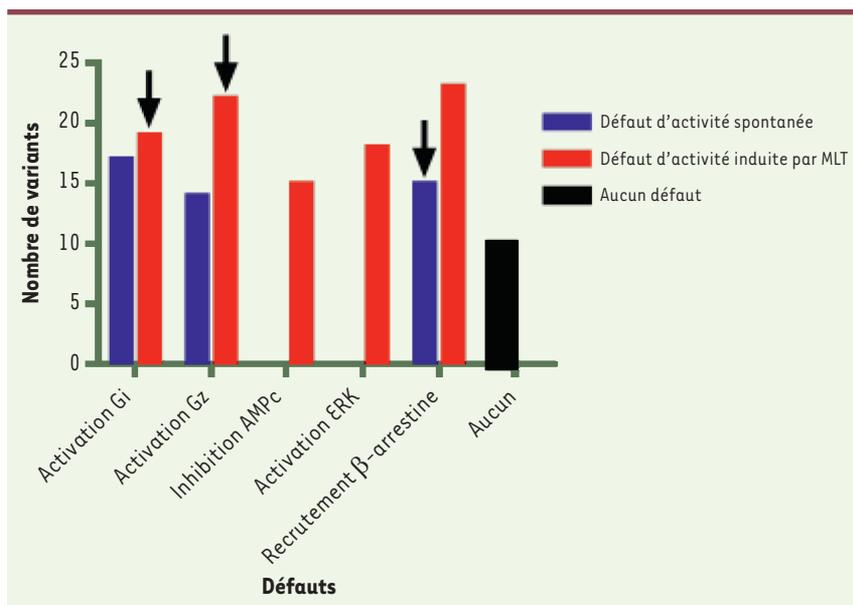


Figure 3. Représentation des mutants ayant des défauts de signalisation. Représentation graphique du nombre de mutants ayant un défaut dans les 8 paramètres testés expérimentalement. En bleu sont représentés les mutants ayant un défaut d'activité spontanée, en rouge les mutants ayant un défaut d'activité induite par la mélatonine (MLT) et en noir ceux n'ayant aucun défaut et ayant par conséquent le même profil de signalisation que le récepteur de la mélatonine MT₂ sauvage. Les flèches indiquent les défauts associés à un risque accru de développer le diabète de type 2 (DT2).

Profilage bioinformatique

La grande quantité de données collectées nous a permis de valider un modèle de prédiction de l'impact de mutations sur la fonction de la protéine. Ce modèle à action d'évolution (EA) repose sur l'importance relative de chaque résidu en fonction de sa divergence évolutive [12]. Nous avons ainsi réalisé une corrélation entre les prédictions de ce modèle informatique et les données expérimentales obtenues pour ces mutants. Une corrélation entre le modèle informatique et les résultats expérimentaux a pu être obtenue, confirmant sa robustesse pour la prédiction des effets mutationnels sur un échantillon de 40 mutants. Cela conforte l'homogénéité de nos résultats expérimentaux et valide le modèle de prédiction pour de futures analyses de variants non-synonymes (entraînant un changement d'acide aminé) dans les gènes codant des RCPG, estimés à environ 17 000 [13].

Profilage génétique et association avec le DT2

Afin de déterminer quels défauts de signalisation pouvaient avoir une influence sur le développement du DT2, nous avons pris en compte 9 paramètres : l'activation spontanée et induite par la MLT de Gαi1, Gαz, le recrutement spontané et induit par la MLT de la β-arrestine 2, l'inhibition de la production d'AMPC, l'activation d'ERK induite par la MLT et enfin l'absence de différences de signalisation comparativement au récepteur sauvage (Figure 3). Grâce aux tests statistiques, nous avons par la suite révélé que les mutants rares ayant un défaut d'activation des protéines Gαi1 ou Gαz engendrée par la MLT et de recrutement spontané de la β-arrestine 2 étaient associés de manière préférentielle à un risque accru de développer le DT2. Ce résultat est surprenant et remarquable à plusieurs titres. Dans le cas des protéines G, l'activité constitutive n'est

pas reliée à un risque accru de développer le DT2, seule l'activité induite par la MLT l'est. La situation est inverse concernant la β-arrestine 2. Ces résultats suggèrent donc deux types de défauts liés aux mutants du récepteur MT₂ : l'un dépend de la capacité du récepteur à activer des protéines G et l'autre de sa capacité à recruter la β-arrestine 2. La composante dépendant des protéines G est régulée par le MT2 et est donc rythmée par la sécrétion nocturne de la MLT. En revanche, la composante dépendant de la β-arrestine 2 est uniquement liée à la quantité de MT₂ exprimée dans la cellule et n'est pas limitée à la période nocturne. Le niveau d'expression des récepteurs de la mélatonine peut varier de façon circadienne, rajoutant un niveau supplémentaire de régulation [14, 15]. Ce résultat ouvre une nouvelle voie de recherche qui viserait à mieux comprendre les conséquences fonctionnelles du recrutement de la β-arrestine 2 au voisinage de MT₂, conséquences qui restent pour l'instant peu explorées.

Conclusion et perspectives

Depuis de nombreuses années, les chercheurs tentent de relier des variants génétiques à des risques accrus de développer certaines maladies pour trouver des traitements mieux ciblés et présentant moins d'effets secondaires. C'est dans ce contexte que cette étude fut réalisée. Au cours de celle-ci, nous avons caractérisé de manière approfondie le récepteur MT₂ sauvage ainsi que 40 mutants naturels. Nos résultats ont montré que certains défauts fonctionnels du récepteur MT₂, dus à des variants rares, augmentent le risque de développer un DT2. Tant l'activation des protéines G induite par la MLT durant la nuit que le recrutement spontané de la β-arrestine 2 sur le récepteur MT₂ semblent avoir un impact sur le développement du DT2, nous indiquant l'importance du cycle circadien dans le développement du DT2.

