

ÉTIENNE AUDET-WALSH

**RÉGULATION DES GÈNES *CYP2B* DE RONGEURS  
PAR LE RÉCEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2008

© Étienne Audet-Walsh, 2008

## Résumé

Les gènes de la sous-famille *CYP2B* sont fortement activés par des traitements au phénobarbital ou des inducteurs de type phénobarbital, et cette réponse nécessite la présence du *constitutive androstane receptor* (CAR). La dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, a la capacité d'induire CYP2B1 et CYP2B2 chez le rat et CYP2B10 chez la souris. Les travaux présentés dans ce mémoire démontrent le rôle majeur du récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans la réponse à la dexaméthasone, ce qui constitue une nouvelle voie de régulation des gènes *CYP2B*. De plus, cinq régions critiques impliquées dans la réponse ont été caractérisées et elles formeraient les éléments clé d'une unité de réponse aux glucocorticoïdes de *CYP2B2*. Pour la première fois, CAR peut jouer le rôle de facteur accessoire, en stimulant la réponse à la dexaméthasone passant par GR. En conclusion, les résultats présentés ici décrivent une nouvelle voie de régulation des gènes *CYP2B* de rongeurs.

*Entreprendre en biologie, c'est entreprendre  
pour la vie*

# Table des matières

RÉSUMÉ.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX .....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
<b>1. CHAPITRE I – INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
1.1 DÉFENSE CONTRE LES XÉNOBIOTIQUES.....	1
1.2 CARACTÉRISATION DES CYP.....	4
1.2.1 <i>Historique</i> .....	4
1.2.2 <i>Évolution des CYP</i> .....	5
1.2.3 <i>Nomenclature et diversité</i> .....	6
1.3 STRUCTURE ET ACTIVITÉ ENZYMATIQUE .....	7
1.4 RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE DES CYP.....	10
1.4.1 <i>L'induction</i> .....	10
1.4.2 <i>Rôle des récepteurs nucléaires dans la régulation des gènes CYP</i> .....	12
1.5 SOUS-FAMILLE DES CYP2B.....	17
1.5.1 <i>Les CYP2B et la réponse au PB</i> .....	17
1.5.2 <i>Rôle du récepteur nucléaire CAR et modèle de Negishi</i> .....	22
1.5.3 <i>Induction des CYP2B par les glucocorticoïdes</i> .....	26
1.5.4 <i>Le cas de la strychnine et de la brucine</i> .....	29
1.6 PROJETS DE MAÎTRISE .....	30
1.6.1 <i>Étude du rôle de CAR dans la réponse au PB</i> .....	30
1.6.2 <i>Décortication de la réponse à la DEX des CYP2B</i> .....	30
1.6.3 <i>Induction à la strychnine</i> .....	31
<b>2. CHAPITRE II – ÉTUDE DU RÔLE DE CAR DANS LA RÉPONSE AU PB .....</b>	<b>32</b>
2.1 ESSAI D'OBTENTION D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE RÉPONDANT AU PB.....	32
2.1.1 <i>Absence de réponse au PB dans les lignées cellulaires</i> .....	32
2.1.2 <i>Stratégie employée</i> .....	34
2.1.3 <i>Méthodologie utilisée pour les sélections</i> .....	36
2.1.4 <i>Résultats</i> .....	38
2.1.5 <i>Conclusion</i> .....	40
2.2 DÉVELOPPEMENT DE SHRNA CIBLANT SPÉCIFIQUEMENT L'ARNM DE CAR.....	40
2.2.1 <i>Intérêt de l'inactivation de CAR</i> .....	40
2.2.2 <i>Stratégies développées</i> .....	43
2.2.3 <i>Méthodologie</i> .....	43
2.2.4 <i>Résultats</i> .....	48
2.2.5 <i>Conclusion</i> .....	51
<b>3. CHAPITRE III – IMPLICATION DU RÉCEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES DANS LA RÉPONSE DES CYP2B DE RONGEURS À LA DEXAMÉTHASONE .....</b>	<b>52</b>
AVANT-PROPOS .....	52
RÉSUMÉ.....	53
ABSTRACT .....	56

INTRODUCTION .....	57
MATERIALS AND METHODS .....	60
RESULTS .....	64
DISCUSSION .....	70
ACKNOWLEDGEMENTS AND FOOTNOTES .....	75
REFERENCE LIST .....	76
FIGURE LEGENDS .....	80
FIGURES .....	84
<b>4. CHAPITRE IV – LA RÉGION 5' FLANQUANTE DE CYP2B2 CONTIENT UNE UNITÉ DE RÉPONSE AUX GLUCOCORTICOÏDES.....</b>	<b>91</b>
AVANT-PROPOS .....	91
RÉSUMÉ.....	92
ABSTRACT .....	94
1. INTRODUCTION .....	95
2. MATERIALS AND METHODS.....	97
3. RESULTS .....	101
4. DISCUSSION .....	105
ACKNOWLEDGMENTS.....	111
REFERENCES.....	112
FIGURE LEGENDS .....	116
TABLES.....	119
FIGURES .....	121
<b>CHAPITRE V – DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>127</b>
5.1 DÉVELOPPEMENT D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE RÉPONDANT AU PB .....	127
5.2 UTILISATION DU SHRNA CIBLANT CAR.....	128
5.3 UNE NOUVELLE VOIE DE RÉGULATION DES CYP2B DÉCORTIQUÉE .....	129
5.3.1 <i>Le rôle du GR dans l'induction à la DEX</i> .....	129
5.3.2 <i>Le rôle de CAR dans l'induction à la DEX</i> .....	131
5.3.3 SITE DE RÉGULATION INCONNU .....	133
5.3.4 <i>Modèle de réponse à la DEX des CYP2B</i> .....	133
5.4 UN MÉCANISME D'INDUCTION ENDOGÈNE DES CYP2B, POUR FAIRE QUOI? .....	134
5.4.1 <i>Participation à la métabolisation des androgènes</i> .....	134
5.4.2 <i>Impact sur la santé humaine</i> .....	135
5.5 CONCLUSION GÉNÉRALE.....	136
<b>ANNEXE 1 – INDUCTION DES CYP2B ENDOGÈNES DANS LES CELLULES H4IIEC3.....</b>	<b>150</b>
A1.1 INTRODUCTION .....	150
A1.2 MÉTHODOLOGIE .....	150
A1.2.1 <i>Culture cellulaire</i> .....	150
A1.2.2 <i>Northern</i> .....	150
A1.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	151
<b>ANNEXE 2 – RÉPONSE À LA STRYCHNINE DES CYP2B DE RATS ET DE SOURIS .....</b>	<b>152</b>
A2.1 <i>Avant-propos</i> .....	152
A2.2 <i>Méthodologie</i> .....	152
A2.3 <i>Résultats et discussion</i> .....	153
<b>ANNEXE 3 – INFLUENCE DE LA DEX ET DU GR DANS LES HÉPATOCYTES EN CULTURE PRIMAIRE .....</b>	<b>155</b>
A3.1 INTRODUCTION ET MÉTHODOLOGIE .....	155
A3.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	156

# Liste des tableaux

## Chapitre I

Tableau 1-1. Les cinq classes d'inducteurs des CYP.....	11
---	----

## Chapitre II

Tableau 2-1. Effet de l'administration de TSO sur le niveau de l'ARNm du gène <i>Cyp2b10</i> chez des souris CAR <sup>+/+</sup> et CAR <sup>-/-</sup> .....	42
---	----

Tableau 2-2. Séquences des amorces utilisées afin de construire les SEC.....	46
--	----

## Chapitre IV

Tableau 4-1. Oligos used to make the different <i>CYP2B2</i> reporter constructs.....	119
---	-----

Tableau 4-2. Oligos used for EMSA analysis.....	120
---	-----

# Liste des figures

## Chapitre I

Figure 1-1. Métabolisme et élimination des xénobiotiques en des trois phases.....	3
Figure 1-2. Structure générale des CYP.....	8
Figure 1-3. Mécanisme de monooxygénation d'un substrat par les CYP.....	9
Figure 1-4. Structure, éléments de réponse et arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires pour les groupes NR1H et NR1I.....	13
Figure 1-5. Mécanismes d'activation transcriptionnelle par le récepteur des glucocorticoïdes au niveau de ses éléments de réponse.....	16
Figure 1-6. Regroupement des gènes CYP2 chez l'humain, la souris et le rat.....	18
Figure 1-7. L'unité de réponse au PB de <i>CYP2B2</i> .....	20
Figure 1-8. Modèle de Negishi sur le mécanisme d'induction au PB par le récepteur nucléaire CAR.....	24
Figure 1-9. Influence de la voie du GR activée sur l'activité transcriptionnelle du <i>PBREM</i> de <i>CYP2B6</i> dans des cellules en culture.....	28

## Chapitre II

Figure 2-1. Absence d'activation par CAR lorsque la PBRU est placée en contexte naturel.....	33
Figure 2-2. Carte du vecteur pGL3-2B2Xneo.....	35
Figure 2-3. Activation transcriptionnelle des rapporteurs de <i>CYP2B</i> de deux différents transfectants stables.....	39
Figure 2-4. Schématisation de la production d'une SEC.....	45
Figure 2-5. Capacité d'interférence de différents shRNA dans des cellules HepG2.....	49
Figure 2-6. Blocage de l'expression de la protéine de fusion CAR_GFP par le shRNA CAR10.....	50

## Chapitre III

Figure 3-1. Sequence of the rat <i>CYP2B2</i> PBRU, the GRE at -1.3 kb and the homologous region of the mouse <i>Cyp2b10</i> 5' flank.....	84
Figure 3-2. Schematic representation of the different <i>CYP2B2</i> -derived luciferase reporter constructs used in the study of DEX responsiveness.....	85
Figure 3-3. Western blot analysis of DEX induction of CYP2B1 and CYP2B2 proteins in rat liver.....	86
Figure 3-4. Response to DEX of the rat <i>CYP2B2</i> or the mouse <i>Cyp2b10</i> reporters in HepG2 cells in the presence of various nuclear receptors.....	87
Figure 3-5. Response to DEX of the rat <i>CYP2B2</i> or the mouse <i>Cyp2b10</i> reporters in H4IIEC3 cells in the presence of various nuclear receptors.....	88
Figure 3-6. Response to DEX of the pGL3-2B2-Luc reporter construct in H4IIEC3 cells in the presence or absence of RU486.....	89

Figure 3-7. Impact of different deletions in the <i>CYP2B2</i> 5' flank on DEX-responsiveness and CAR activation in H4IIEC3 cells.....	89
Figure 3-8. Impact of different deletions in the <i>CYP2B2</i> 5' flank on DEX-responsiveness and CAR activation in HepG2 cells.....	90
Figure 3-9. Responses to DEX of the PBREM-120 and the -120 reporter constructs in HepG2 cells.....	90

## Chapitre IV

Figure 4-1. Schematic representation of the different <i>CYP2B2</i> -derived luciferase reporter constructs.....	121
Figure 4-2. Identification of a putative GRE conferring DEX responsiveness in HepG2 cells.....	122
Figure 4-3. Response to DEX of the different reporter constructs in H4IIEC3 cells.....	123
Figure 4-4. Binding of rat liver nuclear proteins to putative GREs or accessory sites and competition by the GRE consensus sequence.....	124
Figure 4-5. CAR is required for the maximal induced level of CYP2B10 protein <i>in vivo</i> in mice.....	125
Figure 4-6. Model to explain DEX induction of the <i>CYP2B2</i> gene.....	126

## Annexe 1

Figure A1-1. Induction des CYP2B endogènes dans les cellules H4IIEC3.....	151
---	-----

## Annexe 2

Figure A2-1. Induction à la strychnine de CYP2B1, CYP2B2 et CYP2B3 dans des hépatocytes de rat en culture primaire.....	153
Figure A2-2. Absence d'induction à la strychnine de CYP2B9 et CYP2B10 chez les souris sauvages et les souris CAR <sup>-/-</sup> .....	154

## Annexe 3

Figure A3-1. Influence de la DEX sur les niveaux de base et induit au PB de rapporteurs de <i>CYP2B2</i> dans des hépatocytes en culture primaire (expérience 1).....	156
Figure A3-2 Influence de la DEX sur les niveaux de base et induit au PB de rapporteurs de <i>CYP2B2</i> dans des hépatocytes en culture primaire (expérience 2).....	157

## Liste des abréviations

AF	Domaine d'activation
C/EBP $\alpha$	CCAAT/ <i>enhancer binding protein</i>
CaMK	<i>calcium/calmoduline-dependant kinase</i>
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CCRP	<i>Cytoplasmic CAR retention protein</i>
CITCO	6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3]thiazole-5-carbaldehyde <i>O</i> -(3,4-dichlorobenzyl)oxime
CYP	Cytochrome P450
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DEX	Dexaméthasone
DR	Répétition directe ( <i>direct repeat</i> )
ER	Répétition éversée ( <i>everted repeat</i> )
FBS	Sérum fœtal de boeuf
GABA <sub>A</sub>	Récepteur de l'acide $\gamma$ -aminobutyrique
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
GRU	<i>Glucocorticoid response unit</i>
IR	Répétition inversée ( <i>inverted repeat</i> )
LBD	Domaine de liaison au ligand
NF1	<i>Nuclear factor 1</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2 A</i>
pb	Paire(s) de bases
PB	Phénobarbital
PBR	Récepteur périphérique des benzodiazépines
PBRE	<i>PB-responsive element</i>
PBREM	<i>PB-responsive enhancer module</i>
PBRU	<i>PB-response unit</i>
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RNAi	Interférence à l'ARNm
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SEC	<i>shRNA expression cassette</i>
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene
TSO	Oxyde de <i>trans</i> -stilbène
UGT	UDP glucuronosyl-transférases

# 1. Chapitre I – Introduction générale

## 1.1 Défense contre les xénobiotiques

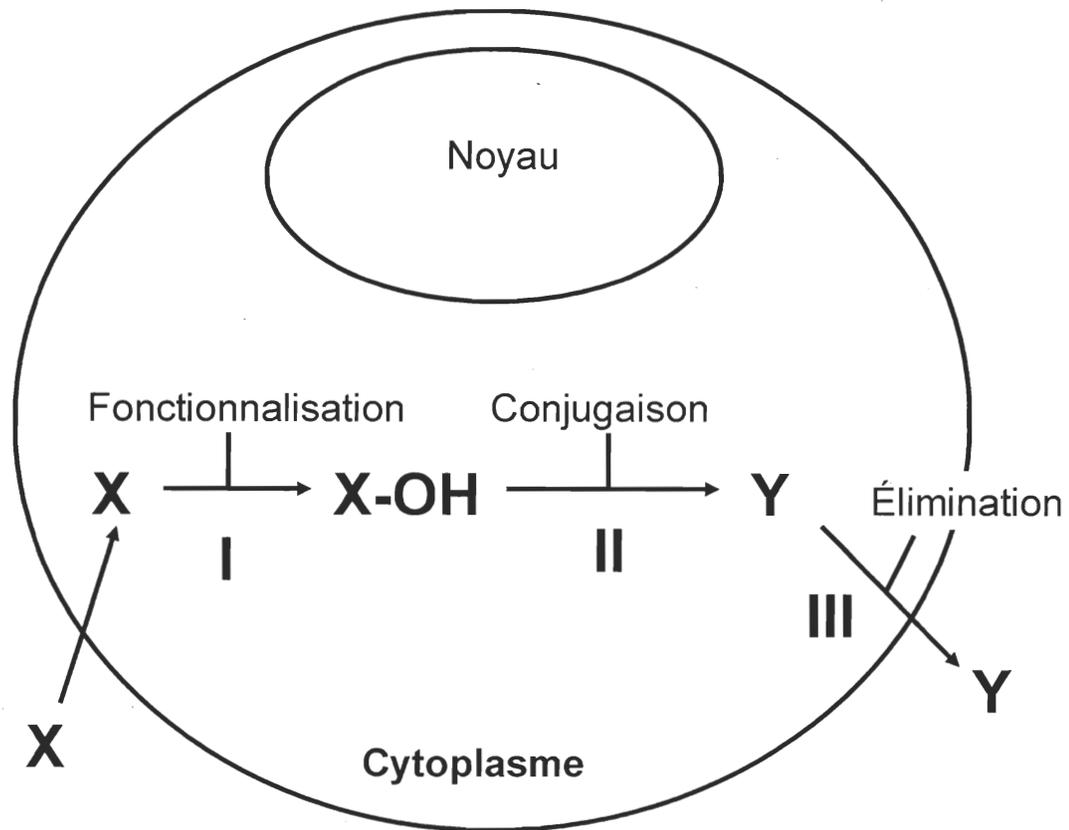
Les êtres vivants ayant à faire face à des molécules étrangères, dites xénobiotiques, plusieurs lignes de défense sont en place afin de protéger l'intégrité de l'organisme. Au niveau cellulaire, la membrane plasmique bloque facilement l'entrée des molécules hydrophiles. Elles devront donc emprunter des canaux ou des récepteurs membranaires présents afin de pénétrer à l'intérieur, ce que les cellules peuvent plus facilement contrôler. Les molécules hydrophobes quant à elles ne sont pas arrêtées par cette membrane et pénètrent directement dans la cellule à travers la double couche phospholipidique. En réponse à ces intrusions, plusieurs groupes d'enzymes permettent la biotransformation de ces xénobiotiques. Ces enzymes auront pour fonction de rendre les xénobiotiques hydrophiles et, par conséquent, ils seront plus facilement expulsés hors de la cellule. Une fois dans la circulation, les molécules devenues hydrophiles seront excrétées par l'organisme, majoritairement dans la bile et l'urine [1;2].

Chez l'humain, l'organe le plus gros est aussi celui ayant le plus grand rôle dans la détoxification : le foie [3]. Le foie a plusieurs fonctions endogènes, entre autres le catabolisme des acides biliaires, le métabolisme des hormones stéroïdiennes et le maintien de l'homéostasie du cholestérol [2;3]. Il est composé en majeure partie d'hépatocytes. Ce sont des cellules polyploïdes hautement spécialisées qui contiennent une grande diversité d'enzymes de biotransformation, leur conférant un spectre d'action très large [4]. En effet, les hépatocytes doivent être capables de reconnaître et de métaboliser des molécules auxquelles l'organisme n'a peut-être jamais été confronté. Caractéristique unique du foie, ses cellules, même si elles sont hautement spécialisées, conservent un potentiel de reproduction énorme [5;6]. En situation normale, *c.-à-d.* en absence de stress, les hépatocytes se divisent peu et ont généralement 4 noyaux [5]. Par contre, après des traitements entraînant une stimulation, des dommages ou une perte de poids du foie, les hépatocytes acquièrent un énorme potentiel de division afin de reconstituer entièrement l'organe [6]. Certains traitements peuvent même entraîner, au niveau cellulaire, une

augmentation du nombre de noyaux, allant jusqu'à 8 par cellule [5]. L'hépatomégalie se produit lors de traitements prolongés avec certains xénobiotiques et se traduit par l'augmentation du volume du foie ainsi que du nombre d'hépatocytes présents [7]. Suite à cette réponse, peut-être adaptative afin de mieux combattre l'agression [5], le foie peut regagner sa taille normale jusqu'à une prochaine exposition. Toutefois, des traitements à long terme peuvent entraîner des tumeurs, selon le type de xénobiotique utilisé [5;7;8].

Les hépatocytes vont fortement exprimer les enzymes de biotransformation nécessaires à parer les menaces [4]. Ces enzymes font partie d'un système complexe de détoxification en trois phases. Les deux premières phases sont la transformation du substrat par lesdites enzymes. La troisième phase consiste en l'expulsion des molécules biotransformées [9;10]. Il y a donc des enzymes de biotransformation agissant en deux temps, dites de phases I et II [1;9-11] puis il y a des transporteurs membranaires dits de phase III [9;10], tel que résumé à la figure 1-1.

Des réactions dites de fonctionnalisation se produisent durant la phase I, permettant la formation de dérivés munis d'un nouveau groupement polaire [11]. Les cytochromes P450 (CYP) constituent la majeure partie des enzymes de phase I [1]. Généralement, les CYP catalysent une réaction d'oxydation; c'est-à-dire qu'ils vont rajouter un atome d'oxygène à leur substrat, conduisant principalement à son hydroxylation [1;12]. Le groupement nouvellement formé a deux fonctions, la première étant de rendre le xénobiotique plus hydrophile et la deuxième étant de créer un point « d'ancrage » pour les enzymes de phase II.



**Figure 1-1.** Métabolisme et élimination des xénobiotiques selon le modèle des trois phases. Un xénobiotique hydrophobe toxique X pénètre la cellule. Une fois entré, il est « fonctionnalisé », par exemple par les CYP, ce qui entraîne la formation d'un dérivé (phase I). Par la suite, il est transformé en un composé Y, par la conjugaison d'un nouveau groupement (phase II). Finalement, il est expulsé de la cellule par un transporteur membranaire (phase III).

Les enzymes de phase II, dites de conjugaison, sont constituées elles aussi de plusieurs familles. La plus importante est celle des UDP glucuronosyl-transférases (UGT), qui transfèrent un groupement glucuronide de l'acide UDP-glucuronique au substrat, donc aux xénobiotiques [10]. Les enzymes de phase II pourront avoir comme substrat les xénobiotiques eux-mêmes, ou bien les métabolites « fonctionnalisés » par les enzymes de phase I [10;13]. Ces réactions ont comme conséquence d'augmenter l'hydrophilie des molécules cibles, en rajoutant des groupements glucuronide, mais aussi des groupements sulfate ou glutathione par exemple [9].

Les enzymes de phase III sont responsables du transport actif des xénobiotiques [9], biotransformés ou non, qui permet de les faire traverser de la membrane basolatérale vers la membrane apicale afin de changer de « conduit » les molécules cibles [14]. Ainsi une molécule X sera pompée par un transporteur membranaire du sang vers les hépatocytes afin d'être expulsé, après modification, dans les canaux biliaires pour excrétion par la bile par un autre transporteur membranaire [14]. Ainsi les deux transporteurs font tous les deux partie des enzymes de phase III, car ils contribuent à la clairance des xénobiotiques.

Dans le cadre de ce présent mémoire, il sera question de la régulation de la synthèse des CYP. Plus précisément, les recherches présentées ici porteront sur l'étude de la régulation de la synthèse d'une sous-famille de CYP, celle des gènes *CYP2B*, dans le foie de rat et de souris et dans des cellules en culture, en réponse à la dexaméthasone (DEX).

## **1.2 Caractérisation des CYP**

### **1.2.1 Historique**

Les CYP furent découverts à la fin des années 50 du siècle dernier par deux groupes différents. Ils furent tout d'abord purifiés chez le rat [15] et le porc [16]. Ces protéines, associées à un groupement hème, furent initialement identifiées comme des pigments et c'est de cette origine modeste qu'ils tirent leur nom, puisqu'elles ont un spectre d'absorbance en présence de monoxyde de carbone à 450 nm, spectre qui leur est propre (d'où P 450, pour Pigment et 450 nm) [15-17]. Dès le début de l'étude de la superfamille

des protéines CYP, il fut découvert que certains de ses membres étaient inductibles. Le phénobarbital (PB), un médicament barbiturique utilisé comme sédatif et anti-convulsant, est l'un des inducteurs classiques, et son rôle dans la régulation des CYP est étudié depuis plus de 40 ans [18;19]. Un inducteur est une molécule qui, une fois présente dans l'organisme, a comme conséquence d'entraîner l'augmentation de la quantité de diverses enzymes par des mécanismes moléculaires et cellulaires spécifiques. Différents mécanismes d'induction, car il en existe plusieurs dépendamment des composés utilisés et des familles de gènes ciblées, feront l'objet d'une attention particulière à la section 1.5. Mais tout d'abord, il sera question des origines évolutives des CYP, de leur structure générale et de leurs fonctions.

### 1.2.2 Évolution des CYP

La superfamille des CYP comprend plusieurs centaines de membres à travers tous les règnes du vivant. Malgré cette étonnante diversité, il est possible que tous les CYP aient évolué à partir d'un seul gène originel [13;20]. L'un des CYP les plus anciens, CYP51, le lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase, a la caractéristique unique d'être présent dans tous les règnes du vivant [21]. Sa fonction, comme son nom l'indique, est la 14-déméthylation du lanostérol, étape essentielle dans la formation du cholestérol, composé essentiel à la vie animale [22]. Pour ces raisons, CYP51 est considéré par certains comme le CYP originel [21].

La co-évolution de la faune et la flore terrestre aurait entraîné une explosion de la diversité des CYP [20;23]. Les plantes ont dû au cours de leur évolution développer une foule de mécanismes de défense contre le broutage, par exemple la synthèse de composés toxiques pour les herbivores. L'arbre *Strychnos nux-vomica* en est une bonne démonstration, puisqu'il incorpore dans ses graines des alcaloïdes toxiques (telle la strychnine) [24]. Les herbivores auraient quant à eux développé des contre-mesures, incluant une grande diversité de CYP les protégeant contre une foule de molécules toxiques [13;20;23], ainsi certains CYP de mammifères métabolisent la strychnine précédemment mentionnée [25]. On peut séparer les CYP selon 2 critères : ceux qui sont utilisés dans la biotransformation de molécules endogènes et ceux dirigés contre des molécules exogènes.

La première catégorie de CYP serait relativement stable phylogénétiquement parlant, tandis que la deuxième le serait beaucoup moins. Autrement dit, le rythme de différenciation interspèce des CYP ciblant les molécules exogènes sera plus élevé que celui des CYP ciblant les molécules endogènes [26].

Les CYP ont plusieurs rôles endogènes et interviennent dans le métabolisme de nombreuses hormones stéroïdiennes, des acides biliaires ou dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol [1;2;27]. Mais ils sont aussi connus pour leur rôle important dans la détoxification des xénobiotiques [1;2;27]. Les principales familles intervenant dans cette fonction sont : CYP1A, CYP2B, CYP2C/H, CYP3A et CYP4A [2]. La sous-famille CYP3A interviendrait dans la métabolisation de plus de 50 % des médicaments utilisés de nos jours, tandis que celle des CYP2B interviendrait chez 25 % de ceux-ci [28]. En tout, chez l'humain, une quinzaine de CYP intervient dans le métabolisme de plus de 90 % des médicaments [1]. Il va donc sans dire que leur rôle est important dans la pharmacodynamique et la pharmacocinétique des médicaments et des xénobiotiques de toutes sortes. La compréhension des mécanismes contrôlant leur régulation est alors de première importance, tant au niveau pharmacologique qu'au niveau des conséquences reliées à une contamination environnementale.

### **1.2.3 Nomenclature et diversité**

La superfamille des CYP regroupe plus de 6000 membres, divisés en 65 familles, dont 18 sont présentes chez les vertébrés [29]. Chez l'humain, 57 gènes de CYP sont connus [27]. Chez la souris, ce chiffre double presque, pour atteindre 102 gènes putatifs fonctionnels ainsi que 88 pseudogènes [27].

Avec une telle diversité, une nomenclature simple et efficace se devait d'être mise en place. Leur nom commence avec le sigle CYP. Par la suite, le premier chiffre désigne la famille, la lettre qui le suit indique la sous-famille et le dernier chiffre l'enzyme. Par exemple, CYP2B1 : 2<sup>e</sup> famille, 2<sup>e</sup> sous-famille et 1<sup>er</sup> membre de cette famille. Par la suite, le nom du CYP doit être écrit en italique pour indiquer le gène, tandis qu'il doit être sans italique lorsqu'il s'agit de l'ARNm ou de la protéine [30;31]. Des systèmes similaires de

nomenclature ont par la suite été adoptés pour plusieurs autres familles de gènes, entre autres celles des récepteurs nucléaires [32] et des UGT [33].

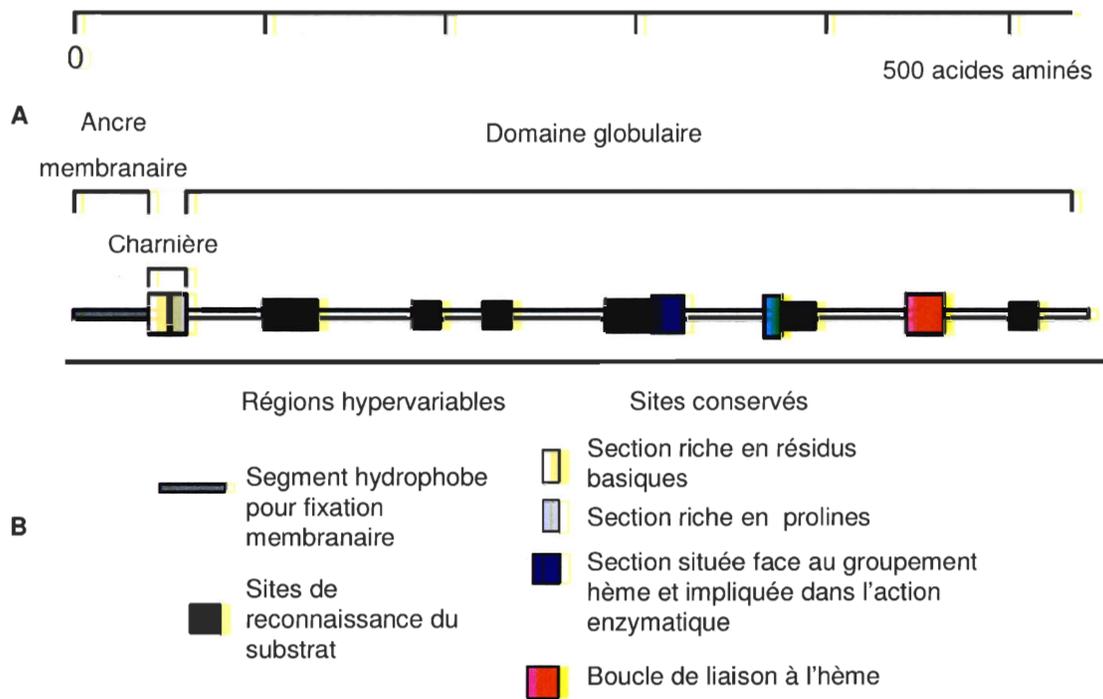
### 1.3 Structure et activité enzymatique

Formés d'environ 500 acides aminés et d'une masse moléculaire d'environ 50 kDa, les CYP vont avoir comme fonction principale d'ajouter un atome d'oxygène aux molécules hydrophobes cibles (endo- ou xénobiotiques), à partir d'une molécule d'O<sub>2</sub>. Chez les eukaryotes, les CYP qui nous intéressent sont localisés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), avec leur site enzymatique situé dans la partie cytoplasmique tandis qu'un domaine est fixé à la membrane du RE (voir Fig. 1-2) [1;12]. Leur région N-terminale, riche en acides aminés hydrophobes, permettra la fixation de la protéine à cette membrane [1;12].

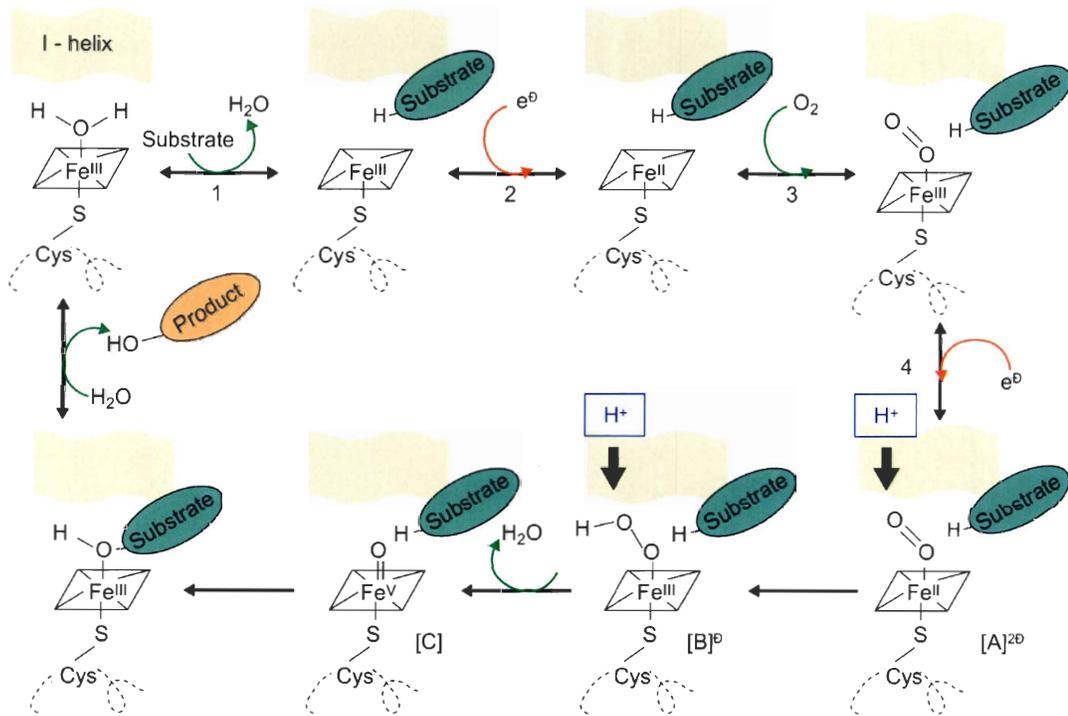
La figure 1-3 démontre de façon simplifiée le mécanisme général de monoxydation d'un substrat par les CYP. Le substrat se lie à l'enzyme, près du groupement hème, ce qui libère une molécule d'eau. Cela entraîne l'acquisition d'un électron au niveau de l'hème, puis d'une molécule d'oxygène atmosphérique (O<sub>2</sub>), créant ainsi un complexe instable. Celui-ci acceptera ensuite un deuxième électron; les deux électrons provenant de la NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase. Finalement, il y aura clivage de l'O<sub>2</sub> et l'une des deux molécules d'oxygène sera utilisée pour former une molécule d'eau, avec deux H<sup>+</sup>, tandis que l'autre molécule d'oxygène sera transférée au substrat, formant la fonction hydroxyle sur ce dernier [4]. La réaction effectuée par les CYP est donc la suivante :



Bien que seule l'hydroxylation ait été mentionnée, il est à noter que les CYP peuvent entraîner la formation de différents dérivés dans certaines circonstances, par exemple par des réactions d'époxydation ou de déshydrogénation [4]. Au final, les CYP ont un large spectre d'action, et peuvent reconnaître une gamme impressionnante de molécules aux structures biochimiques variées, et permettre leur élimination.



**Figure 1-2.** Structure générale des CYP. (A) Domaines typiques d'un CYP, avec entre autres le domaine de liaison à la membrane du RE, plusieurs domaines impliqués dans la liaison au substrat ainsi que le domaine de liaison au groupement hème. (B) Les différents domaines des CYP selon leur degré de conservation. Figure adaptée de Werck-Reichhart et Feyereisen [12].



**Figure 1-3.** Mécanisme de monooxygénation d'un substrat par les CYP. Au repos, l'enzyme a une molécule d'eau liée à son groupement hème (en haut à gauche). La liaison à son substrat libère la molécule d'eau et cela enclenche le mécanisme de monooxygénation, avec les diverses étapes impliquées, débutant en haut à gauche et allant dans le sens horaire. Tirée de Werck-Reichhart et Feyereisen [12].

## 1.4 Régulation de la synthèse des CYP

### 1.4.1 L'induction

Plusieurs étapes entrent en ligne de compte dans la régulation des CYP, leur permettant de participer à la métabolisation de leurs cibles endogènes et exogènes. En premier lieu, les molécules cibles doivent être reconnues. Par la suite, il faut que la synthèse des enzymes de biotransformation soit augmentée pour permettre leur détoxification. Les niveaux de base de certains CYP sont donc très faibles, voir presque indétectable, et beaucoup de CYP intervenant dans la détoxification des xénobiotiques sont inductibles, c'est-à-dire que leur niveau protéique est fortement augmenté permettant ainsi d'éliminer plus rapidement la cause du stress cellulaire. Cette augmentation marquée des taux protéiques montrera dans bien des cas une spécificité tissulaire. Finalement, une fois les CYP ayant effectué leur tâche de détoxification, il faut les recycler, en attendant de nouveaux besoins d'intervention [2].

Chez les mammifères, deux récepteurs nucléaires sont considérés comme des xénosenseurs, CAR, le *Constitutive androstane receptor*, et PXR, le *Pregnane X receptor* [2]. Ces deux facteurs de transcription auraient comme fonction de détecter les xénobiotiques et d'activer la transcription de gènes des phases I, II et III. Bien que CAR et PXR interviendraient comme xénosenseurs, ceux-ci ne seraient responsables que de deux des cinq grands patrons d'induction (le patron 2 pour CAR et le patron 3 pour PXR, voir tableau 1-1). Il arrive que la structure des xénobiotiques soit similaire à celles de composés endogènes. Par conséquent, ces xénobiotiques induiront les gènes cibles par des voies autres que celles des xénosenseurs, résultant en des patrons de gènes induits différents (voir le tableau 1-1, les patrons 1, 4 et 5). Au final, plusieurs facteurs de transcription, pour la plupart des récepteurs nucléaires, seront impliqués dans les mécanismes d'induction des différentes familles de CYP. Puisque ces voies sont généralement contrôlées par les récepteurs nucléaires, ceux-ci seront décrits de façon plus précise à la section suivante.

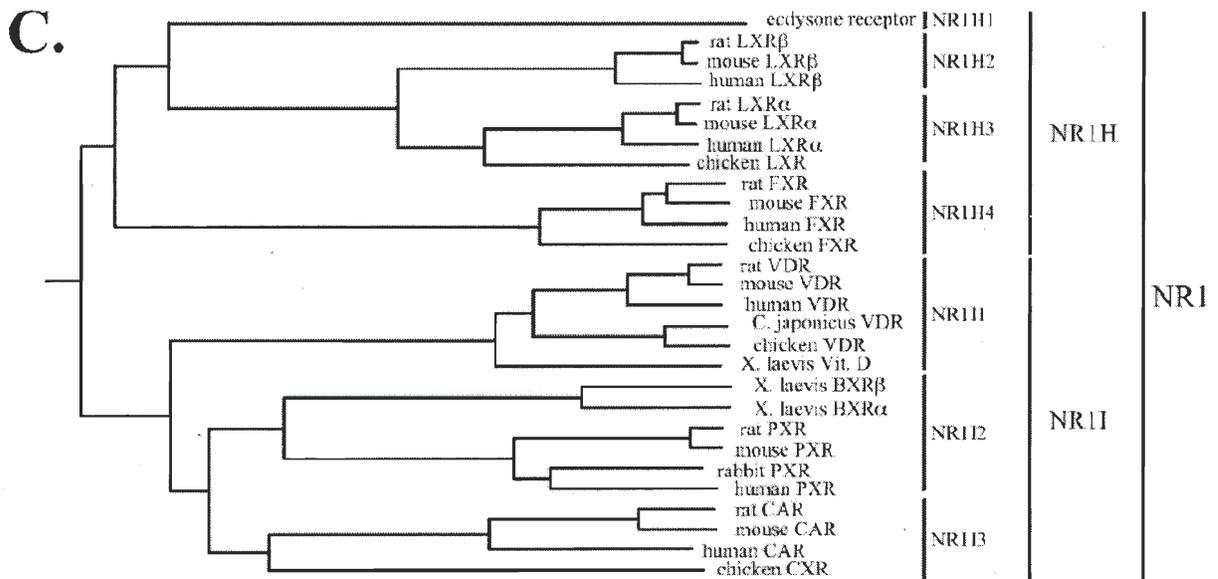
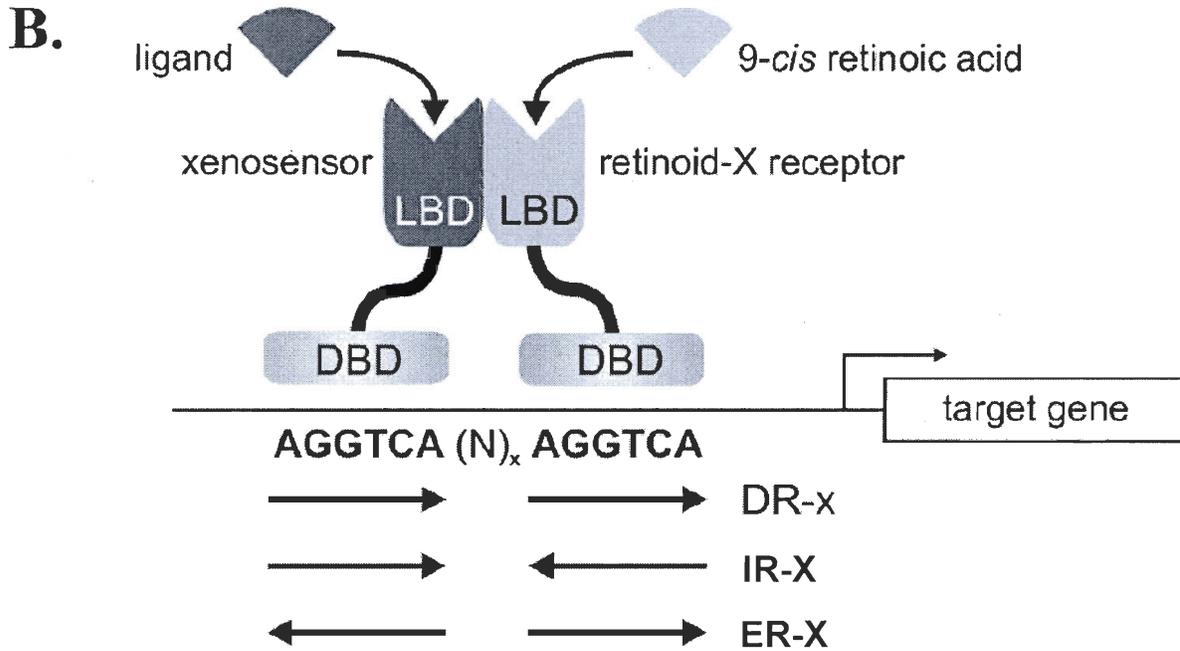
**Tableau 1-1.** Les cinq classes d'inducteurs des CYP. Adapté de Handschin et Meyer [2]

Les cinq classes d'inducteurs de CYP		
Type d'inducteur		Patron d'induction
1	Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
2	Les composés de type PB	CYP2B, CYP2C, CYP3A
3	La rifampicine et les composés de type DEX	CYP3A, CYP2C, CYP2B
4	Éthanol	CYP2E1
5	Les composés de type clofibrate	CYP4A

#### **1.4.2 Rôle des récepteurs nucléaires dans la régulation des gènes *CYP***

La famille des récepteurs nucléaires contient près de 50 membres chez l'être humain [34]. Les membres de la famille ont une structure globale similaire, contenant entre autres un domaine de liaison au ligand (LBD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) incluant deux motifs à doigts de zinc, ainsi que 1 ou 2 domaines d'activation (AF) (voir Fig. 1-4A) [35]. Leur nomenclature est similaire à celle des *CYP*; chaque membre a le préfixe NR, suivi d'un chiffre arabe désignant sa sous-famille, puis d'une lettre désignant son groupe. Finalement, un dernier chiffre indique le membre [32]. Par exemple CAR, l'un des deux xénosenseurs, a comme nom, dans la nomenclature officielle, NR1I3 (voir Fig. 1-4C).

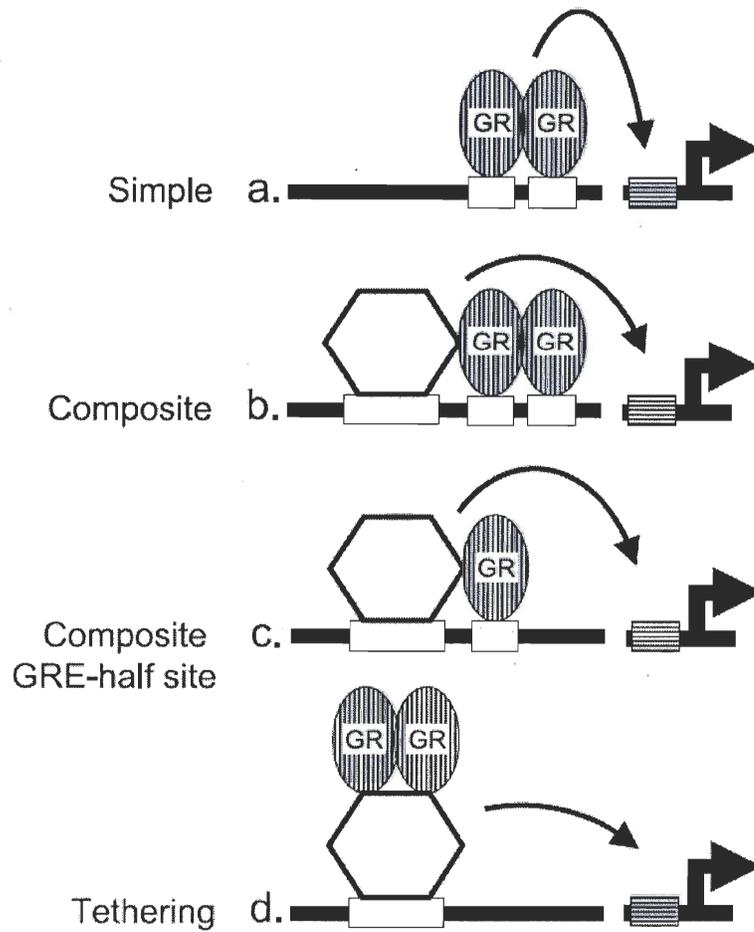
**Figure 1-4.** Structure, éléments de réponse et arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires pour les groupes NR1H et NR1I. **(A)** Schématisation d'un récepteur nucléaire, avec ses différents domaines. **(B)** Diversité des éléments de réponse des récepteurs nucléaires **(C)** Arbre phylogénétique de deux sous-familles des récepteurs nucléaires. À noter : les deux xénosenseurs CAR et PXR, NR1I3 et NR1I2 respectivement, ainsi que CXR de poulet, qui serait peut-être le gène ancestral ayant donné naissance aux deux xénosenseurs présents chez les mammifères [36]. Tirée de Handschin et Meyer [2].



De façon simplifiée, le récepteur nucléaire est normalement en complexe avec des corépresseurs. La liaison du ligand au LBD du récepteur entraînera un changement de conformation de ce dernier, le rendant actif [35]. Une fois activé, le récepteur nucléaire sera en mesure d'aller activer ou réprimer la transcription des gènes cibles dans le noyau. Bien qu'en apparence simple, la régulation génique par un récepteur nucléaire peut être très complexe. Les éléments de réponse dans l'ADN pourront varier d'un gène cible à l'autre, tout comme les facteurs accessoires agissant de concert avec le récepteur nucléaire. Comme on peut le voir à la figure 1-4B, il existe une grande diversité d'éléments de réponse. De façon générale, ceux-ci consistent en deux hémi-sites de la séquence consensus 5'-AGGTCA-3' [37]. Ces sites peuvent être séparés par un nombre variable de nucléotides et l'orientation de l'un par rapport à l'autre peut changer, qu'elle soit directe (DR), inversée (IR) ou éversée (ER) [2;37]. Il est également possible que le récepteur nucléaire ne se lie qu'à un seul hémi-site ou bien qu'il interagisse indirectement avec l'ADN en s'associant avec des facteurs accessoires.

La figure 1-5 illustre dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes (GR) les différents mécanismes d'activation transcriptionnelle. Il peut se fixer à l'ADN sous forme d'homodimère (*simple*), d'homodimère en association avec des facteurs accessoires (*composite*), de monomère en association avec des facteurs accessoires (*composite GRE-half site*) ou bien interagir indirectement avec l'ADN, avec l'aide de facteurs accessoires (*tethering*) [38].

Les récepteurs nucléaires joueront un rôle actif dans plusieurs mécanismes d'induction des CYP lors de traitement à divers types de xénobiotiques. La sous-famille à l'étude dans la cadre des recherches présentées ici, celle des *CYP2B*, n'y fait pas exception.



**Figure 1-5.** Mécanismes d'activation transcriptionnelle par le récepteur des glucocorticoïdes au niveau de ses éléments de réponse. Adaptée de Schoneveld et collaborateurs [38].

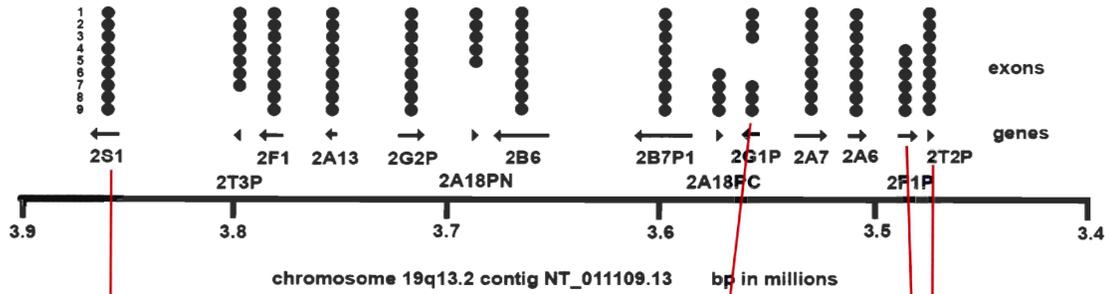
## 1.5 Sous-famille des CYP2B

### 1.5.1 Les CYP2B et la réponse au PB

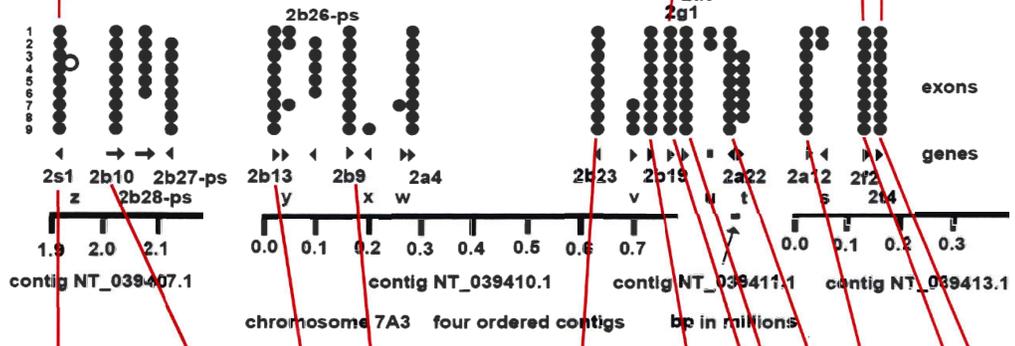
En absence d'inducteur, les gènes *CYP2B* sont transcrits à faibles niveaux dans le cerveau, les poumons, les intestins, les reins et le foie [39-42]. Dépendamment des tissus, l'expression des *CYP2B* pourra être induite à la suite de traitements avec différents xénobiotiques [39-41;43]. En effet, plusieurs membres de la sous-famille ont comme caractéristique d'être fortement induits dans le foie lors de traitement avec des composés de type PB [2;43;44]. Cette catégorie de molécule, les inducteurs de type PB, tire son nom de l'origine des premières expériences effectuées dans le but de comprendre ce mécanisme d'induction, à la base associé au PB [18;19;45]. Les inducteurs de type PB, malgré des divergences profondes dans leur structure chimique, sont mis dans une même classe parce que le patron des gènes induits est similaire (voir tableau 1-1), ainsi que les mécanismes en jeu dans leur induction [2]. Aujourd'hui, plus d'une centaine d'inducteurs sont classés dans cette catégorie [43;46].

Chez des rats Sprague-Dawley traités au PB, les gènes *CYP2B1* et *CYP2B2* sont les plus fortement induits dans le foie [44]. Les niveaux induits de la protéine CYP2B1 atteignent plus de 200 fois le niveau de base tandis que pour CYP2B2 le facteur d'induction est d'environ trente [47;48]. L'induction au PB des CYP2B est essentiellement due à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de leurs gènes [49;50]. Les *CYP2B* de rongeurs inductibles au PB, principalement *CYP2B1* et *CYP2B2* chez le rat ainsi que *Cyp2b10* chez la souris seront au cœur des recherches présentées ici, et leur parenté phylogénétique est présentée à la figure 1-6.

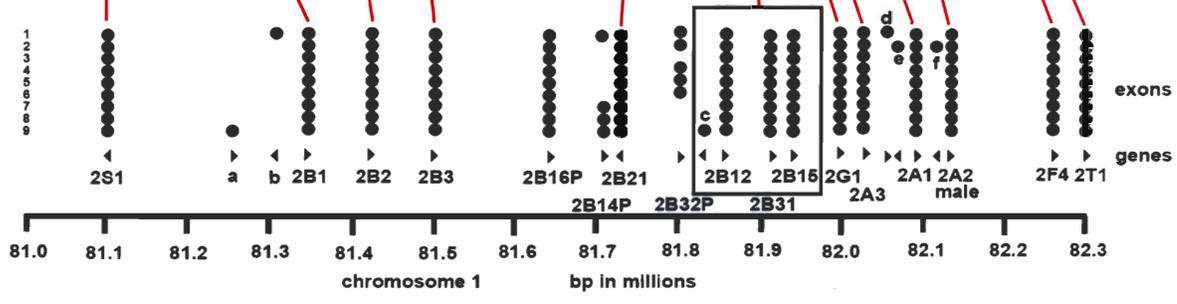
### CYP2ABFGST cluster in human



### Cyp2abfgst cluster in mouse



### CYP2ABFGST cluster in rat



**Figure 1-6.** Regroupement des gènes *CYP2* chez l’humain, la souris et le rat. Les traits rouges indiquent les gènes orthologues. Les cercles pleins indiquent le nombre d’exons, tandis que les flèches noires indiquent la direction de transcription des gènes. Tirée de [29].

À l'origine, les premières recherches sur l'induction au PB concentrèrent leurs efforts sur le promoteur proximal des *CYP2B* [51-53], probablement puisque l'induction au PB des *CYP* bactériens fut identifié comme étant liée à des sites contenus dans cette région [54]. Un site de fixation pour la CCAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP $\alpha$ ), un facteur de transcription enrichi dans le foie [55], fut entre autres décrit pour *CYP2B1* et *CYP2B2* à cette époque [56;57]. Plusieurs articles furent publiés sur les éléments de régulation positifs et négatifs intervenant dans le contrôle de la transcription des *CYP2B*, aux fonctions encore obscures aujourd'hui [52;53]. Toutefois, aucune de ces régions n'expliquait l'induction au PB.

La découverte d'un des grands chaînons manquant dans la compréhension de l'induction au PB fut la caractérisation d'un *PB-responsive element* (PBRE) dans le 5' flanquant de *CYP2B2* (voir Fig. 1-7) [58]. Il s'agit en fait d'un fragment de 163 pb, flanqué par deux sites de restriction *Sau3AI* et situé entre 2155 et 2318 pb en amont du site d'initiation de la transcription de *CYP2B2*. Trottier et collaborateurs [58] ont démontré que ce fragment conférait la réponse au PB dans des hépatocytes de rats en culture primaire et qu'il avait les propriétés d'un *enhancer* transcriptionnel : le fragment pouvait conférer la réponse au PB à un promoteur hétérologue, qui ne possédait pas d'*enhancer*, et la réponse était conservée peu importe l'orientation et peu importe qu'il soit en amont ou en aval du promoteur. Honkakoski et collaborateurs [59] ont par la suite décrit la séquence homologue au PBRE de *Cyp2b10* chez la souris en la nommant le *PB-responsive enhancer module* (PBREM). Il est à noter que le fragment qu'il définit comme le PBREM est le plus petit fragment capable de conférer la pleine réponse au PB dans des hépatocytes de souris en culture primaire, lorsque l'*enhancer* est fusionné au promoteur de base dans une construction de type rapporteur. De plus cette région représente 51 pb à l'intérieur du PBRE décrit par Trottier et collaborateurs [58] (voir Fig. 1-7).



L'équipe de Negishi a par la suite ajouté un nouvel élément essentiel, soit la démonstration que l'un des deux xénosenseurs, le récepteur nucléaire CAR, pouvait activer la transcription promu par le PBREM de *Cyp2b10* [61]. Il a par la suite été montré que CAR, sous forme d'hétérodimère avec le *retinoid X receptor* (RXR), un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires, pouvait se lier à deux sites contenus dans le PBREM, nommés NR1 et NR2 [61;62]. Ainsi ce récepteur nucléaire orphelin, appelé à l'origine MB67 [63], venait d'être associé au premier gène dont il pouvait activer la transcription. Les détails concernant l'activation par CAR seront abordés plus amplement dans la section 1.5.2. Il va de soi que ces deux éléments, l'*enhancer* PBRE ou PBREM, ainsi que CAR, allaient devenir les piliers du modèle de réponse au PB des gènes *CYP2B*.

Le groupe du Dr. Anderson rebaptisa le PBRE la PBRU, pour *PB response unit* [64]. Basée sur une appellation similaire, la *Glucocorticoid Response Unit* (GRU) du gène de la *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) [38;65], le nom PBRU impliquait la présence de plusieurs sites de liaison à des récepteurs nucléaires (jusqu'à alors NR1 et NR2) ainsi que la présence de sites accessoires. Au final, les trois sites suivants furent décrits : un site accessoire pour un facteur inconnu nommé AF1, un site de liaison pour le *nuclear factor 1* (NF1) et un *glucocorticoid response element* (un GRE; GRE-A dans la figure 1-7) putatif [64]. Par la suite, d'autres sites vinrent s'ajouter, entre autres un troisième site de liaison pour les hétérodimères CAR-RXR, nommé NR3, qui jouerait peut-être un rôle dans l'arrangement des nucléosomes chevauchant la PBRU [66;67]. D'autres facteurs furent identifiés comme pouvant se lier à des séquences de la PBRU, tels PBX-PREP1 et HNF-4, bien que le rôle de ces interactions reste plus obscure [68]. Une GRU se caractérise par la présence de plusieurs GRE ainsi que de sites pour des facteurs accessoires [38]. De plus, une GRU peut permettre d'obtenir des activations transcriptionnelles plus importantes que celles des GRE simples [38]. Ainsi, l'appellation PBRU convient aux *enhancers* transcriptionnels des gènes *CYP2B* inductibles au PB, qui remplissent toutes ces caractéristiques. Finalement, bien que les éléments de réponse clé dans la réponse au PB seraient les sites de liaison aux hétérodimères CAR-RXR, la *PBRU* contient une panoplie de sites de liaison à des récepteurs nucléaires et facteurs de transcription de toutes sortes et leurs différents rôles restent encore à découvrir.

Après les *enhancer* trouvés chez le rat et la souris, un élément similaire fut caractérisé chez l'humain dans le laboratoire de Negishi (et donc baptisé aussi *PBREM*), à 1.7 kb en amont du site d'initiation de la transcription du gène *CYP2B6* [60]. Il est intéressant de voir que cet homologue humain, bien que n'étant l'orthologue d'aucun *CYP2B* de rat ou de souris [29], contient tout de même un arrangement de sites NR similaire à celui des gènes murins. C'est-à-dire qu'il contient un site NF1, flanqué de deux sites de liaison aux hétérodimères CAR-RXR, le tout permettant de conférer la réponse au PB [60].

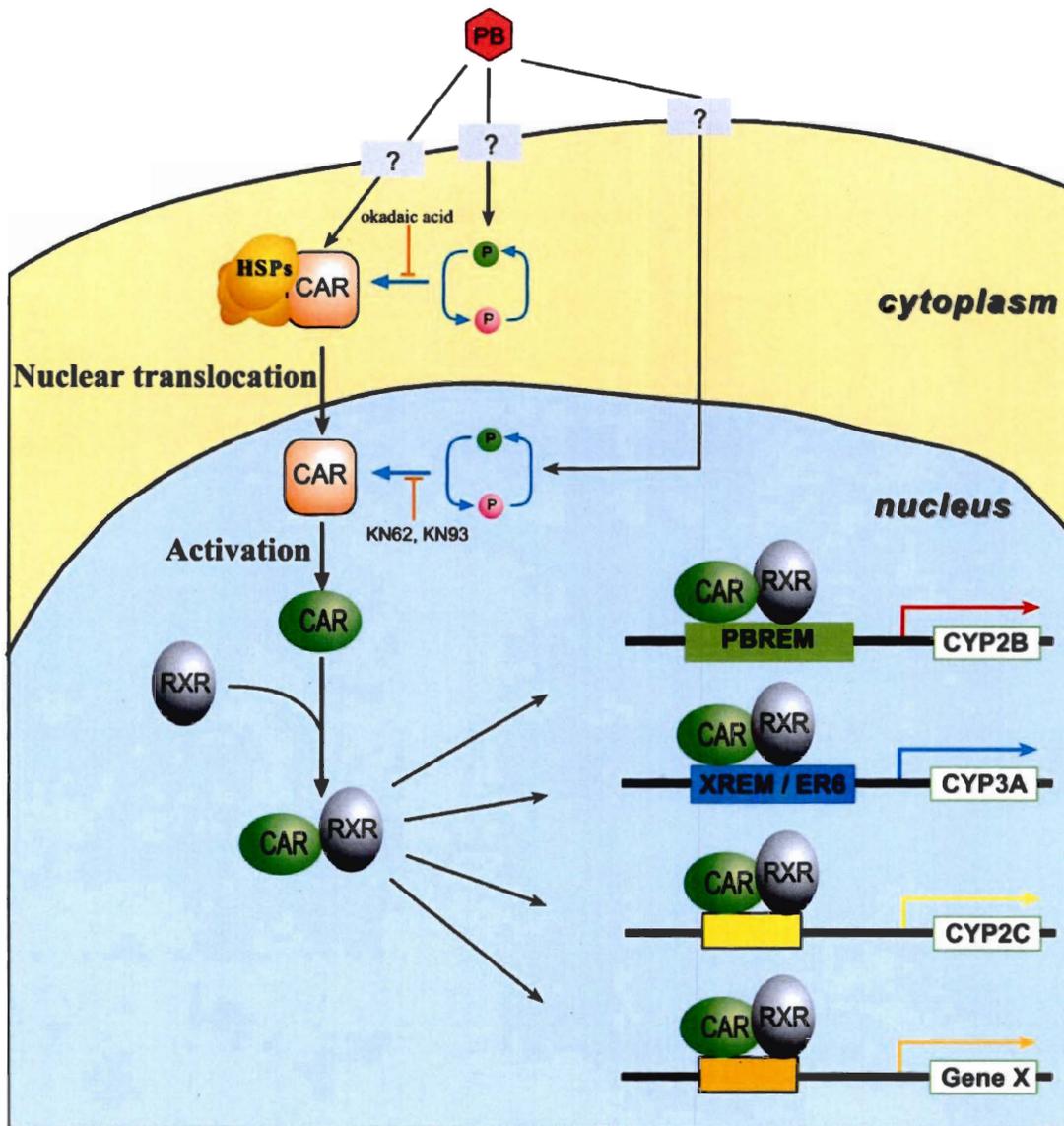
### 1.5.2 Rôle du récepteur nucléaire CAR et modèle de Negishi

CAR fut tout d'abord décrit comme un récepteur nucléaire orphelin enrichi dans le foie humain [63]. Par la suite, son lien avec la régulation au PB des *CYP2B* fut décrit chez la souris, puisqu'il pouvait activer la transcription par le PBREM et se lier à des éléments compris dans celui-ci [61;62]. Toute une série de publications s'en suivit, décrivant la régulation de l'induction au PB par ce récepteur nucléaire, jetant ainsi les bases du modèle de Negishi, modèle généralement accepté de nos jours.

Normalement, CAR se situe dans le cytoplasme des hépatocytes, dans un complexe formé avec différentes protéines chaperones, dont HSP90, pour *Heat Shock Protein 90* [69] et CCRP, pour *Cytoplasmic CAR retention protein* [70]. De plus, ce complexe serait préférentiellement fixé à la membrane plasmique, ou à tout le moins localisé près d'elle [71]. Puis, un traitement au PB a comme conséquence de déplacer CAR au noyau, ce qui entrainerait l'activation des gènes cibles par le récepteur nucléaire [72]. Puisque le PB ne se lie pas à CAR, la cellule doit « avertir » CAR de la présence du PB, ce qui se ferait par des événements de déphosphorylation selon le modèle de Negishi. La sérine 202 serait la cible directe de cette déphosphorylation, effectuée par la *protein phosphatase 2A* (PP2A), entraînant la libération de CAR du complexe cytoplasmique [72;73]. Cette déphosphorylation aurait aussi lieu lors de traitements avec le 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP)[73], un ligand agoniste de CAR de souris [62]. À noter que ces événements de déphosphorylation seraient communs à tous les inducteurs de type PB, qu'ils se lient ou non à CAR [73].

Puis, une fois dans le noyau, un mécanisme d'activation supplémentaire de CAR serait nécessaire afin que l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles puisse avoir lieu. En effet, les inhibiteurs des *calcium/calmoduline-dependant kinase* (CaMK), KN-62 et KN-93, ne bloquent pas l'accumulation nucléaire de CAR, mais empêchent l'activation transcriptionnelle par CAR [37]. De plus, la bilirubine entraîne une relocalisation de CAR du cytoplasme au noyau, où il peut par la suite activer certains gènes cibles, comme *UGT1A1* [74], mais pas les *CYP2B* [75]. Ainsi, une fois la relocalisation de CAR au noyau effectuée, des modifications supplémentaires de la protéine semblent avoir lieu, lui permettant alors d'activer la transcription de différents gènes cibles, selon le traitement [76].

Honkakoski et collaborateurs [61] ont rapporté la liaison de CAR, sous forme d'hétérodimère avec RXR, à un des deux éléments NR présents dans le PBREM. À l'époque la liaison n'a été démontrée qu'à l'élément NR1, par retard sur gel. La liaison de CAR à l'élément NR2, avec RXR, sera démontrée par la suite par retard sur gel aussi [62]. Les hétérodimères se fixeraient donc à deux sites NR contenu dans le PBREM de *Cyp2b10* [37;61;62] ou trois sites NR contenu dans la *PBRU* de *CYP2B1/2* [67;68] et il est maintenant généralement accepté que cela se produit *in vivo* aussi, en réponse au PB. Ces liaisons entraîneraient l'activation transcriptionnelle des *CYP2B* [61;62;67]. La perte d'induction au PB détectable par les méthodes conventionnelles dans les souris *CAR<sup>-/-</sup>* de *CYP2B10* est la démonstration claire et nette de l'importance de CAR dans l'induction au PB, même s'il ne s'y lie pas directement [77]. Le modèle de Negishi est résumé à la figure 1-8.



**Figure 1-8.** Modèle de Negishi sur le mécanisme d'induction au PB par le récepteur nucléaire CAR. L'acide okadaïque est un inhibiteur de phosphatase, utilisé par Hosseinpour et collaborateurs [73] pour suggérer un rôle de la PP2A dans la relocalisation de CAR au noyau. En plus des gènes *CYP2B*, d'autres gènes cibles de CAR sont identifiés, tels les *CYP3A* avec l'*enhancer* XREM. Tirée de Zelko et Negishi [37].

Ce modèle, bien qu'en apparence assez élémentaire, ne répond pas à toutes les interrogations et en s'y attardant, beaucoup de lacunes deviennent visibles. Ainsi, malgré la découverte de la *PBRU* et de la liaison de CAR-RXR à cette unité de réponse, il reste toujours un vide, facilement visible sur la figure 1-8, à la toute première étape: à quoi se lie le PB, puisque ce n'est pas à CAR? Qu'est-ce qui détecte les xénobiotiques de type PB et qui transmet le message par la suite à CAR, qui activerait la transcription des gènes cibles?

Généralement, dans les systèmes de réponse impliquant des récepteurs nucléaires, ces derniers se lient à leur ligand et cela entraîne le déclenchement du processus d'induction et les nombreuses étapes y étant associées. Le GR, par exemple, se liera aux glucocorticoïdes lorsque ceux-ci seront présents dans la cellule, enclenchant par la suite l'activation transcriptionnelle des gènes cibles [38]. Par contre, en ce qui a trait à CAR, celui-ci ne se lie pas à la majorité des inducteurs de type PB, malgré quelques exceptions, comme le TCPOBOP [62] ou le 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazole-5-carbaldehyde *O*-(3,4-dichlorobenzyl)oxime (CITCO) [78].

Dans la lignée cellulaire HepG2, la production de protéine CAR à partir d'un vecteur d'expression exogène CAR entraîne l'activation transcriptionnelle du PBREM ou de la *PBRU* lorsque ceux-ci sont fusionnés au promoteur de base de *CYP2B2* [68], de *CYP2C1* [66] ou au promoteur hétérologue *tk* [61]. Il est à noter que dans ces cellules CAR est nucléaire [70], d'où viendrait sa capacité à activer les gènes rapporteurs en l'absence d'inducteur. Par conséquent, il n'a pas besoin d'inducteur pour activer la transcription de ses gènes cibles dans des lignées cellulaires, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet d'inducteurs comme le PB. Par contre, toujours dans les cellules HepG2, CAR est incapable d'activer la transcription dépendante de la *PBRU* lorsque celle-ci est placée en contexte naturel, c'est-à-dire à 2.2 kb en amont du site d'initiation de la transcription [68]. Ces résultats laissent croire que CAR ne peut agir seul à distance. Vraisemblablement il manque dans les cellules HepG2 un ou des facteurs permettant à CAR d'activer la transcription à distance. La découverte de ces facteurs est donc importante dans la compréhension globale de l'activation par CAR.

Finalement, bien que les CYP2B soient inductibles au PB, cette sous-famille est aussi inductible par d'autres composés. Puisque les patrons de gènes induits par ces composés sont différents, il est probable que l'induction se produise par des mécanismes différents. Les glucocorticoïdes ainsi que la strychnine et la brucine, font partie des composés atypiques inducteurs des CYP2B.

### 1.5.3 Induction des *CYP2B* par les glucocorticoïdes

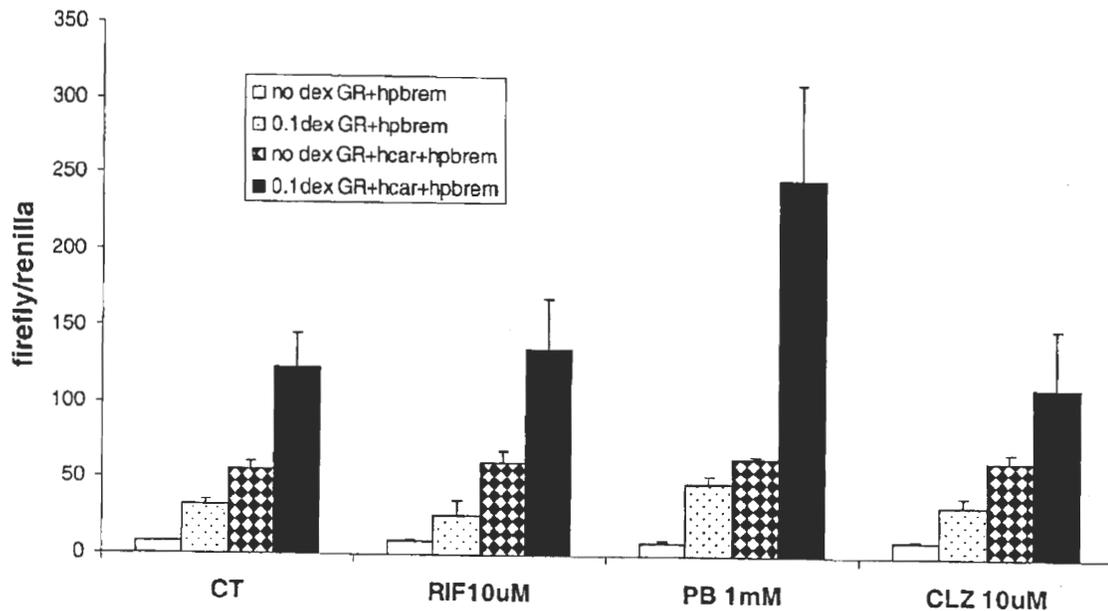
Dès lors que le séquençage de la partie proximale de la région 5' flanquante de *CYP2B2* fut publiée, un GRE putatif fut rapporté [79]. Ce GRE fut par la suite décrit comme fonctionnel [80]. Cet élément de réponse, caractérisé comme pouvant répondre fortement dans des cellules en culture à la DEX, un glucocorticoïde synthétique, resta pourtant dans l'ombre. Puisque les *CYP2B* étaient reconnus comme les gènes les plus fortement induits par des inducteurs de type PB [43;44] comprendre les mécanismes de l'induction aux glucocorticoïdes n'était apparemment pas la priorité dans ce domaine. Qui plus est, avec la découverte peu de temps après de la PBRU (à l'origine le PBRE) [58], ainsi que de la fixation des hétérodimères CAR-RXR à certains sites compris dans l'*enhancer* des *CYP2B* [61;62;67;68], peu d'études ont été effectuées sur l'implication des glucocorticoïdes dans la régulation des *CYP2B*. Pourtant, non seulement un GRE avait été décrit pour *CYP2B2*, mais le potentiel inducteur de la DEX sur CYP2B1 et CYP2B2 était connu [81;82], et il était connu que pour CYP2B10 le potentiel d'induction par la DEX était aussi fort que celui du PB [83;84]. CYP2B10 fut aussi décrit comme étant inductible par deux autres glucocorticoïdes, l'hydrocortisone ainsi que la corticostérone [39]. La régulation transcriptionnelle des *CYP2B* par la DEX n'était donc plus à démontrer, tandis que le mécanisme de réponse restait à clarifier.

Dans un ordre d'idées similaires, il fut démontré qu'afin d'avoir des hépatocytes où l'induction au PB des *CYP2B* est possible, la DEX était un pré-requis [85;86]. En effet, les hépatocytes en culture primaire répondent peu au PB, à moins que de la DEX soit présente dans le milieu de culture [85;86], établissant un lien entre la voie de réponse aux glucocorticoïdes et la réponse au PB. Cette réponse, rendue possible grâce à la DEX, pouvait être bloquée par le RU486 [87;88], un antagoniste du GR [89]. Ainsi, il semblerait

bien que deux voies de régulation distinctes soient reliées à l'expression des *CYP2B* : celle du PB ainsi qu'une autre, activée par les glucocorticoïdes, probablement la voie du GR.

En ce qui a trait à *CYP2B6*, seul gène humain de la sous-famille *CYP2B*, l'activité transcriptionnelle du *PBREM* de ce gène peut aussi être influencée par la DEX [90]. En effet, les expériences effectuées par Wang et collaborateurs [90] montrent que l'activation de la voie du GR par la DEX peut augmenter l'induction par des ligands de PXR ou l'activation par CAR d'un rapporteur contenant le *PBREM* de *CYP2B6* dans des hépatocytes humains en culture primaire ainsi que dans la lignée HuH7 (figure 1-9). Dans la figure 1-9, on remarque tout de suite qu'en présence de GR et de DEX, il y a activation du rapporteur, donc induction. Il est surprenant de voir que les auteurs concluent que le GR n'agit pas directement sur le *PBREM* de *CYP2B6*, mais plutôt que la voie du GR activée augmenterait l'activation par CAR. Pourtant, comme on peut le voir, lorsqu'il y a seulement du GR et qu'on y ajoute de la DEX, il y a bien induction du gène rapporteur.

Schuetz et collaborateurs [91] ont publié des résultats de recherches effectuées dans des souris où le GR avait été le sujet d'une inactivation ciblée. Dans ces souris, plus aucune induction à la DEX de *CYP2B10* n'était observée, suggérant encore une fois l'implication essentielle de la voie du GR dans la régulation des *CYP2B*. De plus, l'inactivation de cette voie avait un impact sur la réponse au PB, puisque les niveaux induits de *CYP2B10* au PB dans les souris  $GR^{-/-}$  n'était que de 63% de ceux dans les souris  $GR^{+/+}$  [91]. Ces différents éléments démontrent clairement que la voie de réponse aux glucocorticoïdes, passant par le GR, est importante dans la régulation des *CYP2B*. Non seulement la voie du GR semble capable d'induire les *CYP2B*, mais elle semble aussi essentielle à l'obtention d'une réponse au PB dans les hépatocytes en culture primaire [85;86] et d'une réponse maximale au PB dans le foie de souris [91]. Finalement, Pascussi et collaborateurs ont établi un lien direct entre la voie du GR et celle de l'induction au PB : lorsque la voie du GR est activée dans des hépatocytes humains en culture primaire, par exemple en réponse à un traitement à la DEX, la transcription de CAR est augmentée [92;93].



**Figure 1-9.** Influence de la voie du GR sur l'activité transcriptionnelle du *PBREM* de *CYP2B6* dans des cellules en culture. Le rapporteur contient le *PBREM* de *CYP2B6* fusionné au promoteur *tk*. Les différents traitements ont été effectués dans des cellules HuH7, une lignée dérivée d'hépatocytes humains. L'activation du rapporteur a été déterminée selon différents traitements avec des inducteurs de *CYP2B6*, et en présence de GR, DEX ou de CAR. Adaptée de Wang et collaborateurs [90]

Qui plus est, Pascussi et collaborateurs ont observé que la DEX augmente la rétention de CAR dans le noyau [92]. Ils en ont conclu que GR contrôle non seulement la production de CAR, mais aussi sa rétention dans le noyau suite à des traitements au PB. Bien que n'expliquant pas nécessairement l'induction à la DEX des *CYP2B*, ces expériences montrent un lien important entre les deux voies de régulation et cela pourrait être un début d'explication à savoir pourquoi l'induction au PB est diminuée dans des souris où le GR a été inactivé. Finalement, CAR fut exclu comme étant nécessaire à l'induction à la DEX dans les souris, puisque dans les souris  $CAR^{-/-}$  l'induction à la DEX de *CYP2B10* est conservée et le niveau induit est apparemment le même que dans les souris sauvages [94].

La DEX, bien que mentionnée plus haut comme étant un ligand du GR, est aussi un ligand agoniste de PXR de souris et d'humain [95;96]. PXR, le second xénosenseur, aurait peut-être la même origine évolutive que CAR [36]. En fait, les deux xénosenseurs seraient issus d'une duplication d'un xénosenseur ancestral, et tous les mammifères vérifiés possèdent les deux, indiquant que la duplication du gène ancestral aurait eu lieu peu de temps avant ou après leur séparation des autres ordres de vertébrés. Peut-être un vestige de leur origine commune, PXR et CAR peuvent *in vitro* se lier à leurs différents éléments de réponse, ce qui laisse à penser qu'il pourrait y avoir des interactions entre les deux voies [97]. Autrement dit, puisque la DEX est un ligand de PXR, il est possible que ce récepteur nucléaire intervienne dans l'induction à la DEX des *CYP2B*, ce qui sera aussi à l'étude dans les travaux présentés dans le cadre de ce mémoire.

#### **1.5.4 Le cas de la strychnine et de la brucine**

Le cas de l'induction à la strychnine et à la brucine, deux molécules provenant de l'arbre *Strychnos nux-vomica* [24], est intrigant. En effet, ces deux composés sont des inducteurs non seulement de *CYP2B1* et *CYP2B2* chez le rat [98], mais ils induisent aussi *CYP2B3* (voir la figure 1-6) [99]. Ce dernier est exprimé de façon constitutive et n'est pas inductible par les composés de type PB [100]. En fait, son niveau serait même diminué à la suite d'un traitement au PB [100]. De plus, étant donné la faible conservation de la *PBRU* (Paquet Y. et Anderson A., observations non publiées), qui semble plus être un vestige d'un

événement de duplication génique qu'un véritable système de contrôle de la transcription, *CYP2B3* semblait ne pas être la cible d'aucun inducteur connu. Dans cette optique, le cas de la brucine et de la strychnine est des plus intéressants. Ainsi, malgré l'absence d'une PBRU fonctionnelle, il semble que d'autres éléments de régulation soient présents pour *CYP2B3* et que ceux-ci soient communs à *CYP2B1* et *CYP2B2*. Puisque la strychnine a un patron de *CYP2B* induits différents du PB, il est peu probable que les mécanismes d'induction soient les mêmes pour les deux types de xénobiotiques. Ces résultats suggèrent donc qu'il y a un troisième mécanisme d'induction des gènes *CYP2B*.

## **1.6 Projets de maîtrise**

### **1.6.1 Étude du rôle de CAR dans la réponse au PB**

Le chapitre II présente les deux premiers projets réalisés dans le cadre de ma maîtrise : 1) un essai d'obtenir une lignée cellulaire répondant au PB et 2) l'utilisation de la voie des microARN afin de dégrader spécifiquement l'ARNm de CAR chez le rat. Ces deux projets furent effectués dans le but d'étudier le rôle de CAR. Dans le premier cas, l'objectif était de faciliter l'étude du rôle joué par ce récepteur nucléaire dans la réponse au PB en misant sur le fait qu'une lignée cellulaire qui répondrait au PB fournirait un modèle expérimental bien plus facile à étudier qu'un animal complet ou que des hépatocytes en culture primaire. Dans le deuxième, l'objectif était de calquer en quelque sorte les souris *CAR<sup>-/-</sup>*. En effet, l'idée était d'utiliser des microARN et de les injecter par intraveineuse dans la queue de rat, technique permettant à l'ADN nu de pénétrer les hépatocytes. Cela nous aurait permis de voir la conséquence *in vivo* de l'inactivation de CAR, puisque, à l'époque nous n'avions pas de souris *CAR<sup>-/-</sup>*, ou bien de nous en servir dans les cellules répondant au PB obtenues au cours de la première étape mentionnée ci-dessus.

### **1.6.2 Décortication de la réponse à la DEX des *CYP2B***

À la suite de la lecture des travaux de Wang et collaborateurs [90] et de ceux de Schuetz et collaborateurs [91], il était devenu évident que le GR intervenait dans la

régulation des gènes *CYP2B*. Par conséquent, des démarches ont été effectuées afin d'obtenir un vecteur d'expression du GR (pSG5-hGR, fourni par J.M. Pascussi) pour pouvoir effectuer des expériences d'induction à la DEX dans des cellules en culture. Puisque les hépatocytes nécessitent de la DEX dans leur milieu de culture, les expériences ont été effectuées dans deux lignées cellulaires différentes : les cellules HepG2, une lignée dérivée d'un hépatocarcinome humain, et les cellules H4IIEC3, une lignée dérivée d'un hépatocarcinome de rat.

La pertinence de ces travaux, présentés dans le cadre des chapitres III et IV est que si le rôle du GR dans l'induction à la DEX des *CYP2B* est confirmé, cela démontrera une nouvelle voie de régulation de cette sous-famille. Il va de soi que c'était une occasion à ne pas manquer.

### **1.6.3 Induction à la strychnine**

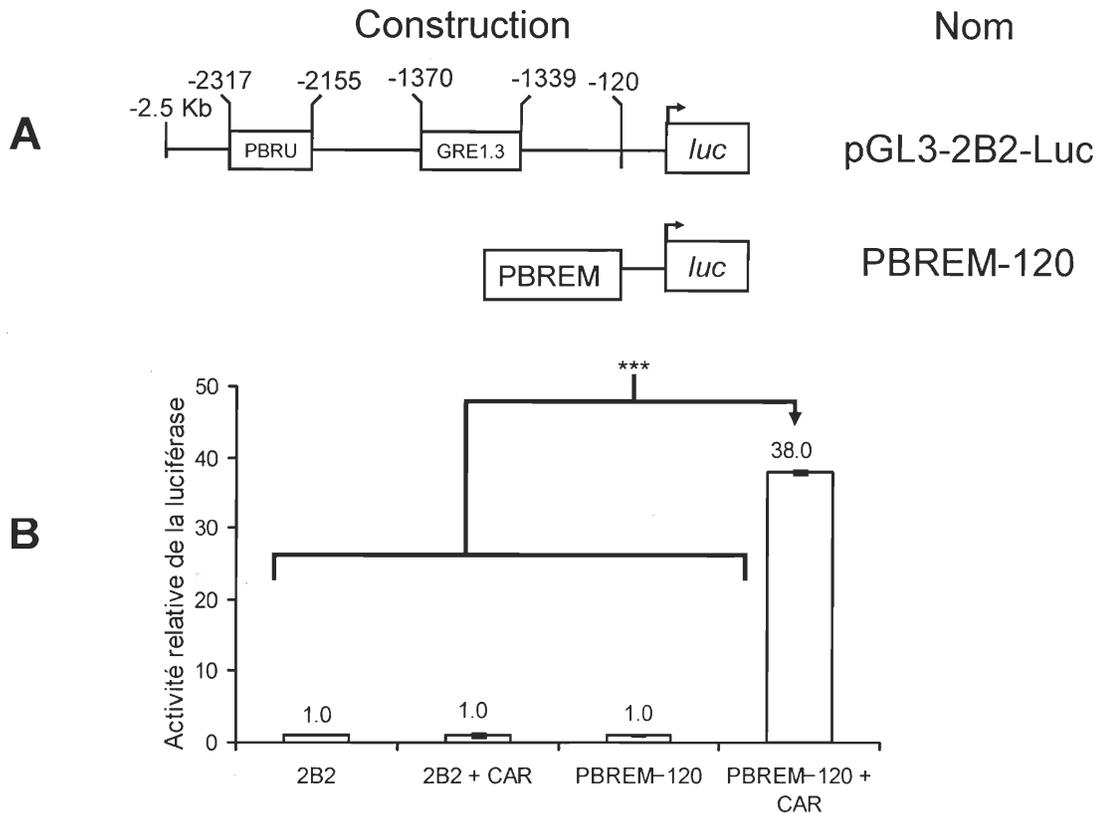
Des études sur l'induction à la strychnine furent effectuées dans des hépatocytes en culture ainsi que dans des souris sauvages et *CAR*<sup>-/-</sup>. Le but était de vérifier l'induction des *CYP2B* de souris à ce produit et de voir, dans le cas où l'induction était conservée, si *CAR* avait un rôle à jouer dans le mécanisme d'induction. Bien que ce volet ne fasse pas le sujet d'un chapitre, le lecteur est invité à regarder les résultats présentés à l'annexe 2.

## 2. Chapitre II – Étude du rôle de CAR dans la réponse au PB

### 2.1 Essai d'obtention d'une lignée cellulaire répondant au PB

#### 2.1.1 Absence de réponse au PB dans les lignées cellulaires

L'absence de lignée cellulaire dans laquelle les gènes *CYP2B* répondraient au PB est une contrainte de plus à l'étude de la réponse des hépatocytes face au traitement à divers xénobiotiques [101]. En effet, le gène *CYP2B6* présent dans les cellules HepG2 ne répond pas, ou très faiblement, au PB [60]. Ces cellules sont souvent utilisées comme modèle d'étude des mécanismes d'activation transcriptionnelle par CAR [60;61;66-68;101;102]. Les cellules HepG2 n'ont pas ou peu de CAR, et lorsqu'un vecteur d'expression pour cette protéine est transfectée, les protéines nouvellement synthétisées vont directement au noyau [70;72]. En plus de l'absence d'induction, la *PBRU* de *CYP2B2* en contexte naturel, à -2.2 kb dans la région 5' flanquante du gène, n'est pas activable par CAR dans les cellules HepG2, contrairement à lorsqu'il est placé directement en amont du promoteur de base (figure 2-1) [68]. L'objectif était donc d'obtenir une lignée cellulaire, dérivée des cellules HepG2, qui aurait pu répondre au PB de façon comparable aux hépatocytes en culture primaire (quelques dizaines de fois le niveau de base) et si possible lorsque la *PBRU* est placée dans son contexte naturel (Figure 2-1A).

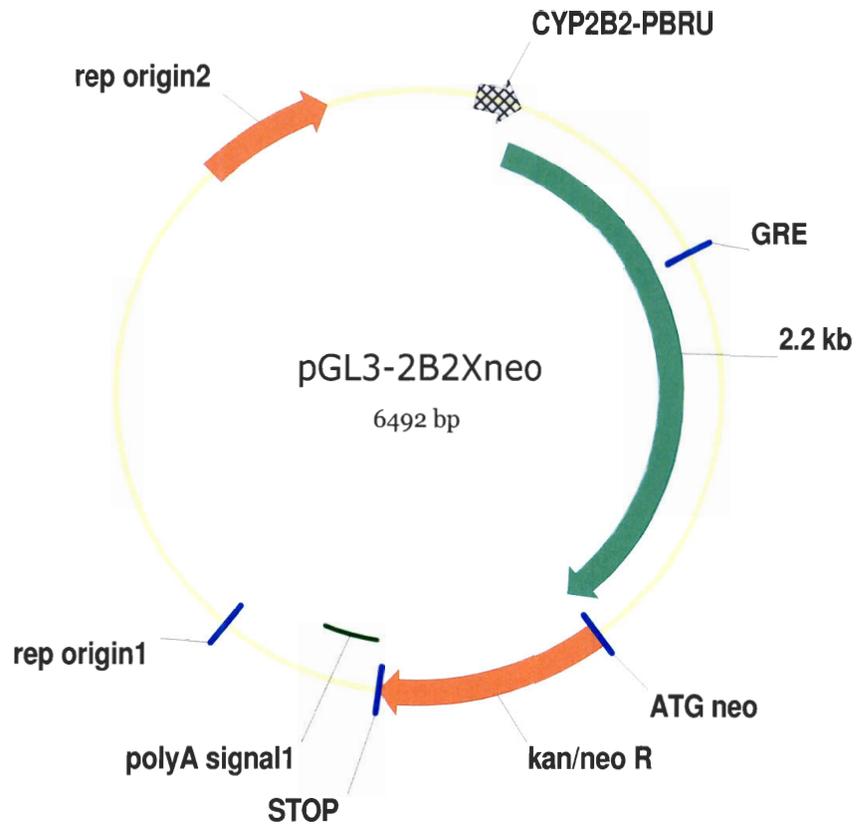


**Figure 2-1.** Absence d'activation par CAR lorsque l'*enhancer* est placé en contexte naturel. **(A)** Représentation schématique des rapporteurs pGL3-2B2-Luc et PBREM-120 [103]. La première construction contient les premiers 2.5 kb de la région 5' flanquant de *CYP2B2*, avec la PBRU à -2.2 kb ainsi que le GRE défini par Jaiswal et collaborateurs [80] à -1.3 kb. Le PBREM-120 contient le PBREM de souris et qui est fusionné au promoteur de base de *CYP2B2*. Le promoteur de base de *CYP2B2* est composé des 120 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. **(B)** Activation transcriptionnelle du rapporteur PBREM-120, mais pas de pGL3-2B2-Luc (identifié ici comme 2B2), par CAR. L'activité relative de la luciférase a été remise par rapport au rapporteur cotransfecté avec un vecteur d'expression vide. Le triple astérisque (\*\*\*) indique une différence significative ( $p < 0.001$ ) avec les trois autres traitements. La figure en (B) représente la moyenne des résultats de 3 expériences indépendantes avec les écarts types. Ces résultats sont conformes à ceux de Beaudet et collaborateurs [68].

Une lignée cellulaire répondant au PB a été obtenue à partir de cellules HepG2 par l'équipe de Wolf [101]. Cette lignée, WGA, a été obtenue en sélectionnant des cellules HepG2 ayant un phénotype différencié, le tout par une sélection métabolique; cependant elle n'est plus disponible (C.R. Wolf, communication personnelle). Malgré la présence d'induction dans cette lignée cellulaire, la réponse au PB restait modeste. Les taux induits représentent environ 4 fois le niveau de base, comparativement à des inductions d'un facteur de plus de 50 dans des hépatocytes de rats en culture primaire [103]. De plus, il semble que ce soit l'augmentation de CAR dans cette lignée qui en soit responsable. En effet, le niveau de CAR est environ 20 fois plus élevé dans les cellules WGA [101]. Deux constats majeurs ressortent donc de ces résultats : des cellules répondant modestement au PB et dérivées des cellules HepG2 peuvent être obtenues et CAR semble jouer y un rôle important.

### 2.1.2 Stratégie employée

Afin d'essayer d'obtenir une lignée cellulaire dérivée des cellules HepG2 qui répondrait au PB, deux constructions furent utilisées : pGL3-2B2Xneo et pGL3-PBREM-120neo. La première, pGL3-2B2Xneo, comporte le gène de résistance au G418, *neo*, dont l'expression est contrôlée par la PBRU de *CYP2B2* en contexte naturel. La deuxième comporte encore une fois le gène *neo*, mais cette fois-ci c'est le PBREM de souris fusionné au promoteur de base de *CYP2B2* qui contrôle son expression. Afin de construire ces deux rapporteurs, le gène *neo* fut amplifié par PCR à partir du vecteur p4TO (Invitrogen). Des sites de restriction, *Hind*III et *Fse*I, furent ajoutés en 5' et en 3' du fragment par les amorces. Par la suite, le fragment amplifié fut digéré avec les enzymes de restriction afin de former des extrémités cohésives. Les rapporteurs pGL3-2B2-Luc et PBREM-120 furent aussi digérés afin d'enlever le gène *luc* (voir la figure 2-1A). Les fragments contenant le gène *neo* et les plasmides sans *luc* furent purifiés sur gel d'agarose et reliés à l'aide de la *T4 DNA ligase*. Le clonage moléculaire subséquent a permis la purification du vecteur pGL3-2B2Xneo, dont la carte est illustrée à la figure 2-2, ainsi que du vecteur PBREM-120neo.



**Figure 2-2.** Carte du vecteur pGL3-2B2Xneo. À noter que le plasmide contient aussi un gène de résistance à l'ampicilline, contrôlé par un promoteur bactérien.

La raison du choix de ces deux constructions est fort simple : le PBREM dans la construction PBREM-120 peut être activé dans des HepG2 (en leur ajoutant CAR), contrairement à la PBRU en contexte naturel, comme dans le vecteur pGL3-2B2-Luc (figure 2-1B) [68]. De préférence, c'est cette capacité que nous voulons obtenir avec nos lignées cellulaires. L'idée était que, lors de cotraitement au G418 et au PB, les cellules ayant la réponse au PB la plus élevée allaient pouvoir activer plus fortement la transcription du gène *neo* et ainsi pouvoir résister plus fortement au G418. La sélection avec les deux plasmides aurait permis de 1) sélectionner un transfectant stable répondant au PB (par exemple à partir des cellules transfectées avec le PBREM-120 et 2) sélectionner un transfectant stable répondant au PB lorsque la PBRU est dans son contexte naturel, avec le vecteur pGL3-2B2Xneo.

### 2.1.3 Méthodologie utilisée pour les sélections

Les cellules HepG2 étaient traitées à la trypsine et étalées à raison de 2 millions de cellules par contenant de 10 cm pour la transfection. Le lendemain, les milieux de transfection étaient préparés : 32  $\mu$ L de l'agent de transfection *Superfect* (Invitrogen) et 4  $\mu$ g de vecteur contenant le gène *neo*. L'ADN et l'agent de transfection ont été mélangés dans 100  $\mu$ L de milieu B [104], laissés pendant 15 min à la température de la pièce puis mis dans 1.2 mL de milieu B avec 10% de sérum fœtal de bœuf (FBS) suivi d'une brève agitation au vortex. Tout le mélange fut par la suite déposé, goutte à goutte, dans le contenant de transfection, à raison d'un mélange par contenant de 10 cm de diamètre. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été traitées de nouveau à la trypsine et ré-étalées avant de commencer la sélection, 16 heures plus tard. Plusieurs traitements différents ont été effectués pour essayer d'obtenir de la lignée désirée.

- I. **Traitement au G418 sans inducteur.** Différentes quantités de G418 furent incorporées dans le milieu de culture B, contenant 10% de FBS (600  $\mu$ g/mL, 800  $\mu$ g/mL, 1000  $\mu$ g/mL, 1500  $\mu$ g/mL, 2000  $\mu$ g/mL, 3000  $\mu$ g/mL, 4000  $\mu$ g/mL). Les cellules étaient régulièrement rincées au tampon HEPES (décrit dans la section Matériels et méthodes du chapitre III) et du milieu frais avec G418 était rajouté par la suite.

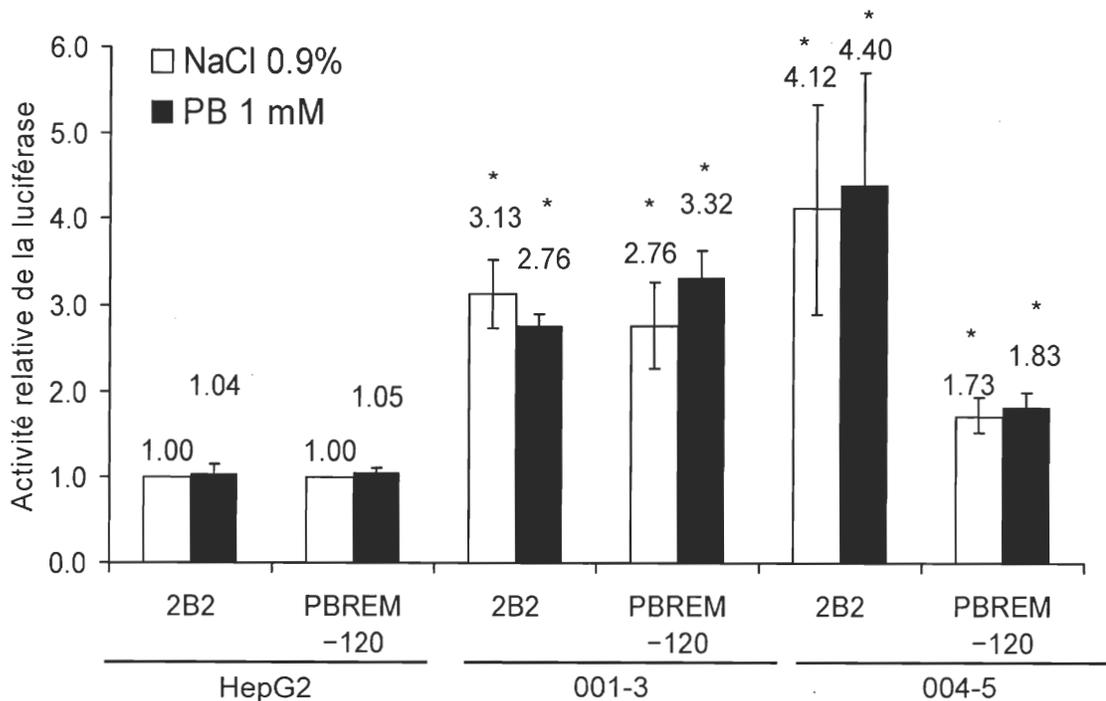
- II. **Traitement au G418 avec inducteur.** Même procédé que décrit ci-dessus, à la différence que du PB était ajouté au milieu de sélection. Les concentrations utilisées de G418 avec PB (0.1 ou 5 mM) furent : 800 µg/mL, 1000 µg/mL et 2000 µg/mL.
- III. **Double sélection.** Traitement des clones obtenus à des concentrations faibles de G418 (600 et 1000 µg/mL) suivis d'une sélection à concentration élevée de G418 (2000 à 4000 µg/mL) contenant du PB à 2 mM. Autrement dit il y avait deux sélections, la première à faible concentration et la deuxième à concentration élevée en présence d'inducteur.

Une fois les différentes sélections effectuées, ce qui prenait généralement quelques semaines, les clones obtenus étaient traités à la trypsine et séparés les uns des autres (car plusieurs clones ont été obtenus par contenant de culture). La croissance de ces derniers fut favorisée en les laissant croître dans un milieu avec une concentration réduite de G418, soit de 600 µg/mL. Lorsque la population d'un clone était en quantité suffisante (quelques millions de cellules), des tests de réponse au PB étaient effectués, afin de vérifier si les cellules avaient acquis la capacité d'y répondre. Plus de trente clones ont été testés au moins une fois. Pour la vérification de la réponse au PB, les clones étaient traités à la trypsine et étalés de nouveau, à raison de 200 000 cellules par puits de 10 mm dans 1 mL de milieu B avec FBS. Le lendemain, la transfection de 800 ng de pGL3-2B2-Luc ainsi que de 10 ng de *Renilla luciferase* par puits fut effectuée, telle que décrite au début de la présente section. Après 24 heures, les cellules étaient rincées à l'HEPES et du milieu frais contenant du PB, à une concentration de 2 mM, était ajouté. Après le traitement de 24 heures, les cellules étaient récoltées dans 400 µL de tampon de lyse passif et l'activité de la luciférase dosée avec la trousse *Dual-Luc* (Promega). Les clones testés le furent avec les rapporteurs pGL3-2B2-Luc et PBREM-120 (voir la figure 2-1A).

#### 2.1.4 Résultats

Des dizaines de clones furent obtenus et récoltés dans le cadre des différents traitements. Par contre, il est intéressant de noter que les traitements les plus sévères – ceux pour lesquels un plus petit nombre de clones était obtenu – furent ceux avec inducteur. Il semble donc que le PB n'eut pas l'effet escompté, au contraire. Le premier type de traitement, sans inducteur, fut le plus efficace. Comme la figure 2-3 le démontre pour deux différents clones, transfectés avec les rapporteurs pGL3-2B2-Luc et pGL3-PBREM-120, aucune réponse au PB ne fut obtenue.

Il s'agit là évidemment de résultats partiels, puisque tous les résultats obtenus ne sont pas montrés à la figure 2-3, mais la plupart des clones démontraient un patron similaire; une augmentation des niveaux de base des rapporteurs de *CYP2B* par rapport au HepG2, sans induction au PB. Ce qui a causé l'augmentation des niveaux de base au niveau moléculaire est inconnu. Il se pourrait par exemple qu'il y ait eu une augmentation des niveaux de CAR dans les cellules sélectionnées, comme ce fut le cas dans la lignée WGA [101]. Il se peut aussi que les niveaux protéiques de facteurs de transcription influençant l'expression des niveaux de base des *CYP2B*, comme C/EBP $\alpha$  [56], aient été augmentés dans les clones isolés. Par contre, étant donné les résultats négatifs de ce projet, cette question ne fut pas approfondie.



**Figure 2-3.** Activation transcriptionnelle des rapporteurs *CYP2B* dans deux transfectants stables différents. Le clone 001-3 a été isolé de cellules transfectées avec le pGL3-PBREM-120 et sélectionnées dans du milieu B + 600 µg/mL de G418. Le clone 004-5 a été isolé de cellules transfectées avec pGL3-2B2Xneo et sélectionnées dans du milieu B avec 1000 µg/mL + 0.1 mM de PB. Les astérisques (\*) indiquent une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les colonnes marquées et leur colonne correspondante pour les cellules HepG2 normales (test *t* de Student). Chaque colonne représente la moyenne de deux expériences indépendantes avec les écarts types.

### 2.1.5 Conclusion

Bien qu'aucune lignée cellulaire répondant au PB n'ait pu être obtenue par les différentes sélections, force est de constater qu'il fut possible d'optimiser les niveaux de base et, bien que moins intéressant que les niveaux induits, cela démontre tout de même un pas dans la bonne direction. Toutefois, de nouvelles stratégies devront être développées afin de pouvoir espérer obtenir une lignée cellulaire répondant au PB.

## 2.2 Développement de shRNA ciblant spécifiquement l'ARNm de CAR

### 2.2.1 Intérêt de l'inactivation de CAR

La découverte des microARN et de l'interférence à l'ARNm (RNAi) ces dernières années a permis le développement d'un outil de travail au potentiel énorme [105;106]. Ces courts ARN non codants ont la capacité d'aller s'associer à des ARNm spécifiques et d'entraîner l'inhibition de leur traduction ou leur dégradation par des mécanismes cellulaires naturels, le tout bloquant la production d'une protéine cible [105]. Cette voie de dégradation d'ARNm peut être utilisée à des fins expérimentales, en se servant de siRNA (*short interfering RNA*), qui sont de courts ARN non codants bicaténaires synthétiques [106;107]. Ces derniers peuvent cibler des ARNm spécifiques et entraîner leur dégradation par les voies endogènes utilisées par les microARN. Une nouvelle génération de ces ARN non codants a été développée, des shRNA, qui sont comme les siRNA, mais qui possèdent une boucle reliant les deux brins d'ARN à l'une de leurs extrémités [106;108]. Dans les deux cas, les ARN se composent d'un brin sens et d'un brin antisens, appariés ensemble pour former l'ARN double brin. C'est le brin antisens qui s'hybride avec l'ARNm cible afin d'entraîner sa dégradation [107].

Une fois le shRNA ciblant l'ARNm de CAR développé, l'approche préconisée était de l'injecter par intraveineuse dans la queue de rat afin de voir *in vivo* l'impact de la diminution marquée de CAR sur la réponse au PB des *CYP2B*. L'idée générale était de voir

si en réduisant la quantité de CAR, on réduirait de la même façon le taux d'induction ou si le taux d'induction resterait le même tandis que les niveaux basal et induit seraient diminués dans des proportions similaires. De tels résultats avaient justement été rapportés dans des souris CAR<sup>-/-</sup>. En effet, Slitt et collaborateurs [109] ont montré que dans des souris CAR<sup>-/-</sup>, le taux d'induction de l'ARNm de CYP2B10 à l'oxyde de *trans*-stilbène (TSO) reste identique à celui obtenu dans des souris sauvages (voir le tableau 2-1). Par contre, les niveaux protéiques de CYP2B10 dans les souris CAR<sup>-/-</sup> sont beaucoup plus faibles que chez les souris sauvages. Ainsi, il semblerait que CAR ne soit pas responsable du taux d'induction, mais qu'il agisse en tant qu'amplificateur des niveaux de base et induit. L'idée était donc de mimer des rats CAR<sup>-/-</sup> à l'aide du shRNA afin de voir si un tel impact sur la réponse pouvait être observé. Si tel était le cas, des modifications importantes auraient dû être apportées au modèle de Negishi afin de l'ajuster face à ces nouveaux résultats.

**Tableau 2-1.** Effet de l'administration de TSO sur le niveau de l'ARNm du gène *Cyp2b10* chez des souris  $CAR^{+/+}$  et  $CAR^{-/-}$ . Adapté de Slitt et collaborateurs [109].

	$CAR^{+/+}$		$CAR^{-/-}$	
	Non-traitées	Traitées avec TSO	Non-traitées	Traitées avec TSO
CYP2B10*	14.5±1.0	426.5±8.0	1.6±0.2	54.6±1.3
Facteur d'induction	29.4		34.1	

\*Les valeurs correspondent à des intensités lumineuses proportionnelles à la quantité d'ARNm présent dans les cellules.

### 2.2.2 Stratégies développées

L'approche choisie était d'utiliser des lignées cellulaires afin de pouvoir rapidement développer le shRNA contre CAR, et ce pour plusieurs raisons. Premièrement, étant donné les difficultés liées à l'injection d'ADN nu dans la veine de la queue de rat, il a été décidé de développer le shRNA dans des cellules en culture. Deuxièmement, la transfection d'hépatocytes en culture primaire n'est pas très efficace; seulement un faible pourcentage de cellules aurait pu être transfectées avec le shRNA et les effets au niveau protéique aurait été très difficiles à voir (si seulement 2% des cellules subissent l'inactivation de CAR, même s'il n'y avait plus de CAR cela serait difficile à montrer par transfert de type *Western*). Finalement, les HepG2 n'ont pas ou peu de CAR [68;110;111]. Par conséquent, la cotransfection de CAR exogène et du shRNA ciblant celui-ci était un moyen efficace de voir la diminution directe de la protéine visée. Grâce à une efficacité de transfection élevée dans cette lignée cellulaire et à une absence de CAR endogène, l'effet sur la protéine aurait pu être observé par la suite, par transfert de type *Western* par exemple.

### 2.2.3 Méthodologie

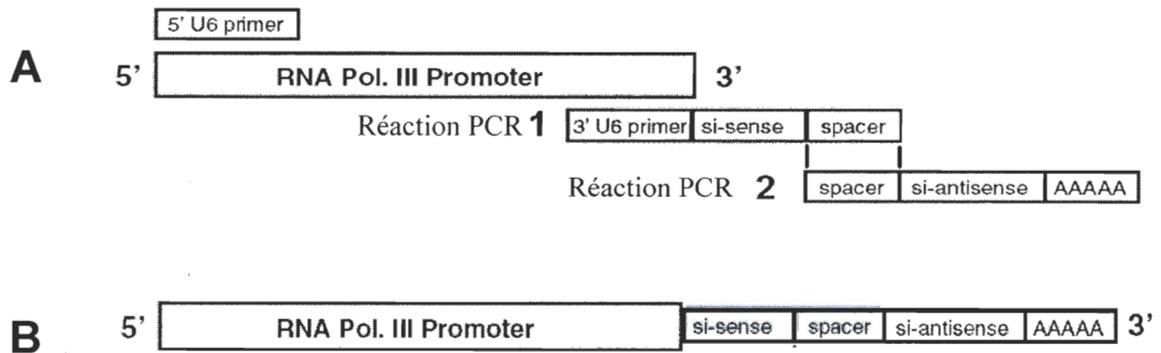
#### Vecteurs d'expression et plasmides rapporteurs

Au lieu de transfecter des shRNA nus, il a été décidé de transfecter des cassettes d'expression de shRNA, des SEC. Celles-ci avaient l'avantage d'être plus stables dans les cellules que les siRNA ou les shRNA seuls. De plus, une SEC, une fois pénétrée dans la cellule, pouvait produire une grande quantité de shRNA, ce qui palliait au problème potentiel d'une transfection trop peu efficace de shRNA, ce qui aurait entraîné un effet interférant plus modeste.

Les SEC ont été produites par la méthode décrite par Castanotto et Rossi [112] (voir la figure 2-4) et les séquences utilisées ont au départ été basées sur des banques de données de séquences putatives [113;114]. L'obtention de ces cassettes d'expression est bien simple, il suffit de faire deux amplifications consécutives par PCR. Lors de chacune d'elles, une courte séquence est ajoutée en 3' du fragment amplifié. Par conséquent, on ajoute

successivement le brin sens et le brin antisens du shRNA en 3' du promoteur U6 humain, ce qui créera une sorte de petit plasmide linéaire : une SEC. Castanotto et Rossi nous ont généreusement fourni leur vecteur pTZU6+1 [112] et il a servi de matrice pour la première réaction PCR, afin d'amplifier le promoteur U6 humain. Par conséquent, la transcription des shRNA sera promue constitutivement par le promoteur U6 dans les cellules transfectées. Ce promoteur est actif dans toutes les cellules de mammifères [115] et est donc tout à fait indiqué pour une étude dans des cellules de souris, de rats ou d'hépatocarcinomes humains.

L'un des problèmes majeurs rencontrés lors de ce projet fut de trouver une alternative à la détection de la protéine CAR par transfert de type *Western* puisque les anticorps commerciaux la ciblant sont très peu satisfaisants. Ainsi, deux rapporteurs différents ont été développés afin de résoudre ce problème. Premièrement, un vecteur d'expression pour la protéine de fusion GFP-CAR (GFP : *green fluorescent protein*), pEGFP\_mCAR étant déjà disponible au laboratoire, fut utilisé afin de regarder les effets du shRNA sur les niveaux de protéine CAR, en utilisant un anticorps contre la GFP, ce qui permettrait de détecter indirectement CAR par *Western*. La deuxième approche était de créer un vecteur d'expression pour une protéine de fusion Luc-CAR qui, une fois synthétisée dans les cellules, pouvait être dosée en fonction de son activité luciférase. L'inhibition de la synthèse de cette protéine de fusion par un shRNA aurait donc entraîné une diminution de l'activité de la luciférase. Le gène *Luc* fut amplifié par PCR à partir du vecteur pGL3-2B2-Luc. Les amorces utilisées furent : 5'-ATAGGTACCATGGAAGACGCCAAAAC-3' et 5'-GAATTCTTTTTCACGGCGATCTTTCCGC-3', les sites de restriction *KpnI* et *EcoRI*, respectivement, étant soulignés. Les fragments produits par PCR furent digérés avec les deux enzymes de restriction correspondant aux sites de restriction ajoutés. Le plasmide p4TO-GFP\_CAR vecteur d'expression pour la protéine de fusion GFP-CAR, disponible au laboratoire, fut aussi digéré avec ces enzymes, ce qui avait comme conséquence d'enlever le gène *GFP*. Par la suite, le gène de la luciférase et la portion p4TO-CAR furent purifiées sur gel d'agarose. Le vecteur et le gène *Luc* furent reliés ensemble et clonés, résultant en l'obtention d'un vecteur d'expression pour la protéine Luc-CAR, nommé p4TO-Luc\_CAR.



**Figure 2-4.** Schématisation de la production d'une SEC. **(A)** Les réactions effectuées pour produire la cassette d'expression se déroule en deux temps. Premièrement, à partir de deux amorces PCR qui flanquent le promoteur U6 humain, il y a amplification du promoteur et ajout de certaines portions du shRNA en 3'. Ces portions sont tout d'abord le brin sens ainsi que l'espaceur qui formera la boucle du shRNA, le tout ajouté lors de la première réaction PCR (amorce SENS). Par la suite, le fragment amplifié est purifié et sert de matrice pour la deuxième réaction PCR. Dans celle-ci, l'amorce en 5' du promoteur U6 reste la même, et l'amorce en 3' change, afin d'ajouter le brin antisens ainsi qu'une séquence enclenchant la terminaison de la transcription (amorce ANTI). Une série de six A termine la transcription contrôlée par le promoteur U6. **(B)** Résultat final après les deux amplifications par PCR. Figure adaptée de Castanotto et Rossi [112].

**Tableau 2-2.** Séquences des amorces utilisées afin de construire les SEC. Les amorces en 3' du promoteur U6 devant être interchangées lors de la construction des SEC se nomment SENS et ANTI (voir aussi Figure 2-4). Les amorces SENS numérotées sont appariées avec les amorces ANTI portant le même numéro. Les séquences pour construire le *shRNA* ciblant l'ARNm de la luciférase et de la GFP proviennent de Miyagishi et Taira [115] et Cao et collaborateurs [116], respectivement. L'amorce 5P est l'amorce universelle s'hybridant à la région 5' flanquant du promoteur U6, et utilisée dans toutes les constructions.

SENS 1	CTACACAAACTCCAAAGTCGGTTTCTGTGGTGTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 2	CTACACAAACTCCAAAGTCGGTTTCTGTGGTGTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 3	CTACACAAACTCCAAAGTCGGTTTCTGTGGTGTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 4	CTACACAAACTCCAAAGTCGGTTTCTGTGGTGTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 5	CTACACAAACATGGCCAGTGAAGAAGAAGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 6	CTACACAAACAGCCTATCTGTTTCATGCAGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 7	CTACACAAACAGGAGACCATGACAGCTATGGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 8	CTACACAAATGAGGCCAGGCTTGCATCCTGGTGTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 9	CTACACAAAGGTGTGAGGTCAGCAAGGCCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS 10	CTACACAAACTCACTCAACTACGTTCTGGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS LUC	CTACACAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACGGTGTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
SENS GFP	CTACACAAATAAGATGAACTTCAGGGTCAGCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAA
ANTI 1	AAAAAACAGAAACCGACTTTGGAGCTACACAAA
ANTI 2	AAAAAATATCTGCAAAGTGTGTGAGCTACACAAA
ANTI 3	AAAAAATGTGGTTATTGAGGATCAGCTACACAAA
ANTI 4	AAAAAATACCCTTTCCAATCCAATGCTACACAAA
ANTI 5	AAAAAATTCTTCTTCACTGGCCATGCTACACAAA
ANTI 6	AAAAAATGCATGAACAGATAGGCTGCTACACAAA
ANTI 7	AAAAAACATAGCTGTCATGGTCTCCTGCTACACAAA
ANTI 8	AAAAAAAGGATGCAAGCCTGGGCCTCACTACACAAA
ANTI 9	AAAAAAGGGCCTTGCTGACCTCACACCCTACACAAA
ANTI 10	AAAAACAGAACGTAGTGTTGAGTGAGCTACACAAA
ANTI LUC	AAAAAAGTTGGCACCAGCAGCGCACCTACACAAA
ANTI GFP	AAAAAAAGCTGACCCTGAAGTTCATCCTACACAAA
5P	ATCGCAGATCTGGATCCAAGTCCGGCAGGAAGAGGGCCT

## **Culture cellulaire**

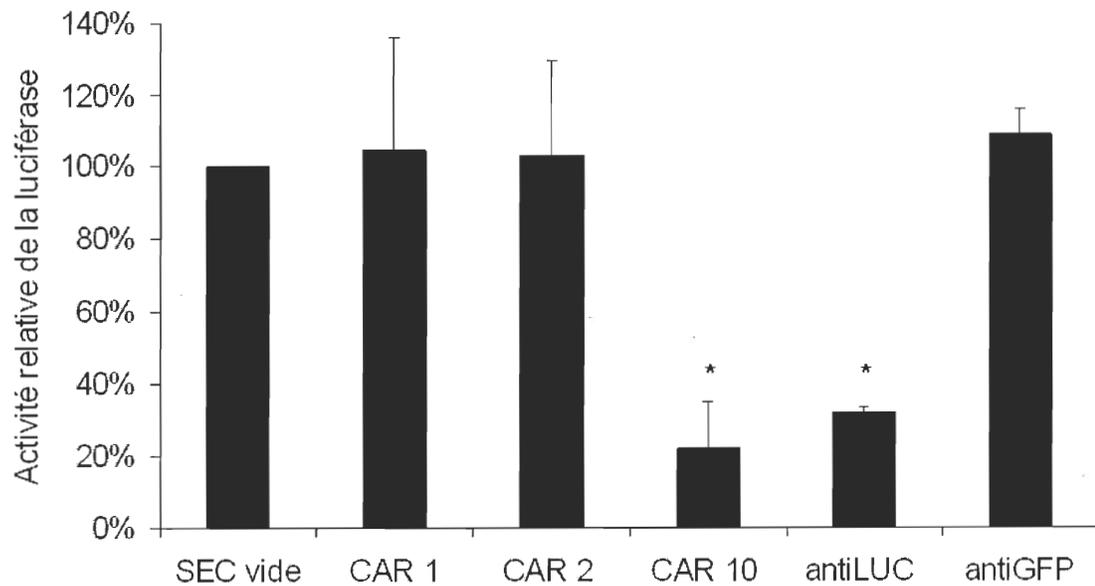
Tous les tests réalisés afin de vérifier la capacité inhibitrice des shRNA ont été effectués dans des cellules HepG2 qui ont été étalées à raison de 600 000 cellules par puits de 35 mm Primaria. Le lendemain, le milieu de transfection a été préparé tel que décrit à la section 2.1.3 et contenait : 16  $\mu$ L de Superfect, 250 ng de p4TO-Luc\_mCAR ou pEGFP\_mCAR, 5 ng de pCMX-Renilla comme contrôle de transfection dans le cas des dosages de la luciférase et 100 ng de SEC dans un volume final de 1.4 mL. Une partie du mélange de transfection (650  $\mu$ L) a été déposée goutte à goutte par puits, pour transfecter deux puits avec chaque mélange et ainsi donner des duplicatas pour chaque transfection. Le lendemain les cellules ont été rincées au tampon HEPES et puis 3 mL de milieu B avec 10% FBS et antibiotique fut ajouté à chacun des puits. Le même traitement fut effectué après 24 et 48 heures. Une fois les 72 heures de traitement écoulées, les cellules furent rincées au tampon HEPES et récoltées dans 400  $\mu$ L de tampon passif de lyse (Promega) ou de tampon Laemmli selon le vecteur d'expression transfectées (p4TO-Luc\_CAR ou pEGFP\_mCAR, respectivement). Dans le premier cas, les cellules furent lysées par deux gel-dégel suivis d'agitation au vortex, et puis l'activité des luciférases a été dosée avec la trousse *Dual-Luc* de PROMEGA. L'activité de la luciférase a été divisée par l'activité de la *Renilla* afin d'équilibrer les données en fonction de l'efficacité de transfection dans chaque puits.

## **Transfert de type *Western***

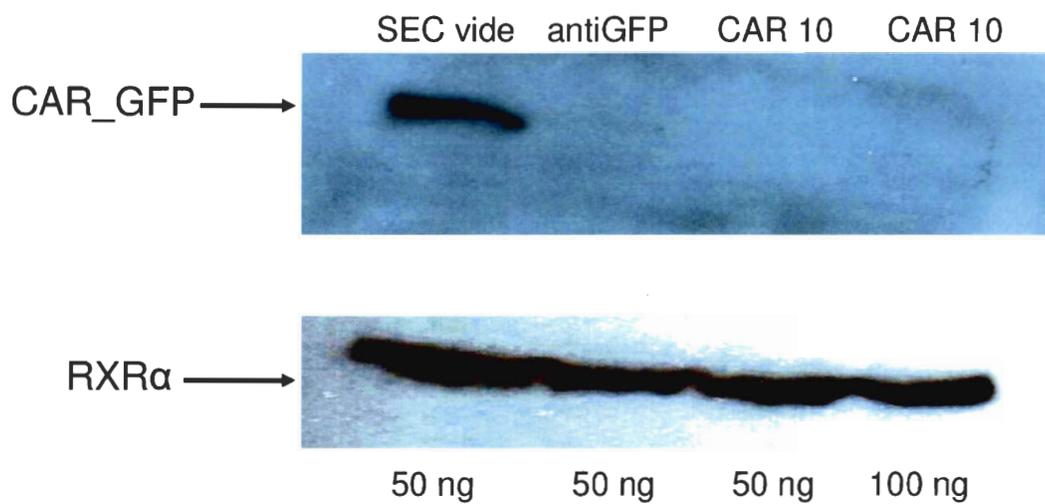
La méthodologie dans le cas de l'analyse de la protéine de fusion GFP-CAR par *Western* est décrite à la section Matériel et méthodes du chapitre III. L'incubation avec l'anticorps primaire s'est faite avec l'anti-GFP SC-8334 ou l'anti-RXR $\alpha$  SC-553 (Santa Cruz Biotechnology) pendant une nuit à une dilution 1 : 1000 (v/v).

#### **2.2.4 Résultats**

Les quatre premières séquences utilisées dans les SEC pour cibler CAR, nommées CAR 1 à CAR 4, ont été choisies avec l'aide d'un site Web contenant des séquences putatives de shRNA [113]. Les quatre séquences suivantes furent basées sur celles obtenues avec un autre programme de sélection de siRNA [114] pour la production de shRNA, et furent baptisés CAR 5 à CAR 8. Les deux derniers, CAR 9 et 10, furent basés sur mes propres travaux comparatifs entre les séquences des ARNm de CAR de rat et de souris (voir le tableau 2-2 pour les séquences des shRNA). Pour les 9 premiers shRNA, aucune diminution décelable du niveau de CAR ne fut observée, quel que soit le système utilisé (CAR-GFP ou Luc-CAR). Pour le dixième shRNA ciblant CAR il en fut tout autrement. En effet, celui-ci se révéla être d'une grande efficacité pour diminuer la protéine CAR de rat, avec les deux constructions utilisées (voir les figures 2-5 et 2-6). Les témoins positifs sont dans le cas de la protéine de fusion Luc-CAR un shRNA contre la luciférase (antiLUC) ou dans le cas de la protéine de fusion CAR-GFP un shRNA contre la GFP (antiGFP).



**Figure 2-5.** Capacité d'interférence de différents shRNA dans des cellules HepG2. Chaque série est nommée selon la SEC lui ayant été cotransfectée avec le vecteur d'expression pour la protéine Luc-CAR. Les astérisques (\*) indiquent une différence significative entre les colonnes marquées et le traitement avec une SEC vide ( $p < 0.05$ ). Chaque colonne représente la moyenne des résultats de deux expériences indépendantes avec les écarts types.



**Figure 2-6.** Blocage de la synthèse de la protéine de fusion CAR-GFP par le shRNA CAR 10, révélée par *Western*. Les quantités de SEC utilisées sont inscrites au bas de chaque puits. RXRα est montré comme contrôle de chargement.

### 2.2.5 Conclusion

Bien que l'élaboration d'un shRNA efficace contre CAR nécessita plusieurs tentatives au niveau des séquences utilisées ainsi que des moyens indirects de dosage de l'interférence à l'ARNm de CAR, l'un des shRNA s'avéra tout de même d'une grande efficacité. Dans l'introduction de ce chapitre, il a été précisé qu'une fois le shRNA fonctionnel développé, il était question d'injecter *in vivo* la SEC correspondante dans les rats afin de voir l'action de la diminution de CAR dans la réponse au PB. Des tests préliminaires ont été effectués, mais sans grand succès, étant donné les difficultés liées à cette technique, l'injection d'ADN dans la veine de la queue de rongeur n'étant pas des plus faciles. Ce projet fut mis de côté afin de favoriser le travail sur l'étude de l'induction à la DEX des gènes *CYP2B*, sujet d'étude des deux prochains chapitres. De plus, l'obtention de souris  $CAR^{-/-}$  par le laboratoire diminuait l'intérêt de cette approche. Cependant, puisque l'outil est maintenant disponible, il serait intéressant dans les années à venir de tester *in vivo* le shRNA développé au cours de ma maîtrise.

### **3. Chapitre III – Implication du récepteur des glucocorticoïdes dans la réponse des CYP2B de rongeurs à la dexaméthasone**

#### **Avant-propos**

Ce chapitre constitue un manuscrit présentement en révision pour publication à la revue *Drug Metabolism and Disposition*. J'ai conçu les expériences et j'ai effectué toutes les manipulations. J'ai aussi participé activement à toutes les phases de la rédaction de l'article, en collaboration avec mon directeur de recherche, le Dr Alan Anderson.

## Résumé

Les cytochromes P450 (CYP) hépatiques participent à la métabolisation des composés endogènes et exogènes. Plusieurs CYP sont inductibles par ces composés, particulièrement par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires. La sous-famille CYP2B est fortement induite par le phénobarbital ou les composés de type phénobarbital et l'obtention d'une réponse détectable nécessite le *constitutive androstane receptor* (CAR). D'autres types de composés, telle la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, peuvent également induire les CYP2B dans le foie de rat ou de souris. En se servant de deux lignées cellulaires, les cellules HepG2 et les cellules H4IIEC3, nous avons démontré que cette voie de réponse nécessite le récepteur des glucocorticoïdes. De plus, la contribution dans la réponse à la dexaméthasone de l'unité de réponse au phénobarbital et un élément de réponse aux glucocorticoïdes déjà connu a été analysée. Les deux sites contribuent à la réponse, bien que d'autres sites soient nécessaires afin d'obtenir la réponse maximale. Il a aussi été démontré que CAR intervient comme un facteur accessoire, en stimulant la réponse à la dexaméthasone conférée par le récepteur des glucocorticoïdes. Qui plus est, dans les cellules H4IIEC3, CAR peut activer la transcription des gènes rapporteurs lorsque la PBRU est dans son contexte naturel, que ce soit pour la région 5' flanquante de *CYP2B2* ou *Cyp2b10*. En conclusion, les résultats présentés ici démontrent qu'il y a deux mécanismes indépendants d'induction des gènes *CYP2B*, un qui implique le phénobarbital et les composés du même type, et un autre qui implique les glucocorticoïdes qui induisent par l'intermédiaire du récepteur des glucocorticoïdes et où CAR joue le rôle de facteur accessoire.

# **Dexamethasone Induction of Murine *CYP2B* Genes**

## **Requires the Glucocorticoid Receptor**

Étienne Audet-Walsh and Alan Anderson

*Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec,  
CHUQ, Québec, Canada and Département de biologie, Université Laval,  
Québec, Canada*

Running title: Dexamethasone induction of murine *CYP2B* genes

*Address correspondence to Alan Anderson, Tel.: +1 418 6915281, Fax: +1 418 6915439,*

*E-mail: Alan.Anderson@bio.ulaval.ca*

Text pages : 20

Figures : 9

References : 44

Words Abstract : 248

Words Introduction : 742

Words Discussion : 1563

**Abbreviations.** CAR, constitutive androstane receptor; CYP, cytochrome P450; DEX, dexamethasone; DMSO, dimethyl sulfoxide; FBS, fetal bovine serum; GR, glucocorticoid receptor; GRE, glucocorticoid response element; GRU, glucocorticoid response unit; NF1, nuclear factor 1; PB, phenobarbital; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PBREM, phenobarbital responsive enhancer module; PBRU, phenobarbital response unit; PXR, pregnane X receptor; RXR, retinoid X receptor.

## Abstract

Hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymes metabolize exogenous and endogenous compounds and many are inducible by xenobiotics. Their synthesis is tightly regulated, particularly through nuclear receptors. Expression of murine *CYP2B* genes is strongly activated by treatment with phenobarbital or phenobarbital-like inducers and detectable response requires the presence of the constitutive androstane receptor (CAR). However, other compounds can also induce murine CYP2B proteins. For example, dexamethasone is known to induce rat CYP2B1 and CYP2B2 and mouse CYP2B10. Using human HepG2 and rat H4IIEC3 hepatoma cell lines, we found that dexamethasone induction of *CYP2B2* and *Cyp2b10* luciferase reporters required the glucocorticoid receptor. Given the well-known observation that *CYP2B* genes are not phenobarbital-responsive in cultured cell lines, the dexamethasone responsiveness of *CYP2B* reporter constructs in cell lines demonstrates in itself that the mechanism of dexamethasone induction is distinct from that of phenobarbital. We also analyzed the relative importance of the phenobarbital response unit (PBRU) and of a known glucocorticoid response element in this response. Both sites contributed to the response, but other sites were required for maximal induction. CAR was also found to act as an accessory factor to stimulate the response to dexamethasone by the glucocorticoid receptor. Furthermore, in H4IIEC3 cells, CAR activated the PBRU in the natural sequence context of the *CYP2B2* and *Cyp2b10* 5' flanks. In summary, there are at least two independent mechanisms of *CYP2B* induction: one involving phenobarbital and phenobarbital-like inducers, and another involving glucocorticoids that induce via the glucocorticoid receptor where CAR is an accessory factor.

## Introduction

The induction of cytochrome P450s (CYPs) by xenobiotics and the mechanisms governing this process are major concerns in the field of drug metabolism. CYP proteins play a vital role in the metabolism of endogenous and exogenous compounds, including environmental pollutants and medicinal products (Tompkins and Wallace, 2007), and are the first line of defence against toxic xenobiotics. Mouse CYP2B10 and the closely related rat CYP2B1 and CYP2B2 forms are highly induced in the liver by phenobarbital (PB) and PB-like inducers (Handschin and Meyer, 2003; Anderson, 2008). PB responsiveness is conferred by the PB response unit (PBRU), a 163-bp fragment located at -2317/-2155 in *CYP2B2* 5' flank, which has the properties of a transcriptional enhancer (Trottier et al., 1995; Stoltz et al., 1998). Contained within the PBRU are three DR-4 elements, NR1, NR2 and NR3 (Fig.1A) (Honkakoski et al., 1998a; Kim et al., 2001), which are required for induction by PB-like inducers (Honkakoski et al., 1998b; Paquet et al., 2000), and are recognized by heterodimers of the constitutive androstane receptor (CAR) and the retinoid X receptor (RXR) (Honkakoski et al., 1998b; Tzamelis et al., 2000; Zhang et al., 2006). The PB-responsive enhancer module (PBREM) is a 51-bp portion of the PBRU, containing only the NR1 and NR2 sites, surrounding an NF1 site (Fig. 1A). It confers PB responsiveness comparable to the PBRU in primary hepatocytes when placed directly adjacent to a basal promoter (Honkakoski et al., 1998a; Paquet et al., 2000). CAR is normally retained in the cytoplasm in hepatocytes. Following treatment with PB-like inducers it relocalizes to the nucleus where it is thought to activate the transcription of its different targets, including *CYP2B* genes (Kawamoto et al., 1999).

Another nuclear receptor, the pregnane X receptor (PXR), which activates transcription of different genes, including *CYP3A23* (Huss and Kasper, 2000), also recognizes and activates the PBREM in reporter assays and activates *Cyp2b10* transcription in vivo (Xie et al., 2000). Furthermore, CAR can recognize some PXR binding elements and activate its targets (Xie et al., 2000). Because of their role in the inducible response to xenobiotics, CAR and PXR are referred to as xenosensors (Handschin and Meyer, 2003).

*CYP2B* genes are also inducible by dexamethasone (DEX), a potent synthetic glucocorticoid and an agonist ligand for the glucocorticoid receptor (GR). GR is normally sequestered in the cytoplasm but, after treatment with glucocorticoids, it relocates to the nucleus where it can bind to its DNA recognition sites, glucocorticoid response elements (GREs), and activate transcription of target genes (Schoneveld et al., 2004). Glucocorticoid regulation of many genes involves glucocorticoid response units (GRUs), which consist of GRE(s) associated with one or more binding sites for accessory transcription factors. The paradigmatic GRU of the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene (Imai et al., 1990) consists of four accessory factor binding sites, (gAF1, gAF2 and gAF3 and a cAMP response element) and two GREs (Scott et al., 1996). By themselves, neither the accessory factor binding sites nor the GREs confer DEX responsiveness on the PEPCK promoter in H4IIE cells. Mutation or deletion of any one of the accessory factor sites leads to about a two-fold reduction in DEX responsiveness and mutation of any two gAF sites essentially abolishes DEX responsiveness (Imai et al., 1990; Scott et al., 1996).

DEX is a moderately effective inducer of rat *CYP2B1* and *CYP2B2* (Lake et al., 1998) and is about as effective as PB in inducing mouse *CYP2B10* mRNA and protein (Corcos, 1992; Jarukamjorn et al., 1999). Jaiswal et al. (1990) described a functional GRE

located approximately 1.3 kb upstream of the *CYP2B2* gene (referred to here as GRE1.3; Fig. 1B and Fig. 2) and Stoltz et al. (1998) identified a putative GRE within the *CYP2B2* PBRU (referred to here as GRE-A) (Fig. 1A). Furthermore, the basal level of hepatic CYP2B10 protein is reduced in mice with a targeted GR gene disruption, and the CYP2B10 protein is not inducible by DEX in such animals (Schuetz et al., 2000). These clues led us to investigate whether GR could activate transcription of *CYP2B* reporter genes in response to DEX and whether CAR or PXR had a role to play in this response.

We report here that in two hepatoma cell lines, human HepG2 and rat H4IIEC3, *CYP2B* reporter constructs are highly responsive to DEX. We used these lines to demonstrate GR dependence of DEX induction and to investigate the role therein of the PBRU and GRE1.3. Moreover, we show that CAR acts as an accessory factor in this induction.

## Materials and methods

**Materials and animals.** DEX was from Sandoz Canada (Boucherville, Canada) as an injectable solution; for cell culture experiments, this solution was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) (1:100 v/v). Tris-HCl was from LabMat (Québec, Canada). All enzymes were from Fermentas (Burlington, Canada). TRIzol<sup>®</sup> Reagent, Waymouth's medium, minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, gentamicin and EDTA were from Invitrogen (Burlington, Canada). Oligonucleotide primers were from Sigma-Genosys (Oakville, Canada). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Male Sprague–Dawley rats (150-175 g) and C57-Black/6 mice (20-25 g) were from Charles River (St-Constant, Canada). Animals were treated in accordance with the requirements of the Comité de protection des animaux du CHUQ/CPAC.

**Plasmids and plasmid constructs.** pSG5-hGR, an expression vector for human GR, was from J-M. Pascussi. The pCDG-mPXR and the pCMX-mCAR $\beta$  expression vectors for mouse PXR and mouse CAR, respectively, were from R.G. Evans. *CYP2B2*-based plasmid constructs are shown in Fig. 2. The pGL3-2B2X vector (herein referred as pGL3-2B2-Luc), based on the pGL3-Basic vector (Promega, Montreal, Canada) and containing 2.5 kb of the *CYP2B2* 5' flank, including the natural promoter and the PBRU, subcloned upstream of the *luc* gene, has been described (Paquet et al., 2000). The  $\Delta$ PBRU construct is the pGL3-2B2-Luc vector from which the PBRU has been deleted, and the PBREM–120 construct contains the 51-bp *Cyp2b10* PBREM fused to the first 120 nucleotides of the *CYP2B2* 5' flank (Paquet et al., 2000). The other deletion constructs were prepared by amplification of

pGL3-2B2-Luc or  $\Delta$ PBRU with primers flanking the region to be deleted (Bauer et al., 2004). The forward and reverse primers for deleting GRE1.3 were:  
5'-ATTGAATTCGGGGTGGCAGGACACTTAGAGGAAA-3' and  
5'-ATTGAATTCTGAACTTCTGAGACAGATTTACAT-3', respectively, and both had an added *EcoRI* site at the 5' end. The PCR product was digested with both *EcoRI* and *DpnI* and finally ligated with T4 DNA ligase to obtain the new constructs,  $\Delta$ GRE and  $\Delta\Delta$  (where the PBRU and GRE1.3 were deleted). To obtain the pGL3-2b10-Luc plasmid, the 5'-flanking region (2.5 kb) of *Cyp2b10*, homologous to the 2.5 kb of the 5' flank of *CYP2B2*, was amplified by PCR from C57-Black/6 mouse liver genomic DNA extracted with TRIzol<sup>®</sup> Reagent according to the manufacturer's instructions. The amplified fragment was cloned into the *XhoI-SmaI* sites of the pGL3-Basic vector (Promega) containing the firefly luciferase reporter gene. The forward and reverse primers were  
5'-AATCCCGGGGCTCTCAACTACCGAGCTCTTGACACTTGA-3' and  
5'-AATCTCGAGGGGCTCCATGGTCCTGGTCTAACCAATGTT-3', respectively. The reference sequence was taken from GenBank, accession number AB043884. All plasmids were purified with Qiagen plasmid purification kits (Qiagen, Mississauga, Canada), and the relevant regions were subjected to DNA sequencing by the DNA sequencing service of the Centre de recherche du CHUL (Québec, Canada).

**Cells and transfection assays.** HepG2 cells and H4IIEC3 cells were cultured and maintained (5% CO<sub>2</sub>/37 °C) in medium B (Adeli and Sinkevitch, 1990), supplemented with 10% (v/v) FBS plus antibiotics (gentamicin at 50 mg/ml or penicillin-streptomycin at 100 U/mL and 100 µg/ml, respectively). To perform transfections, all of which were in duplicate,  $2 \times 10^5$  cells in 1 ml of medium B with FBS were first incubated overnight in 24-

well Primaria culture dishes (VWR International, Ville Mont-Royal, Canada). The medium was then removed, the cells were washed with HEPES buffer (6.4 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.6), once for HepG2 and twice for H4IIEC3; fresh medium with FBS but without antibiotics was then added, and cells were incubated for 2 h. For cotransfections, each well received 37.5 ng of expression vector for mouse CAR or human GR, or corresponding empty vectors; 0.75 ng of pCMV *Renilla* or 2.5 ng of pRLSV40 *Renilla* (internal control plasmids for HepG2 and H4IIEC3 cells, respectively); and 200 ng of *luc* reporter plasmid. When present, the PXR expression vector was also at 37.5 ng per well. The total DNA content was made up to 0.5  $\mu$ g with pBluescript SK<sup>+</sup> as carrier. Six  $\mu$ l of GeneJuice<sup>®</sup> Transfection Reagent (VWR International) was then added and transfection was carried out according to the manufacturer's instructions. After 8 h of incubation, the medium was removed, the cells were rinsed with HEPES buffer and incubated in medium B with FBS and antibiotics overnight. For the HepG2 cells, after an additional rinse with HEPES buffer in the morning, 1.5 ml of medium B with DEX or DMSO but without FBS was added, and the incubation was continued for an additional 24 h before harvesting. For the H4IIEC3 cells, 1.5 ml of medium B with FBS and DEX or DMSO was added and the incubation was continued for an additional 48 h, with one wash with HEPES buffer and addition of fresh medium after 24 h. After the DEX treatments, the medium was removed, the cells were washed once with HEPES buffer, 120  $\mu$ l of passive lysis buffer (Promega) was added, and the cells were harvested by scraping and lysed by freeze-thaw treatment. Luciferase activity of each sample was assayed by luminometry with the Dual Luc kit (Promega). The firefly luciferase values were divided by the *Renilla* luciferase values to obtain the relative luciferase activity. For all the experiments, DEX was added at 100 nM.

For both DEX treatment and controls, DMSO was present at a dilution of 1:1000 (v/v) in the medium.

**Microsomes and Western blotting.** The rats were treated with DEX (40 mg/kg, i.p.), vehicle (water with 0.15% methyl-4-hydroxybenzoate and 0.02% propyl-4-hydroxybenzoate, i.p.) or PB (80 mg/kg, i.p.). Three injections were given, one every 24 h, and 24 h after the last injection the rats were sacrificed and liver microsomes were isolated (Desrochers et al., 1996). Western blots were performed as described previously (Roberge et al., 2004). The anti-CYP2B1 antibody was a gift from David Waxman and its capacity to recognize rat CYP2B proteins has been described elsewhere (Waxman, 1984; Desrochers et al., 1996). For detection of actin, the membranes were incubated with the H-196 antibody (sc-7210) from Santa Cruz Biotechnology (California, USA) for one hour at a 1:1000 dilution. Actin was detected as an 80-kDa covalent complex with 17 $\beta$ -estradiol dehydrogenase (Leenders et al., 1994). This complex is present in liver (Renwick et al., 1981) and can be isolated with microsomes (Henderson and Warren, 1984).

**Data analysis.** Data are shown as the average  $\pm$  S.D. of results of at least three independent experiments. Differences between test and control conditions were assessed by Student's one-tailed *t* test, assuming unequal variance.

## Results

**The response of *CYP2B* reporter genes to DEX requires GR.** Fig. 3 illustrates the induction in rat liver by DEX and PB of CYP2B1 and CYP2B2 proteins, which are not well resolved under our electrophoresis conditions. The faster migrating form recognized by the anti-CYP2B1 antibody is the constitutive CYP2B3 protein (Desrochers et al., 1996). Although not as high as after PB treatment, the DEX-induced levels of CYP2B1/CYP2B2 proteins are clearly higher than the basal level, which is barely perceptible. Note that PB and DEX treatments diminished the level of the constitutive CYP2B3 form.

We exploited cultured cell lines as models to study the mechanism of DEX induction. In HepG2 cells without added GR, there was no detectable response to DEX of the pGL3-2B2-Luc reporter (Fig. 4A, Series 1). However, after cotransfection of a GR expression vector, there was approximately a 12-fold induction by DEX (Fig. 4A, Series 2). Induction by DEX was not detected after cotransfection of expression vectors for CAR or for PXR (Fig. 4A, Series 3 and 5). Thus, in HepG2 cells the addition of exogenous GR is necessary and sufficient to confer DEX responsiveness on the pGL3-2B2-Luc reporter. The same pattern was seen in HepG2 cells for the pGL3-2b10-Luc reporter, which contains 2.5 kb of the *Cyp2b10* 5' flank. In the absence of added GR, there was no response to DEX (Fig. 4B, Series 1). Cotransfection with a GR expression vector again conferred DEX responsiveness (Fig. 4B, Series 2), and again no induction by DEX was detected after cotransfection of expression vectors for CAR or for PXR (Fig. 4B, Series 3 and 5). Hence, in HepG2 cells the absence of DEX responsiveness of the *CYP2B* reporters appears to be only caused by the lack of GR, which, if present, can confer it. This conclusion is in

agreement with the requirement in HepG2 cells for exogenous GR to detect DEX responsiveness of human *CYP2C9* reporters (Gerbai-Chaloin et al., 2002).

In H4IIEC3 cells on the other hand, there was approximately a 60-fold response to DEX of the pGL3-2B2-Luc reporter in the absence of the GR expression vector (Fig. 5A, Series 1). Addition of exogenous GR by cotransfection increased the fold induction by a factor of 2 (Fig. 5A, Series 2). Here again, the results argue against a role of PXR in the DEX induction, as cotransfection of a PXR expression vector diminished significantly both the basal and induced levels (Fig. 5A, compare Series 1 and 5). As expected, no appreciable response to DEX was observed with the pGL3-Basic vector (Fig. 5A, Series 6). As was the case in HepG2 cells, the behavior of the pGL3-2b10-Luc reporter in H4IIEC3 cells was similar to that of pGL3-2B2-Luc. Without addition of exogenous nuclear receptor, the response to DEX was about 6-fold (Fig. 5B, Series 1). The addition of GR by cotransfection enhanced the response to DEX, up to about 40-fold (Fig. 5B, Series 2). Hence, H4IIEC3 cells contain sufficient GR to permit DEX induction of CYP2B reporters, but insufficient to permit a maximal response. A similar conclusion was reached by Imai et al. (1990) with respect to DEX induction of a *PEPCK* reporter. The response to DEX was dependent on GR in H4IIEC3 cells, as shown by its inhibition by the GR antagonist RU486 (Fig. 6). This indicates that the DEX induction seen in H4IIEC3 cells without addition of exogenous GR is mediated by endogenous GR.

**Stimulation of DEX induction by CAR.** In HepG2 cells, exogenous CAR had no appreciable effect on the basal levels of transcription for the pGL3-2B2-Luc or pGL3-2b10-Luc reporter constructs (Figs. 4A and 4B, compare Series 1 and 3). Surprisingly however,

exogenous CAR stimulated the response to DEX in presence of GR, by increasing the induced levels about 3-fold for pGL3-2B2-Luc and about 1.7-fold for pGL3-2b10-Luc (Figs. 4A and 4B, compare Series 2 and 4). In H4IIEC3 cells, in the absence of exogenous GR, CAR increased DEX-induced levels of transcription by 4.3- or 19-fold for the pGL3-2B2-Luc and pGL3-2b10-Luc reporters respectively (Figs. 5A and 5B, compare Series 1 and 3). In the presence of exogenous GR, CAR also increased DEX-induced levels of transcription for both reporters (Figs. 5A and 5B, compare Series 2 and 4). Taken together, these results show that CAR alone does not mediate induction by DEX, but that it acts to stimulate DEX induction mediated by GR.

As it is known that CAR-RXR heterodimers bind to the NR1, NR2 and NR3 sites of the PBRU (Honkakoski et al., 1998b; Tzamelis et al., 2000; Beaudet et al., 2005; Zhang et al., 2006), the impact of exogenous CAR on induction by DEX was evaluated with the  $\Delta$ PBRU reporter construct. When added by cotransfection to H4IIEC3 cells, CAR reduced significantly both the basal and induced levels of transcription for the  $\Delta$ PBRU reporter construct (Fig. 7, compare Series 4 and 5). Hence, the stimulation of DEX-induced transcription by CAR clearly depends on the PBRU, because when it was deleted the stimulation was no longer observed. In HepG2 cells, the  $\Delta$ PBRU reporter construct gave approximately the same induction as the pGL3-2B2-Luc reporter, around 13- to 15-fold (Fig. 8, compare Series 1 and 3). For the  $\Delta$ PBRU reporter, the addition of CAR did not increase the induced level (Fig. 8, compare Series 3 and 4). Thus, in HepG2 cells, when the PBRU was deleted, CAR was no longer able to increase the DEX-induced levels.

**In H4IIEC3 cells CAR activates reporter gene transcription driven by the *CYP2B***

**PBRUs in their natural sequence contexts.** In HepG2 cells, exogenous CAR activates reporter gene transcription driven by the murine *CYP2B* PBRU or PBREM when the enhancers are placed directly adjacent to an enhancerless basal promoter such as that of *tk* (Honkakoski et al., 1998b, *CYP2C1* (Kim et al., 2001) or *CYP2B2* (Beaudet et al., 2005). We confirmed these results here, where CAR activated the PBREM–120 construct 24-fold in H4IIEC3 cells (Fig. 7, compare Series 2 and 3, without DEX) and 38-fold in HepG2 cells (Fig. 9, compare Series 1 and 3, without DEX). These results are consistent with the known absence from HepG2 cells of appreciable levels of functional CAR (Honkakoski et al., 1998b) and of CAR mRNA (Rencurel et al., 2005) and they indicate that H4IIEC3 cells also lack functional CAR. With the PBREM–120 construct in H4IIEC3 cells, in the presence of exogenous CAR, a modest 2.5-fold further increase in transcription was observed in the presence of DEX (Fig. 7, Series 3); but with this construct in HepG2 cells, in the presence of CAR or of CAR plus GR, no further increase in transcription was observed in the presence of DEX (Fig. 9, Series 3 and 4).

In agreement with earlier results (Beaudet et al., 2005), no activation by CAR was detectable when the *CYP2B2* PBRU in its natural sequence context in the pGL3-2B2-Luc construct was tested in HepG2 cells (Fig. 4A, compare Series 1 and 3, without DEX). Similarly, no activation by CAR was detected when the *Cyp2b10* PBRU in its natural sequence context in the pGL3-2B10-Luc construct was tested in HepG2 cells (Fig. 4B, compare Series 1 and 3, without DEX). For both reporters, similar results were obtained in HepG2 cells in the presence of exogenous GR (Figs. 4A and 4B, Series 2 and 4, without DEX). However, in H4IIEC3 cells CAR activated transcription driven by the *CYP2B*

PBRUs when they were in their natural sequence contexts. This activation was about 14-fold for the *CYP2B2* reporter construct and about 13-fold for the *Cyp2b10* reporter construct (Figs. 5A and 5B, compare Series 1 and 3, without DEX). The activation by CAR was essentially unchanged when exogenous GR was also present (Figs. 5A and 5B, Series 4, without DEX). This activation by CAR depends on the PBRU, because, as for the stimulation of DEX induction, when the PBRU was deleted, the activation by CAR was abolished, and indeed the basal level was reduced by about two-fold in the presence of exogenous CAR (Fig. 7, compare Series 4 and 5, without DEX).

**Sites other than the PBRU and GRE1.3 are needed for maximal response to DEX.** To begin the characterization of the sequence elements involved in the DEX response, we analyzed DEX responsiveness of *CYP2B2* reporter constructs with different deletions. In H4IIEC3 cells, the effect of deleting the PBRU in the absence of exogenous CAR was to reduce the fold-induction by DEX by a factor of 2 (Fig. 7, compare Series 1 and 4), indicating that the PBRU plays a role in DEX induction in these cells. Furthermore, the basal *CYP2B2* promoter construct retained the capacity for a modest response, about 4 fold, in H4IIEC3 cells (Fig. 7, Series 7), but not in HepG2 cells (Fig. 9, Series 5). In both cell lines, with the PBREM-120 construct, the DEX response was increased compared to that of the basal *CYP2B2* promoter alone (Fig. 7, Series 2 and 7, for H4IIEC3 cells and Fig. 9, Series 2 and 5, for HepG2 cells). Thus, sequences within the PBREM can contribute to the DEX response in both cell lines. However, in HepG2 cells the deletion of the PBRU in the natural sequence context did not diminish the response to DEX, although, as we have seen, it eliminated the stimulation of the DEX-induced levels by CAR (Fig. 8, compare Series 1

and 2 with Series 3 and 4). Therefore, sequences within the PBRU can contribute to DEX induction mediated by GR and are necessary for stimulation of this induction by CAR.

We also investigated the possible role of the GRE reported by Jaiswal et al. (1990), GRE1.3, in the response to DEX. In both cell lines its deletion reduced but did not eliminate the DEX responsiveness (Fig. 7, compare Series 1 and 6, for H4IIEC3 cells; Fig. 8, compare Series 1 and 5, for HepG2 cells). In H4IIEC3 cells, deletion of both the PBRU and GRE1.3 had the same effect as deletion of the PBRU only (Fig. 7, compare Series 4 and 8), indicating that their effects are not additive. In HepG2 cells, deletion of GRE1.3 and the PBRU had the same effect as deletion of GRE1.3 only (Fig. 8, compare Series 5 and 7). Taken together, these results show that in H4IIEC3 cells the role of GRE1.3 is secondary to that of the PBRU in conferring DEX responsiveness whereas in HepG2 cells, GRE1.3 but not the PBRU contributes to DEX-responsiveness. Moreover, when GRE1.3 was deleted, the stimulation by CAR of the DEX-induced levels was conserved (Fig. 8, compare Series 5 and 6).

## Discussion

We have demonstrated that GR is responsible for the induction of *CYP2B2* and *Cyp2b10* luciferase reporters by DEX treatment in HepG2 cells, wherein induction by DEX was only seen with the addition of exogenous GR. In H4IIEC3 cells on the other hand, DEX responsiveness was observed without addition of exogenous GR. The abrogation of DEX responsiveness in H4IIEC3 cells by the addition of RU486 indicates that GR is also required for DEX responsiveness in H4IIEC3 cells. Furthermore, given the well-known observation that *CYP2B* genes are not PB-responsive in cultured cell lines, the DEX responsiveness of *CYP2B* reporter constructs in cell lines demonstrates in itself that the mechanism of DEX induction is distinct from that of PB.

The data obtained argue against a role for PXR in the response to DEX under our experimental conditions. However, at the concentration of DEX used (100 nM), human or mouse PXRs are not expected to be activated (Kliewer et al., 1998; Lehmann et al., 1998), and it is possible that at higher concentrations PXR would be activated by DEX and then could activate transcription of the *CYP2B* reporters.

Our results are in accord with those obtained with GR-null mice by Schuetz et al. (2000), indicating that GR is necessary for DEX induction of *Cyp2b10* in mice and, by extension, of *CYP2B1* and *CYP2B2* in rats. However, the absence of GR following targeted inactivation of its gene may have affected the level of other transcription factors or co-activators (Huss and Kasper, 2000; Schoneveld et al., 2004). For example, the levels of CAR are increased by the addition of GR and DEX to human hepatocytes (Pascussi et al., 2000), so absence of GR could lead to lower levels of CAR in mice lacking GR. The advantage of the cell culture system is that it is possible to add, one by one, specific

transcription factors, and thus to obtain direct evidence that GR is responsible for DEX responsiveness.

The putative GRE of the PBRU (GRE-A; Fig. 1A) and GRE1.3 (Fig. 1B and Fig. 2) are candidates for conferring DEX responsiveness on rat *CYP2B2*. Our results demonstrate that GRE1.3, although it contributed to DEX responsiveness for the *CYP2B2* reporter in both cell lines, is clearly not the only sequence element required, as its deletion reduced but did not abolish DEX responsiveness. GRE-A apparently has no role to play in the DEX response in HepG2 cells when it is in its natural context, as deletion of the PBRU did not influence the response to DEX. However, the deletion of the PBRU did diminish DEX responsiveness in H4IIEC3 cells, indicating that it contains an element that can contribute to DEX responsiveness. Moreover, the PBREM itself, when fused to the basal promoter, conferred DEX responsiveness in both cell types. Since GRE-A is ablated in the PBREM (Fig. 1A), these results suggest that there is another GRE or accessory site within the PBREM. GRE-B, another putative GRE in the PBRU (Fig. 1A) (Stoltz et al., 1998), is a candidate for this site.

Given that after deletion of both the PBRU and GRE1.3 DEX responsiveness was only reduced by two-fold, other sites are clearly needed to confer maximal induction. The DEX response therefore seems to be modulated through several GREs or accessory sites that are spread throughout the *CYP2B2* 5' flank. One or more of these additional sites are outside the basal promoter, as the construct in which GRE1.3 and the PBRU were deleted retained significantly higher DEX responsiveness than the -120 construct in both cell types. Another site that can contribute to DEX responsiveness is located in the basal promoter, as the -120 construct responded to DEX in H4IIEC3 cells. A putative GRE half

site (5'-TGTTCA-3', -70/-65, lower strand) is present in the *CYP2B2* basal promoter. For GRE half sites to be functional, they require the presence of an accessory factor bound to an adjacent site (Schoneveld et al., 2004). C/EBP $\alpha$  may act as such an accessory factor as there is a C/EBP $\alpha$  binding site adjacent to the putative GRE half site in the basal *CYP2B2* promoter (Luc et al., 1996; Park and Kemper, 1996). We have identified two additional regions in the *CYP2B2* 5' flank that can contribute to DEX responsiveness. One, active in HepG2 cells, is between -1180 and -1148 and contains a putative GRE; the other, active in H4IIEC3 cells, is between -192 and -145 and contains a putative GRE half site on each strand (Audet-Walsh et al., 2008). Taken together, these observations suggest that the *CYP2B2* 5' flank contains a GRU (Imai et al., 1990). Moreover, the high level of DEX responsiveness observed in our experiments is in agreement with this conclusion, as the fold induction is often higher for GRUs than for simple GREs (Schoneveld et al., 2004).

The role of CAR in activating *CYP2B* transcription is interesting for several reasons. To our knowledge, ours are the first results where the *CYP2B2* PBRU placed in its natural sequence context at -2317/-2155 in *CYP2B2* 5' flank is activated by CAR, as observed in H4IIEC3 cells. As might have been expected, this was true for the *Cyp2b10* reporter construct as well. In HepG2 cells, only when the PBRU or the PBREM were placed at -120 in *CYP2B2* 5' flank were they activated by exogenous CAR (Beaudet et al., 2005). As CAR is active in the absence of an agonist ligand (Baes et al., 1994) and goes directly to the nucleus in HepG2 cells (Kobayashi et al., 2003), the question arises as to why is it not able to activate the PBRU in its natural sequence context in these cells. It seems likely that H4IIEC3 cells but not HepG2 cells contain transcription factors or co-activators that are required for CAR activation of murine PBRU-driven transcription when the enhancer is in

its natural sequence context. Although the factor(s) responsible for this effect are as yet unknown, one transcription factor, GR, can be ruled out: HepG2 cells to which GR was added by cotransfection were as refractory to CAR activation of the PBRU in its natural sequence context as HepG2 cells not so cotransfected.

CAR is usually thought of as being a transcriptional activator in its own right, but in HepG2 cells, as we have seen, it is unable to activate PBRU-driven transcription of the *CYP2B2* or *Cyp2b10* PBRUs in their natural sequence contexts. However, CAR is capable, in the presence of GR, of activating their DEX-induced transcription. Hence, under these conditions in HepG2 cells, CAR clearly acts as an accessory factor for DEX-induced transcription. The abrogation, in both HepG2 and H4IIEC3 cells, of the stimulative effects of CAR on DEX induction by deletion of the PBRU suggests that CAR does not act by binding to GR, but rather by binding to sequence elements within the PBRU, presumably NR1, NR2 and NR3, to increase DEX responsiveness. Thus, with respect to DEX induction of murine *CYP2B* genes, CAR behaves a classical accessory factor in the sense in which that term is applied to the *PEPCK* GRU and other GRUs (Imai et al., 1990; Schoneveld et al., 2004). The interactions between accessory factors and GRs appear to contribute to the *PEPCK* glucocorticoid response by facilitating GR binding or interaction with coactivators or both (Stafford et al., 2001a; Stafford et al., 2001b), and CAR may act similarly to stimulate DEX induction of *CYP2B* genes.

GR is not only essential for the DEX response of the *CYP2B* reporters. It is also necessary for maximal PB induction of *Cyp2b10* in vivo, as GR-null mice have about two thirds of the wild type PB-induced levels of CYP2B10 protein (Schuetz et al., 2000). As demonstrated by our results, CAR and GR act independently to activate transcription of

*CYP2B* reporters, but CAR can act as an accessory factor in the DEX response and GR may play a similar role in PB-responsiveness. This could explain the decrease seen in the PB-induced level of the CYP2B10 protein in GR-null mice. Moreover, the synergistic effect seen by cotransfection of expression vectors for CAR and GR, which, for the pGL3-2b10-Luc reporter in H4IIEC3 cells gave induced levels more than 400 times the basal level, is in agreement with previously reported synergistic *CYP2B* induction by cotreatment with DEX and PB in primary hepatocytes (Waxman et al., 1990).

Contrary to the effect of DEX in inducing CYP2B1 and CYP2B2 proteins, CYP2B3 levels decreased in response to treatment with DEX. This is not a surprising result, as the mouse ortholog of CYP2B3, CYP2B9, has also been reported to be suppressed in liver by DEX treatment (Jarukamjorn et al., 1999). Furthermore, PB treatment also decreased CYP2B3 in rat liver, which is in agreement with previously reported results (Desrochers et al., 1996). The mechanism by which CYP2B3 is decreased remains unknown.

In conclusion, murine *CYP2B* genes are not only regulated by exogenous compounds, but also by a pathway that is normally regulated by endogenous compounds. CYP2B proteins are well known to possess androgen hydroxylase activity (Waxman, 1984) and glucocorticoid hormones may influence androgen levels by regulating *CYP2B* transcription. In addition, H4IIEC3 cells, should be useful for studying CAR activation of *CYP2B* transcription, as they appear to contain factors necessary for this activation that are lacking in HepG2 cells. In summary then, there are at least two independent mechanisms of *CYP2B* induction, one involving PB and PB-like inducers, and another involving glucocorticoids that induce via GR where CAR acts as an accessory factor.

## **Acknowledgements and footnotes**

The authors thank Amaury Lachaud, Carl Séguin and Sacha Auclair-Vincent for their helpful comments on the manuscript, Julie Dionne for help with the figures, Denis Allard for providing the H4IIEC3 cells, Jean-Marc Pascussi for the GR expression vector, R.G. Evans for the CAR and PXR expression vectors, and David Waxman for the anti-CYP2B antibody. This work has been submitted by EA-W to the Faculté des études supérieures, Université Laval, in partial fulfilment of the requirements for the degree of maître ès sciences. EA-W was the recipient of a studentship award from the Fondation J.-Arthur-Vincent.

This work was supported by a grant from the Instituts de recherche en santé du Canada.

## Reference list

- Adeli K and Sinkevitch C (1990) Secretion of apolipoprotein B in serum-free cultures of human hepatoma cell line. HepG2. *FEBS Lett* **263**: 345-348.
- Anderson A, (2008) The induction of CYP2B proteins in rodents by phenobarbital-like inducers: what has been discovered and what remains to be learned. *Acta Chim Slov* **55**: 45-52.
- Audet-Walsh É, Lachaud AA and Anderson A (2008) The *CYP2B2* 5' flank contains a complex glucocorticoid response unit. *Biochem Pharmacol* doi 10.1016/j.bcp.2008.08.015 In Press.
- Baes M, Gulick T, Choi T, Martinoli MG, Simha D and Moore DD (1994) A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol* **14**: 1544-1552.
- Bauer D, Wolfram N, Kahl GF and Hirsch-Ernst KI (2004) Transcriptional regulation of *CYP2B1* induction in primary rat hepatocyte cultures: repression by epidermal growth factor is mediated via a distal enhancer region. *Mol Pharmacol* **65**: 172-180.
- Beaudet M-J, Desrochers M, Lachaud AA and Anderson A (2005) The *CYP2B2* phenobarbital response unit contains binding sites for hepatocyte nuclear factor 4, PBX-PREP1, the thyroid hormone receptor  $\beta$  and the liver X receptor. *Biochem J* **388**: 407-418.
- Corcos L (1992). Phenobarbital and dexamethasone induce expression of cytochrome P-450 genes from subfamilies IIB, IIC, and IIIA in mouse liver. *Drug Metab Dispos* **20**: 797-801.
- Desrochers M, Christou M, Jefcoate C, Belzil A and Anderson A (1996) New proteins in the rat CYP2B subfamily: presence in liver microsomes of the constitutive CYP2B3 protein and the phenobarbital-inducible protein product of alternatively spliced CYP2B2 mRNA. *Biochem Pharmacol* **52**: 1311-1319.
- Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi J-M, Pichard-Garcia L, Vilarem M-J and Maurel P (2002) Transcriptional regulation of *CYP2C9* gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* **277**: 209-217.
- Handschin C and Meyer UA (2003) Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **55**: 649-673.
- Henderson LL and Warren JC (1984) Purification and characterization of epimeric estradiol dehydrogenases (17 $\alpha$  and 17 $\beta$ ) from equine placenta. *Biochemistry* **23**: 486-491.

- Honkakoski P, Moore R, Washburn KA and Negishi M (1998a) Activation by diverse xenochemicals of the 51-base pair phenobarbital-responsive enhancer module in the *CYP2B10* gene. *Mol Pharmacol* **53**: 597-601.
- Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T and Negishi M (1998b) The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the *CYP2B* gene. *Mol Cell Biol* **18**: 5652-5658.
- Huss JM and Kasper CB (2000) Two-stage glucocorticoid induction of *CYP3A23* through both the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Mol Pharmacol* **58**: 48-57.
- Imai E, Stromstedt PE, Quinn PG, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-Å and Granner DK (1990) Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* **10**: 4712-4719.
- Jaiswal AK, Haaparanta T, Luc P-V, Schembri J and Adesnik M (1990) Glucocorticoid regulation of a phenobarbital-inducible cytochrome P-450 gene: the presence of a functional glucocorticoid response element in the 5'-flanking region of the *CYP2B2* gene. *Nucleic Acids Res* **18**: 4237-4242.
- Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J and Nemoto N (1999) Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch Biochem Biophys* **369**: 89-99.
- Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K and Negishi M (1999) Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the *CYP2B* gene. *Mol Cell Biol* **19**: 6318-6322.
- Kim J, Min G and Kemper B (2001) Chromatin assembly enhances binding to the *CYP2B1* phenobarbital-responsive unit (PBRU) of nuclear factor-1, which binds simultaneously with constitutive androstane receptor (CAR)/retinoid X receptor (RXR) and enhances CAR/RXR-mediated activation of the PBRU. *J Biol Chem* **276**: 7559-7567.
- Kliwer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T and Lehmann JM (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* **92**: 73-82.
- Kobayashi K, Sueyoshi T, Inoue K, Moore R and Negishi M (2003) Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Mol Pharmacol* **64**: 1069-1075.
- Lake BG, Renwick AB, Cunnningame ME, Price RJ, Surry D and Evans DC (1998) Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver. *Toxicology* **131**: 9-20.

- Leenders F, Adamski J, Husen B, Thole HH and Jungblut PW (1994) Molecular cloning and amino acid sequence of the porcine 17 $\beta$ -estradiol dehydrogenase. *Eur J Biochem* **222**: 221-227.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT and Kliewer SA (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate *CYP3A4* gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* **102**: 1016-1023.
- Luc P-V, Adesnik M, Ganguly S and Shaw PM (1996) Transcriptional regulation of the *CYP2B1* and *CYP2B2* genes by C/EBP-related proteins. *Biochem Pharmacol* **51**: 345-356.
- Park Y and Kemper B (1996) The *CYP2B1* proximal promoter contains a functional C/EBP regulatory element. *DNA Cell Biol* **15**: 693-701.
- Paquet Y, Trottier E, Beaudet M-J and Anderson A (2000) Mutational analysis of the *CYP2B2* phenobarbital response unit and inhibitory effect of the constitutive androstane receptor on phenobarbital responsiveness. *J Biol Chem* **275**: 38427-38436.
- Pascussi J-M, Gerbal-Chaloin S, Fabre J-M, Maurel P and Vilarem M-J (2000) Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol* **58**: 1441-1450.
- Rencurel F, Stenhouse A, Hawley SA, Friedberg T, Hardie DG, Sutherland C and Wolf CR (2005) AMP-activated protein kinase mediates phenobarbital induction of CYP2B gene expression in hepatocytes and a newly derived human hepatoma cell line. *J Biol Chem* **280**: 4367-4373.
- Renwick AG, Soon CY, Chambers SM and Brown CR (1981) Estradiol-17 $\beta$  dehydrogenase from chicken liver. *J Biol Chem* **256**: 1881-1887.
- Roberge C, Beaudet M-J and Anderson A (2004) GABA<sub>A</sub>/central benzodiazepine receptor and peripheral benzodiazepine receptor ligands as inducers of phenobarbital-inducible CYP2B and CYP3A. *Biochem Pharmacol* **68**: 1383-1389.
- Schoneveld OJLM, Gaemers IC and Lamers WH (2004) Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* **1680**: 114-128.
- Schuetz EG, Schmid W, Schutz G, Brimer C, Yasuda K, Kamataki T, Bornheim L, Myles K and Cole TJ (2000) The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-450<sub>2B</sub> by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver. *Drug Metab Dispos* **28**: 268-278.
- Scott DK, Mitchell JA and Granner DK (1996) The orphan receptor COUP-TF binds to a third glucocorticoid accessory factor element within the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem* **271**: 31909-31914.

- Stafford JM, Wilkinson JC, Beechem JM and Granner DK (2001a) Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem* **276**: 39885-39891
- Stafford JM, Waltner-Law M and Granner DK (2001b) Role of accessory factors and steroid receptor coactivator 1 in the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *J Biol Chem* **276**: 3811-3819.
- Stoltz C, Vachon M-H, Trottier E, Dubois S, Paquet Y and Anderson A (1998) The *CYP2B2* phenobarbital response unit contains an accessory factor element and a putative glucocorticoid response element essential for conferring maximal phenobarbital responsiveness. *J Biol Chem* **273**: 8528-8536.
- Tompkins LM and Wallace AD (2007) Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J Biochem Mol Toxicol* **21**: 176-181.
- Trottier E, Belzil A, Stoltz C and Anderson A (1995) Localization of a phenobarbital-responsive element (*PBRE*) in the 5'-flanking region of the rat *CYP2B2* gene. *Gene* **158**: 263-268.
- Tzamelis I, Pissios P, Schuetz EG and Moore DD (2000) The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol* **20**: 2951-2958.
- Waxman DJ (1984) Rat hepatic cytochrome P-450 isoenzyme 2c. Identification as a male-specific, developmentally induced steroid 16  $\alpha$ -hydroxylase and comparison to a female-specific cytochrome P-450 isoenzyme. *J Biol Chem* **259**: 15481-15490.
- Waxman DJ, Morrissey JJ, Naik S and Jauregui HO (1990) Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem J* **271**: 113-119.
- Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe, Blumberg B, Guzelian PS and Evans RM (2000) Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev* **14**: 3014-3023.
- Zhang Q, Bae Y, Kemper JK and Kemper B (2006) Analysis of multiple nuclear receptor binding sites for CAR/RXR in the phenobarbital responsive unit of *CYP2B2*. *Arch Biochem Biophys* **451**: 119-127.

## Figure legends

**Figure 1.** (A) Sequence of the rat *CYP2B2* PBRU showing the positions of nuclear receptor recognition sites NR1, NR2 and NR3, as well as the NF1 site and two putative GREs, GRE-A and GRE-B, identified with MatInspector matrix GR\_Q6 (Stoltz et al., 1998). The position of the PBREM within the PBRU is also indicated. The mouse *Cyp2b10* PBREM is identical to the rat *CYP2B2* PBREM, except for a single bp difference in the NR2 spacer (Paquet et al., 2000). (B) Sequence of the rat *CYP2B2* 5' flank surrounding the GRE at -1.3 kb and the homologous region of the mouse *Cyp2b10* 5' flank. The two horizontal arrows indicate the two half sites (bold) of the incomplete palindromic sequence of the putative GRE of *CYP2B2* (Jaiswal et al., 1990). Under the *CYP2B2* sequence are shown the differences in the *Cyp2b10* homologous region. Hyphens represent deleted bases, while small letters represent base differences. The DNA sequence of the *Cyp2b10* GRE1.3 region is so different from the *CYP2B2* sequence that it may be non-functional. In the bottom of this panel is shown the GRE consensus sequence (Schoneveld et al., 2004).

**Figure 2.** Schematic representation of the different *CYP2B2*-derived luciferase reporter constructs used in the study of DEX responsiveness. pGL3-2B2-Luc contains 2.5 kb of the 5'-flanking region of *CYP2B2*. In the PBREM-120 construct, the mouse PBREM is fused to the *CYP2B2* basal promoter (the first 120 nucleotides of the 5' flank).

**Figure 3.** (A) Western blot analysis of DEX induction of CYP2B1 and CYP2B2 proteins in rat liver. Each lane (1.5 µg of microsomal protein) corresponds to one animal. The results

shown are representative of three independent experiments. (B) Actin immunodetection. (C) Shorter exposure of the blot shown in (A) to permit detection of the effect of PB or DEX treatment on the CYP2B3 level.

**Figure 4.** Response to DEX of the rat *CYP2B2* or the mouse *Cyp2b10* reporters in HepG2 cells in the presence of various nuclear receptors. HepG2 cells were cotransfected with the pGL3-2B2-Luc reporter (2B2) (A) or the pGL3-2b10-Luc reporter (2b10) (B), and the GR or CAR expression vectors or the empty pCMX and pSG5 vectors, or the PXR expression vector, and then treated or not with DEX, all as described under *Materials and methods*. The relative luciferase activity obtained for each reporter construct cotransfected with the empty pCMX and pSG5 vectors was set at 1. The single asterisk (\*), double asterisks (\*\*), and triple asterisks (\*\*\*) denote significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively). Symbols over columns denote significant differences between the marked columns and the basal level of Series 1 of the same panel.

**Figure 5.** Response to DEX of the rat *CYP2B2* or the mouse *Cyp2b10* reporters in H4IIEC3 cells in the presence of various nuclear receptors. H4IIEC3 cells were cotransfected with the pGL3-2B2-Luc reporter (2B2) (A) or the pGL3-2b10-Luc reporter (2b10) (B) and the GR or CAR expression vectors or the empty pCMX and pSG5 vectors, or the PXR expression vector, and then treated or not with DEX, all as described under *Materials and methods*. The relative luciferase activity obtained for each reporter construct cotransfected with the empty vectors pCMX and pSG5 was set at 1. The dagger (†) indicates that the induced level in Series 5 shows a significant reduction compared to the

induced level in Series 1 ( $p < 0.05$ ). The asterisks denote significant differences as described in the legend of Fig. 4.

**Figure 6.** Response to DEX of the pGL3-2B2-Luc reporter construct in H4IIEC3 cells in the presence or absence of RU486. H4IIEC3 cells were transfected with the pGL3-2B2-Luc reporter construct and treated with DEX as described under *Materials and methods*. The relative luciferase activity in the absence of RU486 was set at 100%. The double dagger (‡) indicates that the induced levels show a significant reduction in the presence of RU486 ( $p < 0.001$ ).

**Figure 7.** Impact of different deletions in the *CYP2B2* 5' flank on DEX-responsiveness and CAR activation in H4IIEC3 cells. The pGL3-2B2-Luc reporter (2B2) or different deletion constructs (Fig. 2) were cotransfected into H4IIEC3 cells with the CAR expression vector or with the empty pCMX vector, and then treated or not with DEX, as described under *Materials and methods*. The relative luciferase activity obtained for the pGL3-2B2-Luc construct cotransfected with the empty pCMX and pSG5 vectors was set at 1. Series 1 was shown in Fig. 5 and is repeated here to facilitate analysis. All the induced levels were significantly different from their basal levels ( $p < 0.05$ ). The asterisks and daggers denote significant differences as described in the legends of Figs. 4 and 5.

**Figure 8.** Impact of different deletions in the *CYP2B2* 5' flank on DEX-responsiveness and CAR activation in HepG2 cells. The GR expression vector and the pGL3-2B2-Luc reporter (2B2) or different deletion constructs (Fig. 2) were cotransfected into HepG2 cells with the

CAR expression vector or with the empty pCMX vector, and then treated or not with DEX, as described under *Materials and methods*. The relative luciferase activity obtained for the pGL3-2B2-Luc construct co-transfected with the empty pCMX and pSG5 vectors was set at 1 and is shown in Fig. 4A. Series 1 and 2 were shown in Fig. 4A and are repeated here to facilitate analysis. All the induced levels were significantly different from their basal levels ( $p < 0.05$ ). The asterisks and daggers denote significant differences as described in the legends of Figs. 4 and 5.

**Figure 9.** Responses to DEX of the PBREM-120 and the -120 reporter constructs in HepG2 cells. The cells were cotransfected with the indicated reporter construct (Fig. 2), and the CAR or GR expression vectors, and then treated or not with DEX, as described under *Materials and methods*. The relative luciferase activity obtained for the PBREM-120 construct cotransfected with the empty vectors pCMX and pSG5 was set at 1. The asterisks denote significant differences as described in the legend of Fig. 4.



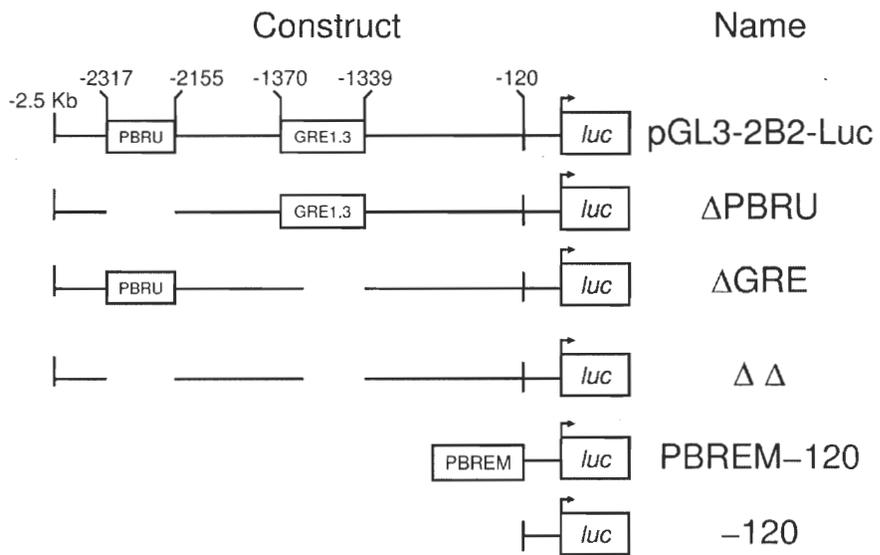


Figure 2

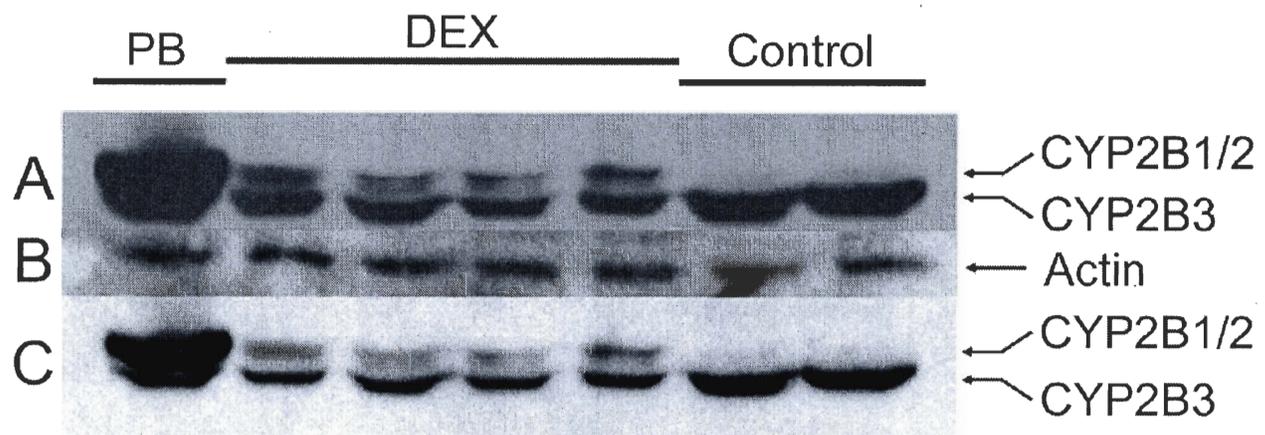


Figure 3

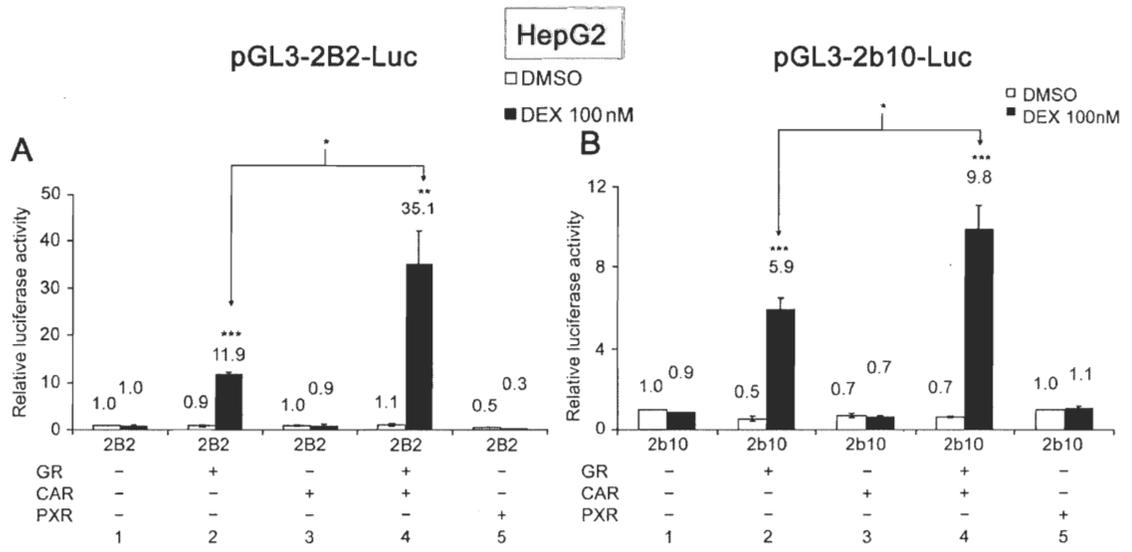


Figure 4

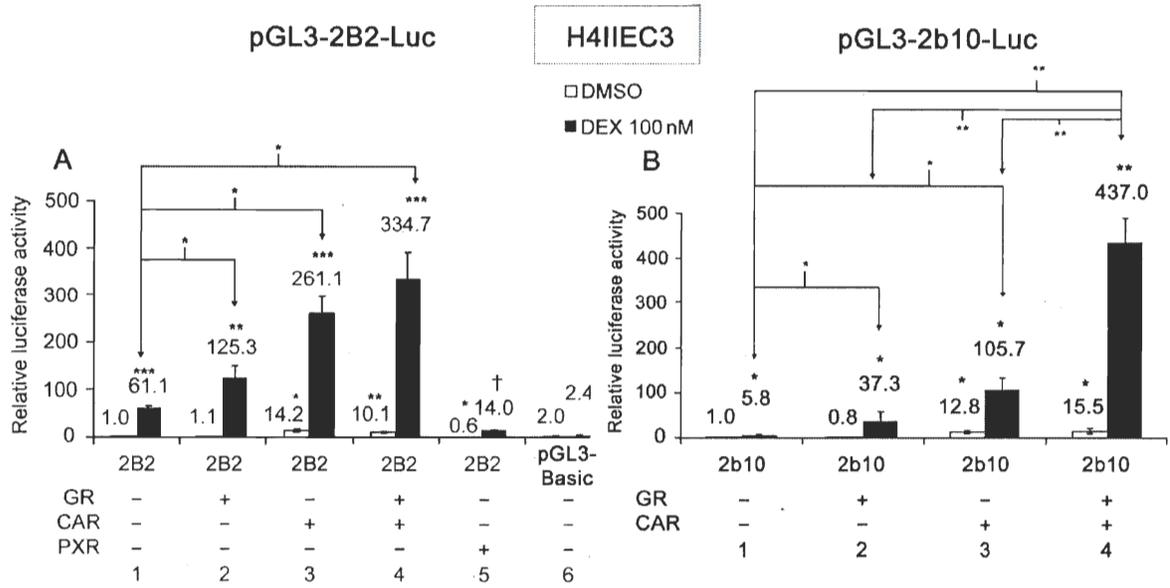


Figure 5

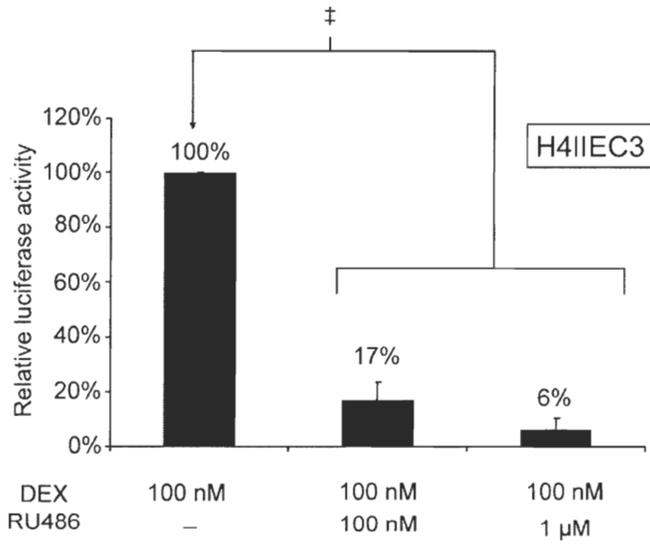


Figure 6

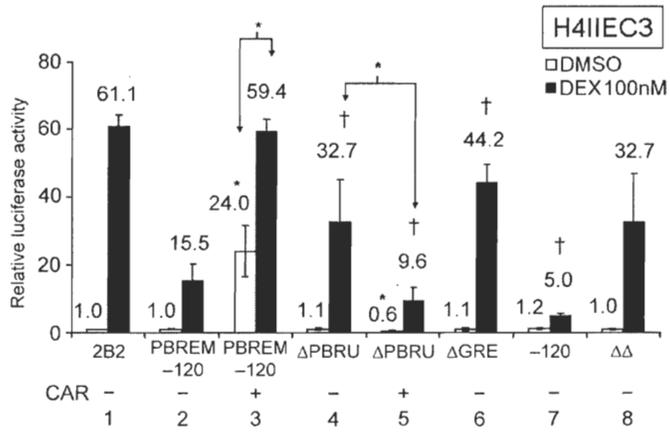


Figure 7

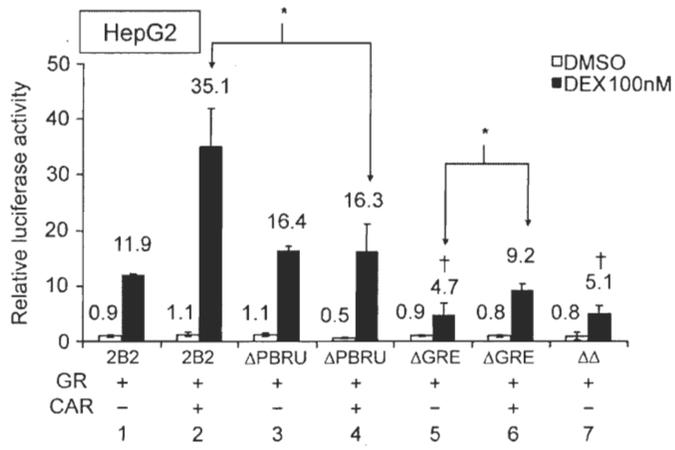


Figure 8

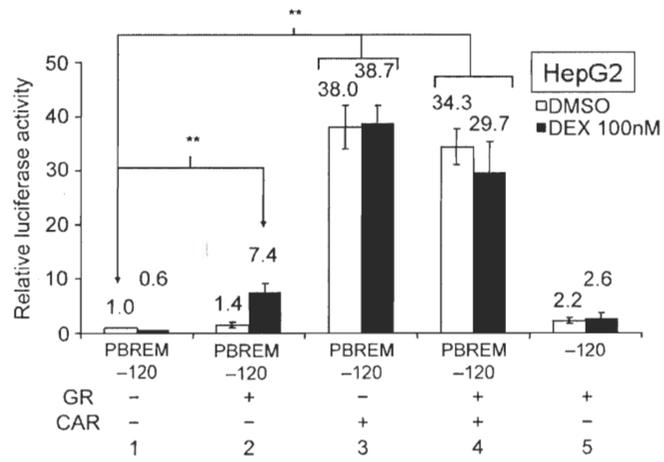


Figure 9

## **4. Chapitre IV – La région 5' flanquante de *CYP2B2* contient une unité de réponse aux glucocorticoïdes**

### **Avant-propos**

Les travaux présentés dans cette section le sont sous forme d'un article publié (*Biochemical Pharmacology* 76:1298-1306, 2008). Le manuscrit présenté ici est la version finale acceptée. J'ai conçu les expériences et j'ai effectué toutes les manipulations. Antoine Amaury Lachaud m'a appris les techniques et a participé à l'optimisation des retards sur gel. J'ai aussi participé activement à toutes les phases de la rédaction de l'article, en collaboration avec mon directeur de recherche, le Dr Alan Anderson.

## Résumé

CYP2B1 et CYP2B2 de rat ainsi que CYP2B10 de souris sont fortement induits par le phénobarbital dans le foie de rongeurs. La réponse au phénobarbital est principalement conférée par le *constitutive androstane receptor* (CAR). Toutefois, la dexaméthasone peut aussi induire les gènes *CYP2B* dans le foie de rat ou de souris. L'implication de trois régions dans cette réponse a déjà été démontrée : l'unité de réponse au phénobarbital, un élément de réponse aux glucocorticoïdes localisé à -1.3 kb en amont du site d'initiation de la transcription, ainsi qu'un élément situé dans le promoteur de base de *CYP2B2*. Dans cet article, nous démontrons, en effectuant des délétions successives de la région 5' flanquante de *CYP2B2*, la présence d'au moins deux nouveaux éléments de réponse aux glucocorticoïdes ou sites de fixation pour des facteurs accessoires. De plus, nous montrons que CAR agit en tant que facteur accessoire dans la réponse à la dexaméthasone *in vivo* dans le foie de souris, en stimulant les niveaux de base et induit. Ces éléments font partie d'un nouveau modèle proposé afin d'expliquer l'induction à la dexaméthasone du gène *CYP2B2* par l'intermédiaire d'une unité de réponse aux glucocorticoïdes.

# The *CYP2B2* 5' flank contains a complex glucocorticoid response unit

Étienne Audet-Walsh<sup>a</sup>, Antoine Amaury Lachaud and Alan Anderson

*Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, CHUQ, Québec, Canada and Département de biologie, Université Laval, Québec, Canada*

<sup>a</sup>Present address : Centre de recherche en endocrinologie moléculaire et oncologique, Centre hospitalier de l'Université Laval, 2705 boulevard Laurier, Québec, G1V 4G2, Canada

*Address correspondence to Alan Anderson, Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, 11, côte du Palais, Québec G1R 2J6 Canada, Tel.: +1 418 6915281, Fax: +1 418 6915439, E-mail: Alan.Anderson@bio.ulaval.ca*

Classification: Pharmacokinetics and Drug Metabolism

**Abbreviations.** CAR, constitutive androstane receptor; DEX, dexamethasone; EMSA, electrophoretic mobility shift assays; FBS, fetal bovine serum; GR, glucocorticoid receptor; GRE, glucocorticoid response element; GRU, glucocorticoid response unit; HNF-3, hepatocyte nuclear factor 3; oligo, oligonucleotide; PB, phenobarbital; PBRU, phenobarbital response unit; RXR, retinoid X receptor.

## **Abstract**

Rat CYP2B1 and CYP2B2 and mouse CYP2B10 are dramatically induced by phenobarbital (PB) in liver. PB responsiveness requires the constitutive androstane receptor (CAR). However, dexamethasone treatment can also induce *CYP2B* genes in both rat and mouse liver. Three regions have been shown to be involved in conferring dexamethasone responsiveness on *CYP2B2* reporter constructs. They are the PB response unit, a functional glucocorticoid response element at -1.3 kb in the 5' flank and a weak element in the basal promoter. We report here the identification, by deletion analysis of the *CYP2B2* 5' flank, of new glucocorticoid response elements or accessory factor sites. Moreover, we show that CAR acts as an accessory factor in the dexamethasone response in vivo of CYP2B10 protein in mice, by increasing both the basal and induced levels. We propose a model to explain the dexamethasone responsiveness of the *CYP2B2* gene in which induction is mediated by a complex glucocorticoid response unit.

**Keywords.** Dexamethasone, CYP2B2, CYP2B10, glucocorticoid response unit, glucocorticoid receptor, liver, constitutive androstane receptor.

## 1. Introduction

Hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymes are well known for their inducibility in response to xenobiotics [1,2]. In mouse liver the *Cyp2b10* gene and in rat liver the *CYP2B1* and *CYP2B2* genes are highly responsive to phenobarbital (PB) and PB-like inducers [1,2]. PB responsiveness is conferred by the PB response unit (PBRU), a 163-bp fragment located at -2317/-2155 in the rat *CYP2B2* 5'-flank [3,4]. Three DR-4 sites are located in the PBRU, NR1, NR2 and NR3, which are recognized by heterodimers of the constitutive androstane receptor (CAR) and the retinoid X receptor (RXR) [5-8]. CAR is normally retained in the cytoplasm of untreated hepatocytes and becomes concentrated in the nucleus in response to PB treatment [9]. There, it is thought to activate transcription of its target genes by binding to the NR sites [6,8,10,11].

Induction of *CYP2B* genes by dexamethasone (DEX) was described some time ago [12-14]. Although the specific mechanisms involved in DEX responsiveness are still unclear, the basal level of hepatic CYP2B10 protein is reduced in mice with a targeted glucocorticoid receptor (GR) gene disruption, and the CYP2B10 protein is not inducible by DEX in such animals [15]. We have shown elsewhere that DEX induction of *CYP2B2* and *Cyp2b10* reporter genes is mediated by GR and that CAR acts as an accessory factor, by stimulating this response (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). For *CYP2B2* reporters, the roles of the PBRU and of a previously reported glucocorticoid response element (GRE) situated at -1.3 kb [16], referred to here as GRE1.3, were studied. Both were found to be necessary for maximal DEX responsiveness. However, the results suggested that other sites, GREs or accessory sites, are also required for maximal

responsiveness. We report here the identification of new elements in the *CYP2B2* 5' flank that are necessary to obtain maximal DEX responsiveness, indicating that *CYP2B2* induction by DEX is mediated through a complex glucocorticoid response unit (GRU).

## 2. Materials and methods

### 2.1 Materials and animals

DEX was from Sandoz (Boucherville, Canada) and was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) (1:100 v/v) for cell culture treatment. All enzymes were from Fermentas (Burlington, Canada). Waymouth's medium, minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin and gentamicin were from Invitrogen (Burlington, Canada). Oligonucleotide (oligo) primers, DMSO and other chemicals were from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). C57-Black/6 mice (20-25 g) were from Charles River (St-Constant, Canada). Mice in which the *Car* gene has been subjected to targeted inactivation [17] were provided by Dr. David Moore. Animals were treated in accordance with the requirements of the Comité de protection des animaux du CHUQ/CPAC.

### 2.2 Plasmids and plasmid constructs

pSG5-hGR, an expression vector for human GR, was from J.M. Pascussi. The pGL3-2B2X vector (herein referred as pGL3-2B2-Luc), based on the pGL3-Basic vector (Promega, Montréal, Canada) and containing 2.5 kb of the *CYP2B2* 5'-flank, including the natural promoter and the PBRU, subcloned upstream of the *luc* gene, has been described [18]. The different deletion constructs were prepared by amplification of pGL3-2B2-Luc with primers (see Table 1) flanking the region to be deleted, both having the same restriction site (*EcoRI*) [19]. The PCR products were digested with both *EcoRI* and *DpnI* and finally

ligated with T4 DNA ligase to obtain the new constructs (Fig. 1). For the construction of the -1180/-1148 construct, the pGL3-120 plasmid [18] was amplified and the -1180/-1148 fragment was fused to the reverse primer; both primers (see Table 1) had the same restriction site (*Xho*I) and PCR products were treated as for the different deletion constructs. All plasmids were purified with purification kits (Qiagen, Mississauga, Canada), and the relevant regions were subjected to DNA sequencing by the DNA sequencing service of the Centre de recherche du CHUL (Québec, Canada).

### **2.3 Cells and transfection assays**

HepG2 cells and H4IIEC3 cells were cultured and maintained (5%CO<sub>2</sub>/37°C) in medium B [20] supplemented with 10% (v/v) FBS plus antibiotics (gentamicin at 50 mg/ml or penicillin-streptomycin at 100 U/ml and 100 µg/ml, respectively). All transfections were performed in duplicate with GeneJuice® reagent (VWR International, Montréal, Canada) as described elsewhere (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). Unless noted otherwise, each transfection was performed at least three times. DEX treatments were for 24 h for HepG2 cells and 48 h for H4IIEC3 cells; after 24 h the H4IIEC3 cells were washed once with HEPES buffer (6.4 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.6) and fresh medium was added. After the DEX treatments, the medium was removed, cells were washed once with HEPES buffer, 120 µl of passive lysis buffer (Promega) was added, and the cells were harvested by scraping and lysed by freeze-thaw treatment. Luciferase activity of each sample was assayed by luminometry with the Dual Luc kit (Promega). The firefly luciferase values were divided by the *Renilla* luciferase values to obtain the relative

luciferase activity. For all the experiments, DEX was added at 100 nM and DMSO was present at a dilution of 1:1000 (v/v) in the medium.

#### **2.4 Microsomes and Western blotting**

The mice were treated with DEX (50 mg/kg, i.p.) or vehicle (water with 0.15% methyl-4-hydroxybenzoate and 0.02% propyl-4-hydroxybenzoate, i.p.). Three injections were given, one every 24 h, and 24 h after the last injection the mice were sacrificed and liver microsomes were isolated [21]. Western blots were performed as described previously [22]. The anti-CYP2B1 antibody [23], which recognizes mouse CYP2B forms [24], was a gift from David Waxman. For detection of actin, the membranes were incubated with the H-196 antibody (sc-7210) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) for 1 h at a 1:1000 dilution. Actin was detected as an 80-kDa covalent complex as described elsewhere (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication).

#### **2.5 EMSA analysis**

The nuclear extracts were prepared [25] from pooled livers of two vehicle-treated and two DEX-treated rats. The oligos in single-stranded form were end-labeled (approximately  $10^5$  c.p.m./ $\mu\text{g}$ ) with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) using T4 polynucleotide kinase and were subsequently annealed. The sequences of the oligos used are shown in Table 2. The labeled oligos were added to the reaction mixture [26] containing 9  $\mu\text{g}$  of nuclear extract and incubated on ice for 30 min. Competitors (10 ng or 100 ng) were added

as specified in the figures. Binding reaction mixtures (18  $\mu$ l ) were loaded on pre-run polyacrylamide gels (5%) and subjected to electrophoresis for 1.5 h at 10.5 V/cm. Products were revealed using a PhosphorImager screen and images were obtained using a Storm 860 PhosphorImager (Molecular Dynamics/GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

## **2.6 Data analysis**

Unless specified otherwise, data are shown as the average  $\pm$  S.D. of at least three independent experiments. Differences were assessed by Student's t-test.

### 3. Results

#### 3.1 Identification of a GRE in the *CYP2B2* 5' flank, functional in HepG2 cells.

In HepG2 cells, deletion of GRE1.3 only, or of GRE1.3 and the PBRU, reduces but does not abolish DEX responsiveness; the PBRU is required only for the subsequent stimulation of DEX induction by CAR (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). Given that the reporter construct is still DEX-responsive when both GRE1.3 and the PBRU are deleted, we analyzed *CYP2B2* 5' deletion constructs for their responsiveness to DEX in HepG2 cells. Successive deletions of the 5' distal region between -2506 and -1180 (Fig. 1) led first to a reduction and then to a restoration of both the basal and induced levels (Fig. 2A), but did not affect appreciably the fold-induction (Fig. 2B). However, further deletion to -1148, as well as all subsequent deletions to -145, essentially completely abolished DEX responsiveness, (Figs. 2A and B). Thus, two reporter constructs define a region of the *CYP2B2* 5' flank making a major contribution to DEX responsiveness in HepG2 cells: the -1180 reporter construct retained DEX responsiveness but the -1148 reporter construct did not. These results indicate that a GRE or an accessory site lies in the 32-bp region between -1180 and -1148. There is a putative GRE in this region, similar to the GRE consensus sequence and where all the critical sites are conserved (Fig. 2C). When a fragment containing this putative GRE was fused to the *CYP2B2* basal promoter, it conferred DEX responsiveness, and indeed the response was greater than that conferred by the 2.5 kb *CYP2B2* 5' flank (Fig. 2D).

### **3.2 Identification of sequence elements in the *CYP2B2* 5' flank required for maximal DEX responsiveness in H4IIEC3 cells**

As for the HepG2 cells, we analyzed the *CYP2B2* 5' flank to look for GRE(s) or accessory sites responsible for conferring DEX responsiveness in H4IIEC3 cells. Substantial DEX responsiveness was retained in all deletion constructs up to -192 (Fig. 3A). It is noteworthy that the 32-bp region between -1180 and -1148 that conferred DEX responsiveness in HepG2 cells (Fig. 2) did not do so in H4IIEC3 cells, as demonstrated by the absence of an appreciable reduction of DEX responsiveness in the -1148 reporter construct (Fig. 3A). Deletion of the fragment between -192 and -145 led to a significant decrease in the fold induction (Fig. 3A). It thus appears that there is a response element or accessory site situated between these coordinates. The residual DEX responsiveness of the -145 construct (~4-fold) (Fig. 3A) corresponds to the level we observed with the basal promoter in H4IIEC3 cells (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication).

The DNA sequence of the -192/-145 fragment contains two putative GRE half sites, one on each strand, as well as a putative HNF-3 site (Fig 3B).

### **3.3 Proteins present in rat liver nuclear extracts bind to DNA sequence elements conferring DEX responsiveness in HepG2 and H4IIEC3 cells**

EMSA analyses with the -1180/-1148 fragment, the -192/-145 fragment and GRE1.3 were performed using liver nuclear extracts from vehicle-treated or DEX-treated rats (Fig. 4). For all three labeled fragments, retarded complexes were evident when liver nuclear

extracts prepared from vehicle-treated animals were employed (Fig. 4A, compare lanes 1, 5 and 9 with lanes 2, 6 and 10). These retarded complexes, labeled a and b, were better defined and more prominent when liver nuclear extracts prepared from DEX-treated animals were employed (Fig. 4A, compare lanes 1, 5 and 9 with lanes 3, 7 and 11). Moreover, two new retarded complexes, labeled c and d, were evident with extracts prepared from DEX-treated animals for the -1180/-1148 and -192/-145 fragments (Fig. 4A, lanes 3 and 7), but not for GRE1.3 (Fig. 4A, lane 11). The nature and possible role of retarded complexes c and d is presently unclear. All retarded complexes were specific, as they were absent when the incubations were carried out in the presence of the corresponding unlabeled fragment (Fig. 4, A and B). Performing the incubations in the presence of an unlabeled GRE consensus oligo eliminated essentially all of the retarded complexes a and b observed with fragments -1180/-1148 and GRE1.3 (Fig. 4B). This result suggests that GR does indeed bind to the putative GREs within the fragments, and this is in accordance with similar results obtained for the GRE1.3 fragment obtained by Jaiswal et al. [16]. The small amount of residual material present at the level of complex a in the presence of the GRE consensus oligo (Fig. 4B, lanes 6, 7, 19 and 20) presumably results from a complex that co-migrates with the GR complex and contains proteins other than GR that bind poorly to the GRE consensus. With the -192/-145 fragment, the most striking effect of the presence of unlabeled GRE consensus oligo was that the signal was poorly defined and tended to leave a smear (Fig. 4B, lanes 13 and 14). This may mean that in the absence of GR an unstable complex is formed. Similar results were obtained when the GRE1.3 oligo was included as an unlabeled competitor with the labeled -1180/-1148 fragment (data not shown).

### **3.4 CAR is essential for maximal DEX responsiveness in vivo**

As mentioned above, CAR acts as an accessory factor by stimulating the DEX response mediated by GR in HepG2 and H4IIEC3 cells (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). Therefore, we investigated the induction of CYP2B10 protein in mice lacking CAR in comparison to wild type mice. The results were similar to those obtained in the cultured cells. In the wild type CAR-positive mice, the level of CYP2B10 protein was higher than in CAR-negative mice (Fig. 5). Thus, CAR is not required for DEX induction of the *Cyp2b10* gene, as in its absence DEX induction is reduced but not abolished. Similar results have been reported for the induction of CYP2B10 mRNA by DEX in CAR-negative mice by Wei et al. [27].

#### 4. Discussion

In other work (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication) we showed that *CYP2B2* and *Cyp2b10* reporter constructs are DEX-responsive in HepG2 and H4IIEC3 cells, that the response is mediated by GR, and that CAR acts as an accessory factor to stimulate the response. Here we describe new regions in the *CYP2B2* 5' flank that contribute to DEX responsiveness, in addition to GRE1.3 reported by Jaiswal et al. [16] and the PBRU, and demonstrate that CAR also acts as an accessory factor in vivo.

The first new region, the 32-bp -1180/-1148 fragment containing a putative GRE (GRE2), was active in HepG2 cells but not in H4IIEC3 cells. This may be due to the presence of accessory factor(s) present in HepG2 cells but absent from H4IIEC3 cells. It is noteworthy that when this fragment was fused to the *CYP2B2* basal promoter, not only did it confer higher DEX responsiveness than when it was in its natural sequence context at -1.1 kb, but it conferred higher DEX responsiveness than the pGL3-2B2-Luc reporter construct itself. This is so despite the fact that the pGL3-2B2-Luc reporter contains at least one additional element that can contribute to DEX responsiveness in HepG2 cells, namely GRE1.3 (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). One possible explanation for this seemingly paradoxical observation is that the distance between GRE2 and the promoter may be important, and that by bringing it closer to the promoter, its capacity to confer DEX responsiveness was increased. Another possible explanation is that there are regulatory sequences in the *CYP2B2* 5' flank that can act negatively on DEX induction.

The possibility that there are negative regulatory sequences in the *CYP2B2* 5' flank is supported by the observation that successive deletions of the *CYP2B2* 5' flank between –

2506 and -1180 led first to a reduction and then to a restoration of both basal and DEX-induced levels (Fig. 2A). Somewhat similar effects have been reported by others for the basal levels of transcription of *CYP2B1* and *CYP2B2* reporters in HepG2 cells [28] and of *Cyp2b10* reporters in primary mouse hepatocytes [29]. Our results suggest that an element acting positively to increase basal and DEX-induced expression is present between -2506 and -1759 and is deleted in the -1759 reporter construct, and that an element acting negatively is present between -1759 and -1180 and is deleted in the -1180 construct. The region between -2506 and -1759 contains the PBRU, but it is not likely to be the putative positive element, as deletion of the PBRU alone does not reduce reporter expression in HepG2 cells (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication).

Two other GREs or accessory sites are active in H4IIEC3 cells but not in HepG2 cells. Both are located within 192 bp of the *CYP2B2* transcription start site. One, within the basal promoter (Fig. 3C), was described elsewhere (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). The other, which is described here, is located between -192 and -145. Once again the differences in the effects of the different GREs or accessory sites in the two cell lines may be a consequence of differences in their transcription factor or co-activator content. It is also conceivable that there is a species effect, HepG2 cells being of human origin and H4IIEC3 cells being of rat origin.

Whatever the explanation for the different results obtained with respect to DEX responsiveness conferred by the deletion constructs in the two cell lines, it is unlikely to be related to the level of CAR. HepG2 cells have vanishingly low levels of CAR mRNA [30] and furthermore they have long been used as a line essentially free of CAR to assess its capacity to activate transcription driven by putative CAR response elements [5,6]. Similarly

for the H4IIEC3 cells, they do not appear to contain appreciable amounts of CAR either, because in these cells exogenous CAR activates CAR-response element-driven transcription by 10- to 24-fold over basal levels (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). So, the conclusion is that neither HepG2 cells nor H4IIEC3 cells contain appreciable amounts of CAR and hence that we have to look elsewhere for the explanation for the differences in DEX responsiveness conferred by the deletion constructs.

Differences in RXR content are also unlikely to explain the different results obtained with respect to DEX responsiveness conferred by the deletion constructs in the two cell lines. Both contain RXR, easily detectable by Western blot analysis [31,32], consistent with the lack of a requirement for exogenous RXR in assays for CAR activation of CAR response element-driven reporter gene transcription [5,6] ( Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication.).

With respect to GR, it has long been known that in H4IIEC3 cells DEX-induced GR-responsive gene expression does not depend on the presence of exogenous GR [33], and it is well known that HepG2 cells require exogenous GR to be so responsive [34]. These observations are consistent with the presence of GR in H4IIEC3 cells and its absence from HepG2 cells.

Moreover, when saturating amounts of CAR and GR expression vectors are cotransfected into each cell line, DEX-induced luciferase levels are at least 10-fold higher in H4IIEC3 cells than in HepG2 cells (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication), suggesting that other transcription factors implicated in the response are present in H4IIEC3 cells. Finally, the -1180/-1148 fragment confers DEX responsiveness in the presence of GR in HepG2 cells but not in H4IIEC3 cells, whereas the -192/-145

region and the basal promoter confer DEX responsiveness in H4IIEC3 cells but not in HepG2 cells. These results are also consistent with the conclusion that additional transcription factors, present in HepG2 cells but not in H4IIEC3 cells, and vice versa, are needed for activation of transcription via these sites.

In the EMSA experiments with rat liver nuclear extracts as a source of proteins we observed two well defined retarded complexes with each of the labeled fragments, GRE1.3 and GRE2. The faster and slower moving complexes, referred to here as complexes a and b, probably represent GR monomers and dimers, respectively. Such GR monomer and dimer complexes have been observed by others [35,36]. The two complexes were effectively competed by a GRE consensus oligo, and furthermore both GRE1.3 [16] and GRE2 confer DEX responsiveness when placed adjacent to a basal promoter. Hence, we may conclude that they are indeed functional GREs, that they contribute to conferring DEX responsiveness on the *CYP2B2* reporter in cultured cells, and that they may similarly contribute to DEX responsiveness in rat liver.

The third labeled fragment used in the EMSA studies, -192/-145, does not contain a typical GRE, although it does contain two putative GRE half sites (Fig. 3B), as well as a putative hepatocyte nuclear factor-3 (HNF-3) site [28]. When this fragment was incubated with an extract from DEX-treated rats, four specific retarded complexes, migrating similarly to, but slightly slower than, complexes a, b, c and d, were generated. Their nature is unclear at this time. One possibility is that the two faster migrating complexes represent GR monomers and dimers respectively. However, GRE half sites would not be expected to generate dimer complexes and, according to conventional wisdom, GRE half sites require the presence of an accessory factor bound to an adjacent site [37]. Perhaps HNF-3 could

play that role for the GRE half sites present in the -192/-145 fragment. Perhaps too, GR and HNF-3 bind cooperatively. That could account for the apparent instability of the retarded complex observed in the presence of the GRE consensus oligo (Fig. 4B, lanes 13 and 14).

Use of liver nuclear extracts from DEX-treated rats led to much better defined retarded complexes in EMSA analyses, particularly for the -192/-145 fragment. This may reflect the formation with extracts from vehicle-treated rats of unstable complexes that tend to dissociate during the electrophoresis. This phenomenon could have several explanations, notably that DEX treatment leads to increased levels of other transcription factors [37] responsible for the formation of more stable retarded complexes or that DEX treatment leads to increased hepatic levels of GR itself. Thus, after DEX treatment, nuclear GR may participate in the formation of stable heterodimeric complexes. This interpretation is supported by the apparent destabilization of the retarded complexes formed with the -192/-145 fragment, in the presence of nuclear extracts from DEX-treated animals, when competed with the GRE consensus oligo. This gave rise to poorly defined complexes similar to those observed in the presence of nuclear extracts from vehicle-treated rats.

We reported elsewhere that CAR acts as an accessory factor in conferring DEX responsiveness in both HepG2 and H4IIEC3 cells (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). Here we show that it appears to have the same effect for the induction of CYP2B10 protein in mouse liver. It was already known that CYP2B10 mRNA is inducible by DEX in the liver of CAR-negative mice [27]. In any event, CAR is clearly not essential for the expression of *CYP2B* genes, although it does act to amplify both basal and DEX-induced levels of expression.

In conclusion, we have obtained evidence for the existence in the *CYP2B2* 5' flank of five regions that contribute to DEX responsiveness (Fig. 6). Although many details remain to be elucidated, it seems likely that they, as well as other elements yet to be defined, form part of a complex GRU (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication). The identification here of new sites contributing to DEX responsiveness, in addition to GRE1.3 and the PBRU (Audet-Walsh and Anderson, submitted for publication) supports this model. According to this model, DEX responsiveness depends on the GR pathway and CAR acts as an accessory factor through the PBRU. Other accessory factors may yet be identified. Questions that remain to be resolved include the determination of which of the GREs and accessory sites are functional in vivo to confer DEX responsiveness. The issue is particularly pertinent in view of the strikingly different responses observed in the two cell lines with respect to the GREs or accessory sites that confer DEX responsiveness. Another issue to be resolved is the relation of the sequence elements described here to the classical response to PB. Clearly the PBRU is involved in both, but in different ways. The role, if any, in PB induction of the other sequence elements involved in conferring DEX responsiveness remains to be elucidated. A yet more fundamental question relates to the physiological importance of the two pathways that can lead to induction of *CYP2B* genes in rodent liver.

## **Acknowledgments.**

The authors thank Sacha Auclair Vincent for reading the manuscript, Julie Dionne for the help with the figures, Denis Allard for providing the H4IIEC3 cells, Jean-Marc Pascussi for the GR expression vector, David Waxman for the anti-CYP2B antibody and David Moore for the CAR-negative mice. This work was supported by a grant from the Instituts de recherche en santé du Canada. This work has been submitted by EA-W to the Faculté des études supérieures, Université Laval, in partial fulfilment of the requirements for the degree of maître ès sciences. EA-W was the recipient of a studentship award from the Fondation J.-Arthur-Vincent.

## References

1. Handschin C and Meyer UA, Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 55: 649-673, 2003.
2. Waxman DJ and Azaroff L, Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* 281 ( Pt 3): 577-592, 1992.
3. Stoltz C, Vachon MH, Trottier E, Dubois S, Paquet Y, and Anderson A, The *CYP2B2* phenobarbital response unit contains an accessory factor element and a putative glucocorticoid response element essential for conferring maximal phenobarbital responsiveness. *J Biol Chem* 273: 8528-8536, 1998.
4. Trottier E, Belzil A, Stoltz C, and Anderson A, Localization of a phenobarbital-responsive element (*PBRE*) in the 5'-flanking region of the rat *CYP2B2* gene. *Gene* 158: 263-268, 1995.
5. Beaudet MJ, Desrochers M, Lachaud AA, and Anderson A, The *CYP2B2* phenobarbital response unit contains binding sites for hepatocyte nuclear factor 4, PBX-PREP1, the thyroid hormone receptor  $\beta$  and the liver X receptor. *Biochem J* 388: 407-418, 2005.
6. Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, and Negishi M, The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the *CYP2B* gene. *Mol Cell Biol* 18: 5652-5658, 1998.
7. Tzamelis I, Pissios P, Schuetz EG, and Moore DD, The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol* 20: 2951-2958, 2000.
8. Zhang Q, Bae Y, Kemper JK, and Kemper B, Analysis of multiple nuclear receptor binding sites for CAR/RXR in the phenobarbital responsive unit of *CYP2B2*. *Arch.Biochem Biophys.* 451: 119-127, 2006.
9. Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, and Negishi M, Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the *CYP2B* gene. *Mol Cell Biol* 19: 6318-6322, 1999.
10. Anderson A, The induction of CYP2B proteins in rodents by phenobarbital-like inducers: what has been discovered and what remains to be learned. *Acta Chim.Slov.* 55: 45-52, 2008.
11. Sueyoshi T and Negishi M, Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu.Rev.Pharmacol Toxicol.* 41: 123-143, 2001.

12. Corcos L, Phenobarbital and dexamethasone induce expression of cytochrome P-450 genes from subfamilies IIB, IIC, and IIIA in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 20: 797-801, 1992.
13. Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J, and Nemoto N, Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch.Biochem Biophys.* 369: 89-99, 1999.
14. Lake BG, Renwick AB, Cunninghame ME, Price RJ, Surry D, and Evans DC, Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver. *Toxicology* 131: 9-20, 1998.
15. Schuetz EG, Schmid W, Schutz G, Brimer C, Yasuda K, Kamataki T, Bornheim L, Myles K, and Cole TJ, The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 28: 268-278, 2000.
16. Jaiswal AK, Haaparanta T, Luc PV, Schembri J, and Adesnik M, Glucocorticoid regulation of a phenobarbital-inducible cytochrome P-450 gene: the presence of a functional glucocorticoid response element in the 5'-flanking region of the CYP2B2 gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 4237-4242, 1990.
17. Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, and Moore DD, The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 407: 920-923, 2000.
18. Paquet Y, Trottier E, Beaudet MJ, and Anderson A, Mutational analysis of the *CYP2B2* phenobarbital response unit and inhibitory effect of the constitutive androstane receptor on phenobarbital responsiveness. *J Biol Chem* 275: 38427-38436, 2000.
19. Bauer D, Wolfram N, Kahl GF, and Hirsch-Ernst KI, Transcriptional regulation of *CYP2B1* induction in primary rat hepatocyte cultures: repression by epidermal growth factor is mediated via a distal enhancer region. *Mol Pharmacol* 65: 172-180, 2004.
20. Adeli K and Sinkevitch C, Secretion of apolipoprotein B in serum-free cultures of human hepatoma cell line, HepG2. *FEBS Lett.* 263: 345-348, 1990.
21. Desrochers M, Christou M, Jefcoate C, Belzil A, and Anderson A, New proteins in the rat CYP2B subfamily: presence in liver microsomes of the constitutive CYP2B3 protein and the phenobarbital-inducible protein product of alternatively spliced CYP2B2 mRNA. *Biochem Pharmacol* 52: 1311-1319, 1996.
22. Roberge C, Beaudet MJ, and Anderson A, GABA(A)/central benzodiazepine receptor and peripheral benzodiazepine receptor ligands as inducers of

- phenobarbital-inducible CYP2B and CYP3A. *Biochem Pharmacol* 68: 1383-1389, 2004.
23. Waxman DJ, Rat hepatic cytochrome P-450 isoenzyme 2c. Identification as a male-specific, developmentally induced steroid 16 $\alpha$ -hydroxylase and comparison to a female-specific cytochrome P-450 isoenzyme. *J Biol Chem* 259: 15481-15490, 1984.
  24. Wiwi CA, Gupte M, and Waxman DJ, Sexually dimorphic P450 gene expression in liver-specific hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ -deficient mice. *Mol Endocrinol.* 18: 1975-1987, 2004.
  25. Bernier D, Thomassin H, Allard D, Guertin M, Hamel D, Blaquiére M, Beauchemin M, LaRue H, Estable-Puig M, and Belanger L, Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the  $\alpha$  1-fetoprotein gene promoter and the albumin/ $\alpha$  1-fetoprotein intergenic enhancer. *Mol Cell Biol* 13: 1619-1633, 1993.
  26. Zhang P, O'Loughlin L, Brindley DN, and Reue K, Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis. *J Lipid Res.* 49: 1519-1528, 2008.
  27. Wei P, Zhang J, Dowhan DH, Han Y, and Moore DD, Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharmacogenomics.J* 2: 117-126, 2002.
  28. Sommer KM, Ramsden R, Sidhu J, Costa P, and Omiecinski CJ, Promoter region analysis of the rat *CYP2B1* and *CYP2B2* genes. *Pharmacogenetics* 6: 369-374, 1996.
  29. Honkakoski P, Moore R, Gynther J, and Negishi M, Characterization of phenobarbital-inducible mouse *Cyp2b10* gene transcription in primary hepatocytes. *J Biol Chem* 271: 9746-9753, 1996.
  30. Rencurel F, Stenhouse A, Hawley SA, Friedberg T, Hardie DG, Sutherland C, and Wolf CR, AMP-activated protein kinase mediates phenobarbital induction of CYP2B gene expression in hepatocytes and a newly derived human hepatoma cell line. *J Biol Chem* 280: 4367-4373, 2005.
  31. Galli A, Stewart M, Dorris R, and Crabb D, High-level expression of RXR $\alpha$  and the presence of endogenous ligands contribute to expression of a peroxisome proliferator-activated receptor-responsive gene in hepatoma cells. *Arch.Biochem Biophys.* 354: 288-294, 1998.
  32. Osabe M, Sugatani J, Takemura A, Yamazaki Y, Ikari A, Kitamura N, Negishi M, and Miwa M, Expression of CAR in SW480 and HepG2 cells during G1 is

associated with cell proliferation. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 369: 1027-1033, 2008.

33. Grange T, Roux J, Rigaud G, and Pictet R, Two remote glucocorticoid responsive units interact cooperatively to promote glucocorticoid induction of rat tyrosine aminotransferase gene expression. *Nucleic Acids Res.* 17: 8695-8709, 1989.
34. Falkner KC, Ritter JK, and Prough RA, Regulation of the rat UGT1A6 by glucocorticoids involves a cryptic glucocorticoid response element. *Drug Metab Dispos.* 36: 409-417, 2008.
35. Lee HC, Shibata H, Ogawa S, Maki K, and Ikuta K, Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor  $\alpha$  promoter by glucocorticoid receptor. *J Immunol.* 174: 7800-7806, 2005.
36. Sheldon LA, Smith CL, Bodwell JE, Munck AU, and Hager GL, A ligand binding domain mutation in the mouse glucocorticoid receptor functionally links chromatin remodeling and transcription initiation. *Mol Cell Biol* 19: 8146-8157, 1999.
37. Schoneveld OJLM, Gaemers IC, and Lamers WH, Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1680: 114-128, 2004.
38. Luc PV, Adesnik M, Ganguly S, and Shaw PM, Transcriptional regulation of the *CYP2B1* and *CYP2B2* genes by C/EBP-related proteins. *Biochem Pharmacol* 51: 345-356, 1996.

## Figure legends

**Figure 1.** Schematic representation of the different *CYP2B2*-derived luciferase reporter constructs. The construct labelled 2B2 is the pGL3-2B2-Luc reporter, which contains 2.5 kb of the 5' flanking region of *CYP2B2*. All the other constructs were derived from this vector, as described in section 2.

**Figure 2.** Identification of a putative GRE conferring DEX responsiveness in HepG2 cells. The GR expression vector was cotransfected with the different reporter constructs for each luciferase assay experiment in HepG2 cells. **(A)** Response to DEX for the different reporter constructs. The relative luciferase activity obtained for the pGL3-2B2-Luc construct cotransfected with the GR expression vector in the presence of DMSO was set at 1. The asterisks (\*) and double asterisks (\*\*) denote significant differences ( $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively) between the marked column and its basal level. The single asterisk (\*) denotes a significant difference between the columns identified by the arrows ( $P < 0.05$ ). **(B)** Fold induction after DEX treatment for the different reporter constructs. **(C)** Sequence of the -1180/-1148 fragment. The putative GRE is in bold. The GRE consensus sequence is at the bottom of the panel and the asterisks represent the critical nucleotides of this element [37]. **(D)** DEX responsiveness conferred by the -1180/-1148 fragment when it was fused to the basal *CYP2B2* promoter. The -120 construct is the pGL3-120 plasmid [18], the 2B2 construct is shown in Fig. 1, and the -1180/-1148 construct contains the -1180/-1148 fragment fused directly upstream of the -120 basal promoter as described in Section 2.2. The single asterisk (\*) denotes a significant difference between the marked columns and the

-120 reporter construct ( $P < 0.05$ ). Nb refers to the number of independent transfection experiments performed.

**Figure 3.** Response to DEX of the different reporter constructs in H4IIEC3 cells. **(A)** Fold induction after DEX treatment for the different reporter constructs. The single asterisk (\*) denotes a significant difference between the two identified groups ( $P < 0.05$ ). Nb refers to the number of independent transfection experiments performed. **(B)** Sequence of the -192/-145 fragment showing the different potential transcription factor binding sites. The putative HNF-3 site has been reported elsewhere [28]. **(C)** Sequence of part of the *CYP2B2* basal promoter showing the putative GRE-half site adjacent to a C/EBP $\alpha$  binding site [38].

**Figure 4.** Binding of rat liver nuclear proteins to putative GREs or accessory sites and competition by the GRE consensus sequence. **(A)** Three fragments from the *CYP2B2* 5' flank were used as labelled oligos: -1180/-1148, -192/-145 and GRE1.3 (see Table 2). Nuclear extracts were from livers of vehicle-treated rats (C) or from livers of DEX-treated rats (DEX). The four arrows labelled a-d indicate the four retarded complexes that were detected. The competitors were the three corresponding unlabelled oligos (100 ng). **(B)** Competition analysis with the three corresponding unlabeled oligos as well as with the GRE consensus oligo (identified as GRE). The smaller amount of unlabeled competitor was 10 ng and the larger was 100 ng; 100 ng of unlabeled GRE1.3 was added. Nuclear extracts were from livers of vehicle-treated rats (C) or from livers of DEX-treated rats (D). pBluescript SK+ (pBSK+) plasmid DNA was added as a non-specific competitor (100 ng)

in lanes 3, 10 and 17. Complexes c and d seen in panel A were not well defined in this experiment due to the use of smaller wells.

**Figure 5.** CAR is required for the maximal induced level of CYP2B10 protein in mouse liver. (A) Western blot analysis of CYP2B10 protein in livers of vehicle-treated (CO) and DEX-treated wild type and CAR-negative mice. Each lane (10 µg of microsomal protein) corresponds to one animal. The results shown are representative of two independent experiments. CYP2B refers to constitutive immunoreactive CYP2B protein(s) present both in wild type and CAR-negative mice. Actin was used as loading control.

**Figure 6.** Model to explain DEX induction of the *CYP2B2* gene. The rectangles labeled 1-4 correspond to GRE1.3, the -1180/-1148 fragment, the -192/-145 fragment and the GRE half site present in the *CYP2B2* basal promoter, respectively. The *CYP2B2* gene and its 5' flanking region are not drawn to scale. The question mark (?) represents possible accessory factors contributing to the DEX response.

## Tables

**Table 1.** Oligos used to make the different *CYP2B2* reporter constructs

Name	Sequence
Universal 2B2 forward primer	ATGAATTCTCGAGCCCGGGCTAGCACGC
-1759	ATGAATTCAGTTGAGGCAAGTTGACCACA
-1370	ATGAATTCGAATAATATCAGTTAGGGTACA
-1180	ATGAATTCAGGGAACCATTGTCATTAGACA
-1148	ATGAATTCGAGACTATCTTTGTTAGGTTCACTATTCT
-940	ATGAATTCCTGATTTCTTACAGAACCCTAA
-740	ATGAATTCAGTTAGACCCGGGGCCCAAC
-600	ATGAATTCAGAGAGTGAAATGGGGACTC
-540	ATGAATTCAGGAACCAACAGACGGAGACAA
-500	ATGAATTCCTATTCTGTCAACTCAAACAT
-440	ATGAATTCGCCCCAATAATTTAAGATTATA
-381	ATGAATTCAGTGCATCTAGACTCAGACAA
-240	ATGAATTCCTAAGTAAACAGAGCTGACAAAA
-192	ATGAATTCACATAAAACAAGAGGCCTAAGT
-145	ATGAATTCCTGTTTCGTGGTTTCCTTGCC
Forward primer -1180/-1137	AACTCGAGCCCGGGCTAGCACGCGTAA
Reverse primer -1180/-1137	AACTCGAGAGGGAACCATTGTCATTAGACACAGTGTTCAGAGACTATCTTTCTATGGTGTGG GTAAGGGAATGAG

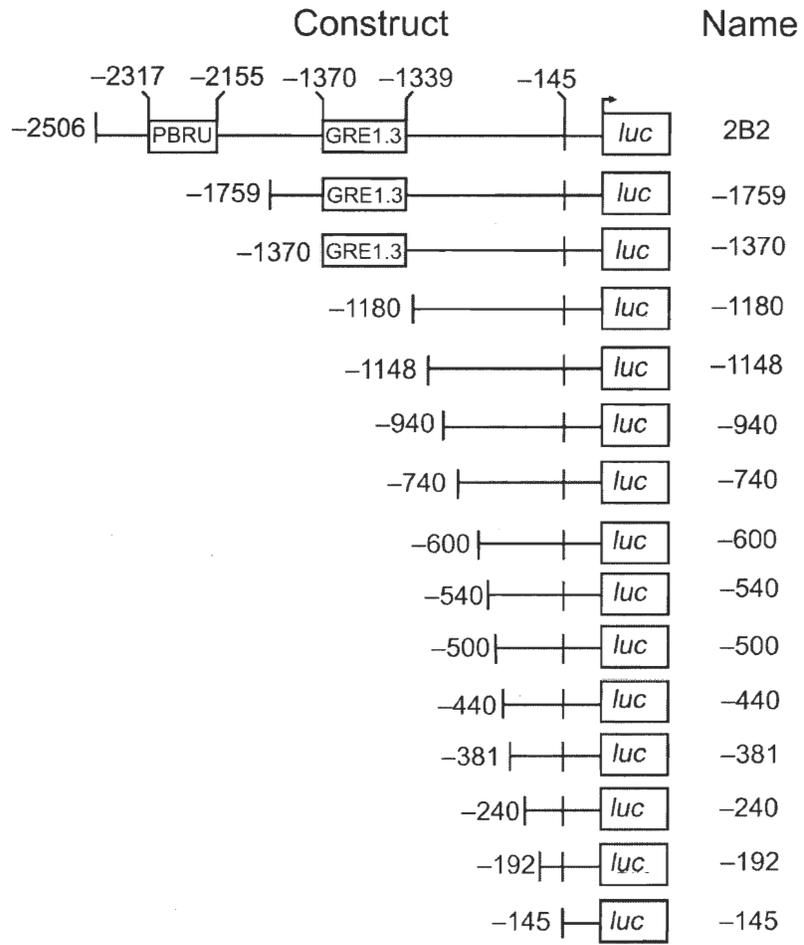
**Table 2.** Oligos used for EMSA analysis

Only the upper strand is shown.

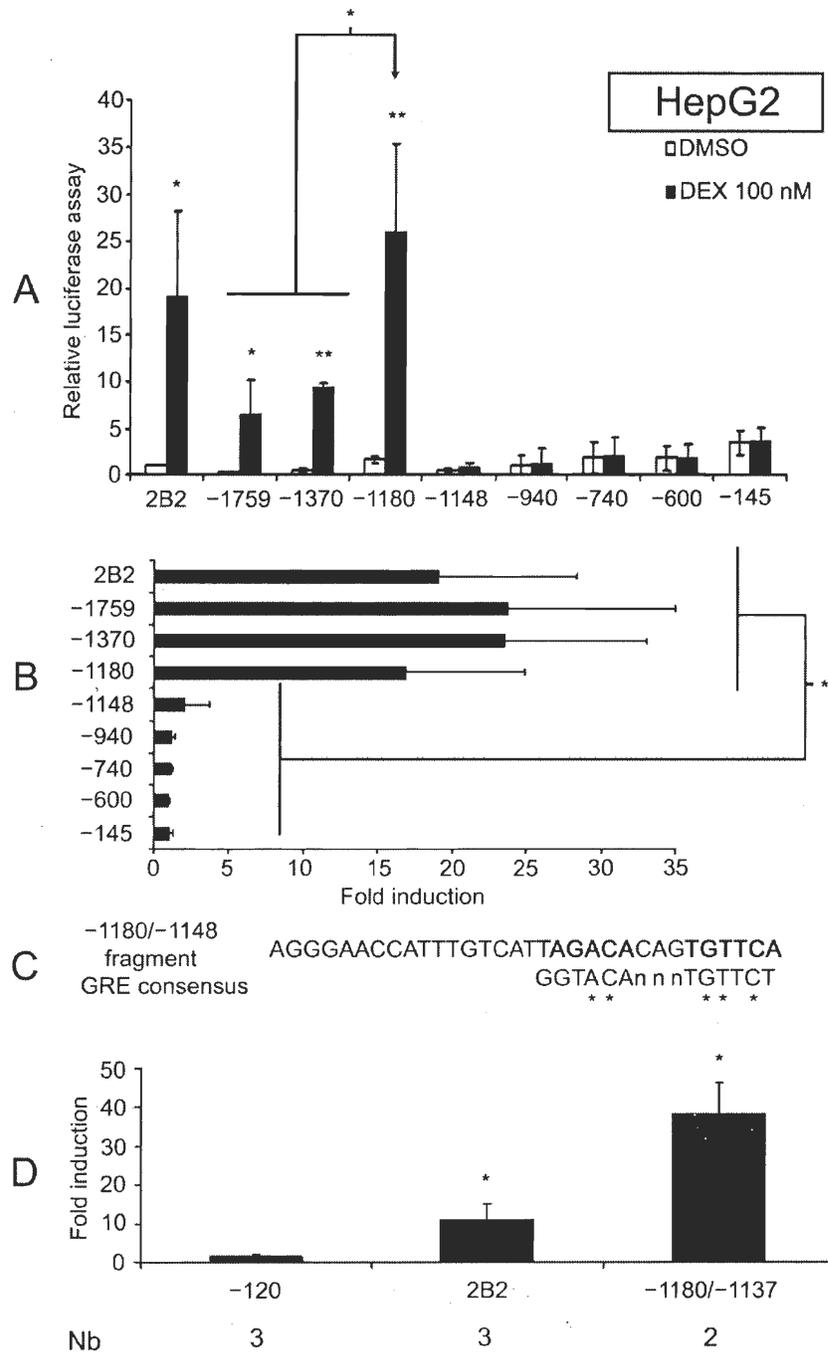
Oligo	Sequence
-1180/-1148	AAAGGGAACCATTTGTCATTAGACACAGTGTTCAAAA
GRE1.3	ATTGGTACAAAGTGTTCAAAC
-192/-145	ACATAAAACAAGAGGCCTAAGTCCCAGTGCCCTTTG TCCTGTGTAT
GRE consensus	AAGGTACAAAGTGTTTCATG

# Figures

## Figure 1



**Figure 2**





**Figure 4**

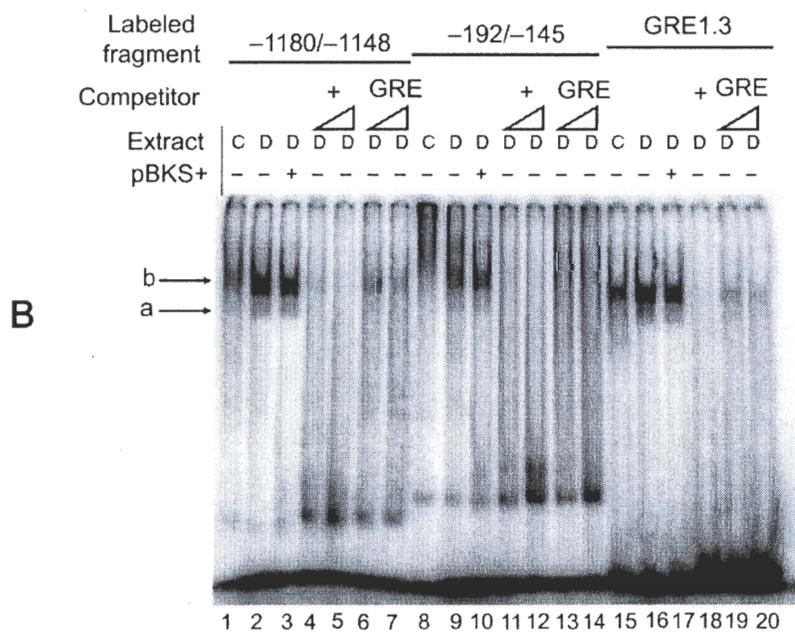
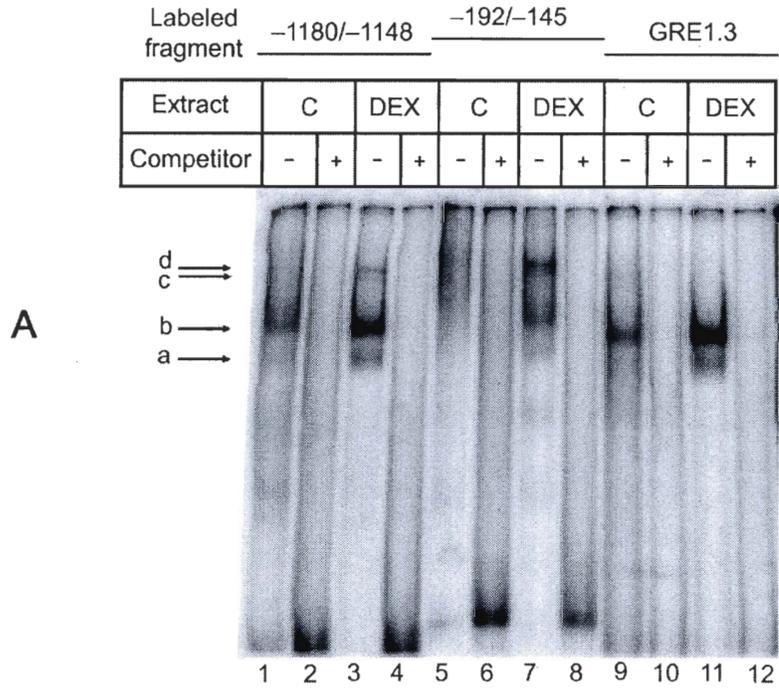


Figure 5

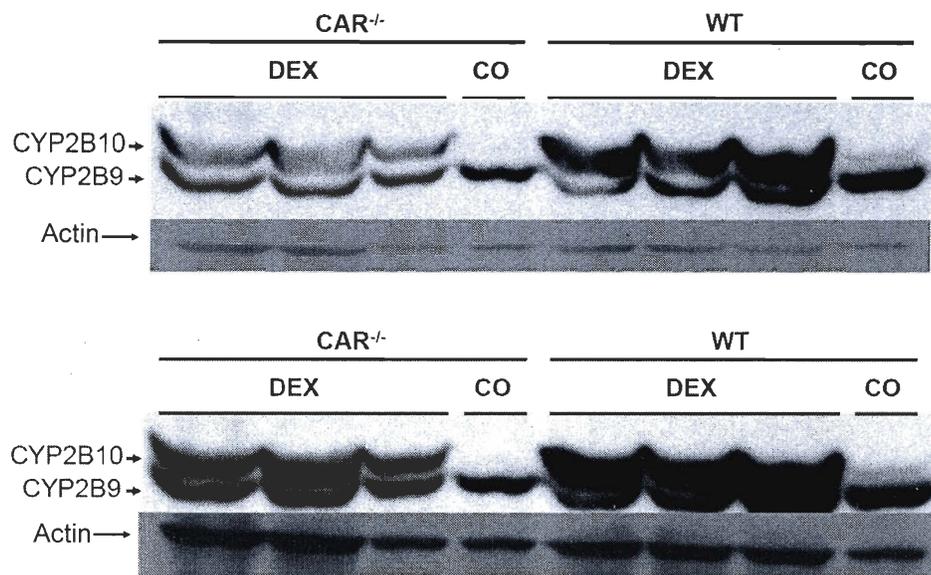


Figure 5

Figure 6

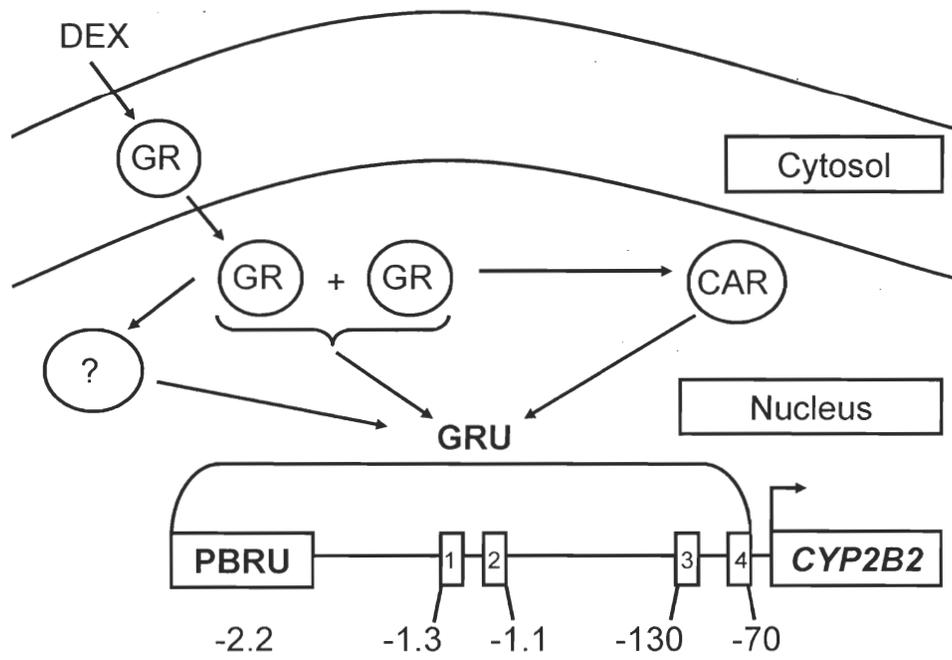


Figure 6

## Chapitre V – Discussion et conclusion

### 5.1 Développement d'une lignée cellulaire répondant au PB

Bien que les cellules dérivées des HepG2 par les différentes sélections au G418 n'aient pas répondu au PB, l'idée de développer une telle lignée est toujours d'intérêt. En effet, cela aiderait à répondre à plusieurs questions, entre autres l'interrogation à propos du récepteur du PB et des composés de type PB. Plusieurs nouvelles approches pourraient être utilisées dans le développement futur d'une lignée cellulaire répondant au PB.

Tout d'abord, l'utilisation d'un vecteur d'expression pour la CCRP serait envisageable. En effet, cette protéine est nécessaire au maintien de CAR dans le cytoplasme [70]. Par conséquent, si l'on veut reproduire un modèle fiable, il faut commencer à la première étape, lorsque CAR est cytoplasmique. De cette manière, les étapes suivant le traitement au PB et qui enclenchent le déplacement de CAR au noyau pourraient être décortiquées.

En second lieu, l'utilisation d'une lignée cellulaire autre que les HepG2 pourrait faciliter l'atteinte de l'objectif visé. En effet, les cellules HepG2, bien que dérivées d'un hépatocarcinome, ne ressemblent pas beaucoup à des hépatocytes en culture primaire, ne serait-ce qu'au niveau de la croissance ou de la morphologie (observation personnelle). De plus, ce sont des cellules humaines. Par conséquent, puisque seules les cellules différenciées, les hépatocytes en culture primaire, répondent au PB et que l'étude de cette induction dans le laboratoire se fait chez les rongeurs, il serait pertinent d'utiliser une lignée cellulaire de rongeur où les cellules sont le plus différenciées possible. Les cellules H4IIEC3, utilisées dans les expériences présentées aux chapitres III et IV, représentent une alternative intéressante puisqu'elles sont considérées comme une lignée cellulaire différenciée [136]. Un autre avantage est que CAR est capable d'y activer la transcription par la PBRU en contexte cellulaire normal, ce qui implique que les cellules H4IIEC3 possèdent des facteurs accessoires qui sont absents dans les cellules HepG2. Ces facteurs,

apparemment essentiels au fonctionnement normal de CAR, entrent probablement en scène dans la réponse au PB, d'où l'intérêt d'utiliser cette lignée puisqu'elle les possède déjà.

Troisièmement, l'utilisation de vecteurs d'expression pour les récepteurs membranaires GABA<sub>A</sub> (récepteur de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique) ou du PBR (récepteur périphérique des benzodiazépines) pourrait être une alternative intéressante, étant donné le lien potentiel entre ces récepteurs et la réponse au PB. En effet, le PB peut se lier à ces récepteurs, qui sont tous les deux présents dans le foie [137-139]. Justement, plusieurs de leurs ligands sont des inducteurs de type PB [120;140]. Des tests préliminaires de réponse au PB dans les cellules HepG2, suite à la transfection d'un vecteur d'expression pour la sous-unité  $\beta 3$  du récepteur GABA<sub>A</sub>, furent effectués, mais aucune réponse n'a été obtenue (données non montrées). Il reste toutefois possible que d'autres sous-unités soient essentielles dans les mécanismes d'induction, ou bien que ce soit par le PBR que passe la réponse au PB. Malgré des résultats préliminaires non concluants, il existe tout de même un parallèle entre ces récepteurs et la réponse au PB dans le foie. La cotransfection de vecteurs d'expression pour l'un ou l'autre de ces récepteurs dans les cellules en culture est d'intérêt, surtout que les niveaux protéiques de certaines de leurs sous-unités ont tendance à être fortement diminués dans les hépatocarcinomes humains et les lignées cellulaires [139].

Au final, bien que mes expériences n'aient pas eu l'effet escompté, beaucoup d'autres alternatives sont envisageables dans le développement futur d'une lignée cellulaire répondant au PB.

## 5.2 Utilisation du shRNA ciblant CAR

Bien que de nouveaux résultats (S. Auclair Vincent, et A. Anderson, données non publiés) viennent remettre en question ceux obtenus par Slitt et collaborateurs [109], puisqu'aucune induction au TSO n'a été observée dans les souris CAR<sup>-/-</sup>, l'utilisation du shRNA ciblant CAR est toujours d'intérêt. Non seulement il pourrait être utilisé afin de mimer des rats CAR<sup>-/-</sup>, mais il pourrait aussi être utilisé dans d'autres types d'expérience. Osabe et collaborateurs [131] ont récemment publié des travaux utilisant l'RNAi pour diminuer la quantité de protéine CAR dans des lignées cellulaires afin de montrer

l'importance du récepteur nucléaire dans la prolifération cellulaire. Ainsi, le shRNA ciblant CAR pourrait être utilisé dans divers projets de recherche étudiant les rôles de CAR, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

### 5.3 Une nouvelle voie de régulation des CYP2B décortiquée

L'induction des CYP2B de rongeurs à la DEX [81-84], et par extension aux autres glucocorticoïdes tels l'hydrocortisone et le corticostérone [39], a été étudié au cours des expériences dont les résultats sont présentés aux chapitres III et IV ainsi qu'aux annexes 1 et 3. Une nouvelle voie de régulation des *CYP2B*, peu connue jusqu'à ce jour, où le GR joue le rôle principal en réponse à la DEX a été décortiquée. Le GR, dont le rôle dans l'activation transcriptionnelle de CAR était connu [92;93], allait s'avérer être aussi en mesure de contrôler l'activité transcriptionnelle de certaines cibles de CAR.

Ces deux voies, CAR et GR, sont totalement indépendantes l'une de l'autre, comme il a été démontré par l'induction à la DEX de CYP2B10 dans les souris  $CAR^{-/-}$  (chapitre IV) [94] ainsi que par l'induction au PB qui est toujours possible dans les souris  $GR^{-/-}$  [91]. L'observation que la réponse à la DEX soit toujours présente dans les deux lignées cellulaires utilisées, tandis que la réponse au PB y soit absente, est un autre argument en ce sens. Même si une voie peut fonctionner sans l'autre, les deux récepteurs nucléaires, qui sont le pivot de l'activation transcriptionnelle dans leur voie respective, sont tout de même nécessaires à l'induction maximale dans les deux types de réponse. Ainsi, malgré leur indépendance apparente, les deux récepteurs nucléaires dépendent l'un de l'autre afin d'obtenir les niveaux induits les plus élevés des CYP2B lors de traitement à la DEX ou au PB, que ce soit *in vivo* ou dans les cellules en culture.

#### 5.3.1 Le rôle du GR dans l'induction à la DEX

Les travaux présentés ici démontrent clairement que GR est le récepteur nucléaire responsable de l'induction à la DEX des gènes *CYP2B* dans les deux lignées cellulaires utilisées. Dans les cellules HepG2, la seule chose manquante afin de conférer la réponse à la DEX est GR qui, une fois le vecteur d'expression transfecté, permet d'obtenir une

réponse des rapporteurs de *CYP2B2* et *Cyp2b10*. De plus, bien que les cellules H4IIEC3 aient une réponse sans que l'ajout de GR soit nécessaire, les résultats appuient tout de même le rôle prépondérant de ce récepteur nucléaire. Tout d'abord, l'ajout d'un vecteur d'expression du GR permet de stimuler l'induction, indiquant qu'il participe à la réponse à la DEX. Finalement, l'abolition de cette réponse par l'ajout de RU486 montre bien que l'induction des rapporteurs observée dans ces cellules passe aussi par le GR.

Deux éléments de réponse aux glucocorticoïdes potentiels avaient déjà été décrits [64;80]. C'est pourquoi les délétions de la PBRU, contenant le GRE de Stoltz et collaborateurs [64], du GRE1.3 [80], ou des deux à la fois, ont été effectuées. Loin de tout expliquer, ces deux sites ne semblent qu'avoir un effet mineur dans l'induction, puisque leur délétion ne diminue au maximum le taux d'induction que d'un facteur de 2. De plus, les deux sites ne semblent pas additifs dans les cellules H4IIEC3. En effet, la délétion du GRE1.3 ou de la PBRU a eu un impact négatif sur les niveaux induits, mais la délétion des deux sites à la fois n'a pas entraîné de diminution accrue des niveaux induits, ce qui suggère que les deux sites contribuent peu à la réponse ou que d'autres éléments de réponse peuvent prendre le relais en leur absence. Il est à noter qu'il reste toujours à mieux caractériser le GRE putatif de la PBRU.

Dans le but d'identifier les autres éléments de réponse impliqués dans l'induction à la DEX, des délétions successives de la région 5' flanquant de *CYP2B2* ont été effectuées sur la construction pGL3-2B2-Luc. Les expériences avec les différentes délétions ont montré l'existence de trois régions importantes dans l'induction à la DEX de *CYP2B2*. Dans les HepG2, une région critique de 32 pb, a été délimitée entre -1180 et -1148. Ce fragment, lorsque fusionné au promoteur de base de *CYP2B2*, peut conférer une forte induction à la DEX dans les cellules HepG2, près de 40 fois le niveau de base, ce qui est beaucoup plus élevé que lorsque des tests similaires sont effectués avec les 2.5 kb de la région 5' flanquant de *CYP2B2*. Bien que la démonstration de l'importance de ce site ait été faite, par l'abolition de la réponse, en l'enlevant dans la construction -1148 et par sa capacité à conférer la réponse à un promoteur de base, il reste à décrire précisément le(s) site(s), autre qu'un GRE, qui s'y cache(nt) peut-être.

Deux autres régions ont été découvertes dans les cellules H4IIEC3. Toutes les deux se situent dans la région proximale du 5' flanquant de *CYP2B2*. Il est à noter que le fragment -1180/-1148 n'est pas actif dans les cellules H4IIEC3, tandis que les deux régions actives dans les cellules H4IIEC3 ne le sont pas dans les cellules HepG2. Cette différence est probablement causée par des facteurs accessoires présents dans un type cellulaire et absent de l'autre, et vice-versa.

Malgré la découverte de régions critiques et non pas de sites précis impliqués dans la réponse aux glucocorticoïdes, il est évident que les résultats présentés dans ce mémoire montrent que plusieurs sites sont requis afin d'obtenir la réponse maximale à la DEX. Des complexes retardés spécifiques à des extraits nucléaires d'hépatocytes traités à la DEX ont été identifiés pour les oligos -1180/-1148 et -192/-145. De plus, deux complexes présents dans les extraits nucléaires de foies non-traités sont enrichis dans les extraits nucléaires provenant de foies traités à la DEX. Il reste encore à mieux caractériser les régions critiques, afin de déterminer où le GR s'y fixe et de déterminer quels autres facteurs s'y lient, par exemple en changeant les bases des oligos utilisés pour les retard sur gel, en mutant ces séquences dans les plasmides rapporteurs ou par immunoprécipitation de la chromatine.

### **5.3.2 Le rôle de CAR dans l'induction à la DEX**

Étant donné le rôle important joué par CAR dans le contrôle de la transcription des *CYP2B*, il était nécessaire de s'attarder à savoir s'il intervenait dans la réponse à la DEX de cette sous-famille. Étonnement, en présence de GR et de DEX, CAR est capable d'activer la transcription de la PBRU lorsqu'elle est en contexte naturel dans les HepG2. Ainsi, pour la première fois, CAR joue le rôle d'un facteur accessoire, en stimulant la réponse à la DEX passant par GR. Il est facteur accessoire puisqu'en soi il ne peut conférer la réponse. Mais lorsque GR est présent, CAR peut stimuler la réponse à la DEX, le tout par la PBRU en contexte naturel dans les cellules HepG2 et H4IIEC3.

Cette stimulation de la réponse à la DEX par CAR est plus difficile à mettre en évidence dans les cellules H4IIEC3. La capacité qu'a CAR d'activer les niveaux de base, ce

qui est d'un grand intérêt pour nous, vient complexifier l'interprétation des résultats. CAR semble jouer dans cette lignée le rôle d'amplificateur, puisque par sa présence il augmente les niveaux basal et induit. Quoiqu'il en soit, la nécessité d'avoir du CAR dans les cellules afin d'obtenir la réponse maximale à la DEX montre que dans cette lignée aussi CAR agit en tant que facteur accessoire, puisque c'est toujours GR qui est responsable de l'induction en soi.

La mise en évidence que CAR agit de façon similaire dans les souris appuie également son importance dans l'induction à la DEX. Il avait déjà été démontré que CAR jouait un rôle dans les niveaux de base de CYP2B10 *in vivo* [141;142], et cela est appuyé par les résultats présentés dans ce mémoire. La démonstration que les niveaux induits à la DEX de CYP2B10 sont moindres dans les souris CAR<sup>-/-</sup> appuie fortement les résultats obtenus dans des cellules en culture, tout en montrant que CAR agit en tant que facteur accessoire dans la réponse. Ces résultats sont en lien avec l'une des premières hypothèses de travail, présentée au cours du chapitre II. En effet, le développement de shRNA ciblant l'ARNm de CAR partait de l'idée que CAR intervenait en tant qu'amplificateur de l'expression basale et induite, plutôt que comme amplificateur de l'induction, le tout basé sur les résultats de Slitt et collaborateurs [109]. C'est justement ce qu'il fait dans l'induction à la DEX dans les modèles utilisés au cours de mes expériences, en augmentant les niveaux basal et induit. Ainsi, CAR jouerait le rôle de facteur accessoire, une nouvelle fonction pour ce récepteur nucléaire, non seulement *in vitro* dans les cellules en culture mais aussi *in vivo*, chez la souris, et par extension chez le rat également.

Il est surprenant de voir que les niveaux induits à la DEX de l'ARNm de CYP2B10 sont aussi élevés dans les souris CAR<sup>-/-</sup> que CAR<sup>+/+</sup> [94]. En effet, Wei et collaborateurs [94] avaient conclu que CAR n'intervenait pas du tout dans la réponse à la DEX, ce qui semble être en contradiction avec nos résultats. Par contre, une seule image appuyait leur dire, une image sur laquelle l'ARNm dans les souris CAR<sup>-/-</sup> semblait tout de même plus faible que dans les souris CAR<sup>+/+</sup>. Il serait intéressant de regarder l'induction à la DEX au niveau de l'ARNm de CYP2B10 dans les souris CAR<sup>-/-</sup> et CAR<sup>+/+</sup>, afin de voir si oui ou non à ce niveau il y a vraiment une diminution, ou bien si la diminution n'est qu'au niveau

protéique. Quoiqu'il en soit, nos résultats, tant *in vivo* qu'*in vitro*, appuient le rôle accessoire de CAR dans l'induction à la DEX des *CYP2B* de rongeurs. Ce dernier point pourrait être étudié avec le shRNA ciblant CAR présenté au chapitre II. En injectant la SEC dans la veine de la queue de rat, il serait possible de transférer l'ADN dans les hépatocytes. Par la suite, il serait possible de voir la conséquence de la diminution de CAR sur la réponse à la DEX directement dans le foie de rat.

### 5.3.3 Site de régulation inconnu

Dans le chapitre IV, il a été démontré que les niveaux basal et induit à la DEX varient beaucoup au fur et à mesure que la région 5' flanquant du gène *CYP2B2* est enlevée. De telles variations ont précédemment été rapportées pour les niveaux de base de rapporteurs de *CYP2B2* [51] et de *Cyp2b10* [129]. Ces expériences montraient que plus on ampute la région distale, plus les niveaux de base augmentent.

On peut penser que ces vagues sont causées par la délétion d'éléments de régulation du niveau global, puisqu'elles n'affectent pas les taux d'induction. Les *CYP2B* sont exprimés seulement dans certains tissus et leur induction à divers xénobiotiques est différente d'un tissu à l'autre. Par exemple, *CYP2B10* est fortement inductible au PB dans le foie, alors qu'aucune induction au PB n'est visible dans les poumons, organe où les niveaux de base sont élevés [40]. Il serait donc normal de retrouver plusieurs éléments de régulation dans le 5' flanquant de ces gènes. Ce sont peut-être de tels sites qui sont à l'origine des vagues observées et en enlevant des segments plus petits, il serait possible de déterminer l'emplacement de ces sites afin de les étudier.

### 5.3.4 Modèle de réponse à la DEX des *CYP2B*

Les travaux présentés aux chapitre III et IV suggèrent fortement la présence d'une GRU dans la région 5' flanquante de *CYP2B2*, en plus d'une PBRU. Dans le modèle proposé en ce qui a trait à l'induction des *CYP2B* à la DEX, résumé à l'image 4-6, GR est le pivot de la réponse, tandis que CAR et d'autres facteurs accessoires viennent la stimuler. Cela constitue une toute nouvelle voie de régulation de cette sous-famille, et bien que les

régions critiques n'aient été délimitées que pour un gène de rat, il est probable que ses homologues de souris contiennent aussi une multitude de GRE, étant donné la forte induction de CYP2B10 chez la souris lors de traitement à la DEX.

## **5.4 Un mécanisme d'induction endogène des *CYP2B*, pour faire quoi?**

### **5.4.1 Participation à la métabolisation des androgènes**

L'induction à la DEX ainsi que la voie globale d'activation transcriptionnelle des *CYP2B* de rongeurs par le GR sont maintenant mieux connues suite aux travaux présentés ici. Par contre, le rôle physiologique d'un tel mécanisme endogène d'induction des *CYP2B* reste à découvrir. En effet, puisque les *CYP2B* sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, la raison de l'existence de mécanismes d'induction par ces composés est facile à comprendre. Par contre, si une voie endogène, celle des glucocorticoïdes, peut activer la transcription des *CYP2B*, c'est probablement qu'ils ont un rôle à jouer pour le bien-être de l'organisme même en absence de xénobiotiques.

Les *CYP2B* sont reconnus depuis longtemps comme pouvant hydroxyler les androgènes, principalement la testostérone [121], leur fonction pourrait donc être au niveau de la régulation de ces hormones stéroïdiennes. Par exemple, l'induction à la DEX de CYP2B10 dans le foie ou les reins est plus élevée chez des souris mâles que des souris femelles [87]. De plus, CYP2B10 n'est pas inductible au PB dans les reins, alors qu'il y est fortement inductible par la DEX [87]. Finalement, la castration a un fort impact sur l'induction et les niveaux de CYP2B10, aussi bien dans le foie que dans les reins des souris mâles [87]. Étant donné une différence sexuelle dans l'expression basale et inductible à la DEX des gènes *CYP2B*, tant chez le rat [121] que chez la souris [87;126] ainsi que leur forte activité monooxygénase envers les androgènes, l'hypothèse voulant que les *CYP2B* interviennent dans la régulation des hormones stéroïdiennes sexuelles semble être plausible et nécessiterait donc un approfondissement.

Kawamoto et collaborateurs [143] ont démontré la stimulation de l'activation par CAR d'un rapporteur, contenant 5 copies du site NR1 du PBREM de souris, par les

estrogènes. Au contraire, la progestérone et les androgènes diminueraient l'activation par CAR de ce rapporteur. De plus, l'estrogène induirait CYP2B10 dans des hépatocytes en culture primaire. Leurs expériences, effectuées dans des cellules HepG2 et des hépatocytes en culture primaire appuient l'idée que les CYP2B aient un rôle à jouer dans la régulation des niveaux des hormones sexuelles. Ceci dit, il faut admettre qu'un certain mystère entoure le rôle physiologique de la forte induction hépatique des CYP2B.

#### **5.4.2 Impact sur la santé humaine**

L'un des volets qui stimule la recherche sur la régulation des CYP est leur implication au niveau pharmacologique. En effet, puisqu'ils sont impliqués dans la métabolisation de plus de 90% des médicaments [1], que plusieurs médicaments sont des inducteurs ou des inhibiteurs des CYP et que plusieurs médicaments peuvent être administrés en même temps, les effets thérapeutiques peuvent grandement varier d'un patient à l'autre en fonction de son profil génétique. Il est donc important de comprendre la cause de ces variations, ainsi que les voies de régulation des CYP.

Le cas du cyclophosphamide, un médicament utilisé dans les traitements anticancéreux [144], est une bonne démonstration des variations interindividuelles chez l'humain. Ce produit est un inducteur de type PB de CYP2B6 [144], un homologue de CYP2B1 et CYP2B2 du rat et de CYP2B10 de la souris [29]. Le cyclophosphamide est inactif tant qu'il n'a pas été monooxygéné par CYP2B6. Puisque l'activité de base de cette protéine montre une variabilité interindividuelle de plus de 100 fois chez l'humain [145], il va sans dire que l'effet inducteur du cyclophosphamide viendra probablement accentuer cette différence, augmentant par le fait même l'intervariabilité.

S'il advient que *CYP2B6* soit aussi inductible à la DEX, tout comme le sont ses homologues de rongeur, et comme le laissent entrevoir les résultats de Wang et collaborateurs [90], cela pourrait entraîner des conséquences importantes lors de cotraitement à la DEX et au cyclophosphamide. Les résultats de Lindley et collaborateurs [146] appuient d'ailleurs cette hypothèse. Basés sur des expériences effectuées dans des hépatocytes en culture primaire, ces auteurs montrent une augmentation de l'induction de

*CYP2B6* causée par un traitement au cyclophosphamide en présence de DEX [146]. Puisqu'en général les deux médicaments sont donnés ensemble lors de traitements anticancéreux [146;147], il serait important de bien comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse de *CYP2B6* face au cyclophosphamide et à la DEX, en plus des interactions entre les deux voies, afin d'ajuster les doses selon le profil génétique du patient.

## 5.5 Conclusion générale

En conclusion, les expériences présentées dans ce mémoire ont permis de définir une nouvelle voie de régulation des *CYP2B* de rongeurs, celle des glucocorticoïdes et du GR. De plus, cette voie s'est révélée être indépendante de la voie bien étudiée qui est celle de la réponse au PB. CAR, acteur principal dans la réponse au PB et dont le rôle reste toujours controversé, s'est lui aussi révélé comme participant à la voie de réponse aux glucocorticoïdes, en jouant le rôle de facteur accessoire. Il s'agit d'un nouveau rôle pour ce récepteur nucléaire, qui agit ici en tant qu'amplificateur et qui pourrait très bien intervenir de la sorte dans d'autres voies de régulation génique.

Bien que plusieurs éléments restent à éclaircir dans cette nouvelle voie d'activation transcriptionnelle, la multitude de régions impliquées montre que *CYP2B2*, et probablement d'autres gènes *CYP*, ont une GRU dans leur région 5' flanquant. Ainsi, les gènes *CYP2B* ont non seulement une unité de réponse au PB, contenant une multitude de sites de récepteurs nucléaires, mais aussi une unité de réponse aux glucocorticoïdes, ce qui démontre la régulation fine et précise exercée sur l'expression des gènes *CYP*.

## Liste de référencesReference List

1. Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, and Souidi M, Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann Biol Clin (Paris)* 64: 535-548, 2006.
2. Handschin C and Meyer UA, Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 55: 649-673, 2003.
3. Wallace K, Burt AD, and Wright MC, Liver fibrosis. *Biochem J* 411: 1-18, 2008.
4. Brown CM, Reisfeld B, and Mayeno AN, Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev.* 40: 1-100, 2008.
5. Huang W, Zhang J, Washington M, Liu J, Parant JM, Lozano G, and Moore DD, Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol Endocrinol.* 19: 1646-1653, 2005.
6. Sharma AD, Cantz T, Manns MP, and Ott M, The role of stem cells in physiology, pathophysiology, and therapy of the liver. *Stem Cell Rev.* 2: 51-58, 2006.
7. Whysner J, Ross PM, and Williams GM, Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol Ther.* 71: 153-191, 1996.
8. Yamamoto Y, Moore R, Goldsworthy TL, Negishi M, and Maronpot RR, The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer Res.* 64: 7197-7200, 2004.
9. Ishikawa T, The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci.* 17: 463-468, 1992.
10. Lévesque É, Hum DM, and Bélanger A., Rôle des UDP-glucuronosyltransférases (UGT) dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. *Médecine science* 17: 33-43, 2001.
11. Iyer KR and Sinz MW, Characterization of Phase I and Phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations. *Chem Biol Interact.* 118: 151-169, 1999.
12. Werck-Reichhart D and Feyereisen R, Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1: REVIEWS3003, 2000.

13. Nebert DW and Gonzalez FJ, P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu.Rev.Biochem* 56: 945-993, 1987.
14. Klaassen CD and Lu H, Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies. *Toxicol.Sci.* 101: 186-196, 2008.
15. KLINGENBERG M, Pigments of rat liver microsomes. *Arch.Biochem Biophys.* 75: 376-386, 1958.
16. GARFINKEL D, Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch.Biochem Biophys.* 77: 493-509, 1958.
17. Omura T and Sato R, A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 237: 1375-1376, 1962.
18. CONNEY AH and GILMAN AG, Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. *J Biol Chem* 238: 3682-3685, 1963.
19. REMMER H and MERKER HJ, [Enzyme induction and increase of endoplasmic reticulum in liver cells during phenobarbital (Luminal) therapy.]. *Klin.Wochenschr.* 41: 276-282, 1963.
20. Nebert DW, Nelson DR, and Feyereisen R, Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* 19: 1149-1160, 1989.
21. Debeljak N, Fink M, and Rozman D, Many facets of mammalian lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51. *Arch.Biochem Biophys.* 409: 159-171, 2003.
22. Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O, Imaoka S, Funae Y, Kurosawa N, Horiuchi T, and Yoshida Y, Sterol 14-demethylase P450 (P45014DM\*) is one of the most ancient and conserved P450 species. *J Biochem* 119: 926-933, 1996.
23. Gonzalez FJ and Nebert DW, Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* 6: 182-186, 1990.
24. Deng X, Yin F, Lu X, Cai B, and Yin W, The apoptotic effect of brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* on human hepatoma cells is mediated via Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> involved mitochondrial pathway. *Toxicol.Sci.* 91: 59-69, 2006.
25. Tanimoto Y, Kaneko H, Ohkuma T, Oguri K, and Yoshimura H, Site-selective oxidation of strychnine by phenobarbital inducible cytochrome P-450. *J Pharmacobiodyn.* 14: 161-169, 1991.

26. Thomas JH, Rapid birth-death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates. *PLoS.Genet.* 3: e67, 2007.
27. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, and Nebert DW, Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14: 1-18, 2004.
28. Xie W and Evans RM, Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J Biol Chem* 276: 37739-37742, 2001.
29. <http://and.drnelson.utm.edu/>. 2008.  
Ref Type: Internet Communication
30. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, and ., The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6: 1-11, 1987.
31. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, and ., The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 10: 1-14, 1991.
32. Nuclear Receptor Nomenclature Committee, A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97: 161-163, 1999.
33. Burchell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Iyanagi T, Jansen PL, Lancet D, Mulder GJ, Chowdhury JR, Siest G, and ., The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol* 10: 487-494, 1991.
34. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, and Laudet V, How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet.* 17: 554-556, 2001.
35. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, and Evans RM, The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839, 1995.
36. Handschin C, Blattler S, Roth A, Looser R, Oscarson M, Kaufmann MR, Podvinec M, Gnerre C, and Meyer UA, The evolution of drug-activated nuclear receptors: one ancestral gene diverged into two xenosensor genes in mammals. *Nucl.Recept.* 2: 7, 2004.
37. Zelko I and Negishi M, Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys.Res.Commun.* 277: 1-6, 2000.

38. Schoneveld OJLM, Gaemers IC, and Lamers WH, Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim.Biophys.Acta* 1680: 114-128, 2004.
39. Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura J, and Nemoto N, Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch.Biochem Biophys.* 369: 89-99, 1999.
40. Kakizaki S, Yamamoto Y, Ueda A, Moore R, Sueyoshi T, and Negishi M, Phenobarbital induction of drug/steroid-metabolizing enzymes and nuclear receptor CAR. *Biochim.Biophys.Acta* 1619: 239-242, 2003.
41. Schilter B, Andersen MR, Acharya C, and Omiecinski CJ, Activation of cytochrome P450 gene expression in the rat brain by phenobarbital-like inducers. *J Pharmacol Exp.Ther.* 294: 916-922, 2000.
42. Urquhart BL, Tirona RG, and Kim RB, Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin.Pharmacol* 47: 566-578, 2007.
43. Anderson A, The induction of CYP2B proteins in rodents by phenobarbital-like inducers: what has been discovered and what remains to be learned. *Acta Chim.Slov.* 55: 45-52, 2008.
44. Waxman DJ and Azaroff L, Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* 281 ( Pt 3): 577-592, 1992.
45. Orrenius S, Ericsson JL, and Ernster L, Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes. A morphological and biochemical study. *J Cell Biol* 25: 627-639, 1965.
46. Yamada H, Ishii Y, Yamamoto M, and Oguri K, Induction of the hepatic cytochrome P450 2B subfamily by xenobiotics: research history, evolutionary aspect, relation to tumorigenesis, and mechanism. *Curr.Drug Metab* 7: 397-409, 2006.
47. Christou M, Wilson NM, and Jefcoate CR, Expression and function of three cytochrome P-450 isozymes in rat extrahepatic tissues. *Arch.Biochem Biophys.* 258: 519-534, 1987.
48. Wilson NM, Christou M, and Jefcoate CR, Differential expression and function of three closely related phenobarbital-inducible cytochrome P-450 isozymes in untreated rat liver. *Arch.Biochem Biophys.* 256: 407-420, 1987.
49. Hardwick JP, Gonzalez FJ, and Kasper CB, Transcriptional regulation of rat liver epoxide hydratase, NADPH-Cytochrome P-450 oxidoreductase, and cytochrome P-450b genes by phenobarbital. *J Biol Chem* 258: 8081-8085, 1983.

50. Adesnik M, Bar-Nun S, Maschio F, Zunich M, Lippman A, and Bard E, Mechanism of induction of cytochrome P-450 by phenobarbital. *J Biol Chem* 256: 10340-10345, 1981.
51. Sommer KM, Ramsden R, Sidhu J, Costa P, and Omiecinski CJ, Promoter region analysis of the rat CYP2B1 and CYP2B2 genes. *Pharmacogenetics* 6: 369-374, 1996.
52. Upadhyaya P, Rao MV, Venkateswar V, Rangarajan PN, and Padmanaban G, Identification and functional characterization of a cis-acting positive DNA element regulating CYP 2B1/B2 gene transcription in rat liver. *Nucleic Acids Res.* 20: 557-562, 1992.
53. Ram N, Rao MV, Prabhu L, Nirodi CS, Sultana S, Vatsala PG, and Padmanaban G, Characterization of a negative cis-acting DNA element regulating the transcription of CYP2B1/B2 gene in rat liver. *Arch.Biochem Biophys.* 317: 39-45, 1995.
54. Shaw GC and Fulco AJ, Barbiturate-mediated regulation of expression of the cytochrome P450BM-3 gene of *Bacillus megaterium* by Bm3R1 protein. *J Biol Chem* 267: 5515-5526, 1992.
55. Akiyama TE and Gonzalez FJ, Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription factors and nuclear receptors. *Biochim.Biophys.Acta* 1619: 223-234, 2003.
56. Luc PV, Adesnik M, Ganguly S, and Shaw PM, Transcriptional regulation of the CYP2B1 and CYP2B2 genes by C/EBP-related proteins. *Biochem Pharmacol* 51: 345-356, 1996.
57. Park Y and Kemper B, The CYP2B1 proximal promoter contains a functional C/EBP regulatory element. *DNA Cell Biol* 15: 693-701, 1996.
58. Trottier E, Belzil A, Stoltz C, and Anderson A, Localization of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene. *Gene* 158: 263-268, 1995.
59. Honkakoski P, Moore R, Washburn KA, and Negishi M, Activation by diverse xenochemicals of the 51-base pair phenobarbital-responsive enhancer module in the CYP2B10 gene. *Mol Pharmacol* 53: 597-601, 1998.
60. Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, and Negishi M, The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem* 274: 6043-6046, 1999.
61. Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, and Negishi M, The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 18: 5652-5658, 1998.

62. Tzamelis I, Pissios P, Schuetz EG, and Moore DD, The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol* 20: 2951-2958, 2000.
63. Baes M, Gulick T., Choi T., Martinoli M. G., Simha D., and Moore D. D. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol*. 14, 1544-1552. 1994.

Ref Type: Generic

64. Stoltz C, Vachon MH, Trottier E, Dubois S, Paquet Y, and Anderson A, The CYP2B2 phenobarbital response unit contains an accessory factor element and a putative glucocorticoid response element essential for conferring maximal phenobarbital responsiveness. *J Biol Chem* 273: 8528-8536, 1998.
65. Imai E, Stromstedt PE, Quinn PG, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, and Granner DK, Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 10: 4712-4719, 1990.
66. Kim J, Min G, and Kemper B, Chromatin assembly enhances binding to the CYP2B1 phenobarbital-responsive unit (PBRU) of nuclear factor-1, which binds simultaneously with constitutive androstane receptor (CAR)/retinoid X receptor (RXR) and enhances CAR/RXR-mediated activation of the PBRU. *J Biol Chem* 276: 7559-7567, 2001.
67. Zhang Q, Bae Y, Kemper JK, and Kemper B, Analysis of multiple nuclear receptor binding sites for CAR/RXR in the phenobarbital responsive unit of CYP2B2. *Arch. Biochem Biophys*. 451: 119-127, 2006.
68. Beaudet MJ, Desrochers M, Lachaud AA, and Anderson A, The CYP2B2 phenobarbital response unit contains binding sites for hepatocyte nuclear factor 4, PBX-PREP1, the thyroid hormone receptor beta and the liver X receptor. *Biochem J* 388: 407-418, 2005.
69. Yoshinari K, Kobayashi K, Moore R, Kawamoto T, and Negishi M, Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett*. 548: 17-20, 2003.
70. Kobayashi K, Sueyoshi T, Inoue K, Moore R, and Negishi M, Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Mol Pharmacol* 64: 1069-1075, 2003.
71. Koike C, Moore R, and Negishi M, Localization of the nuclear receptor CAR at the cell membrane of mouse liver. *FEBS Lett*. 579: 6733-6736, 2005.
72. Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, and Negishi M, Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 19: 6318-6322, 1999.

73. Hosseinpour F, Moore R, Negishi M, and Sueyoshi T, Serine 202 regulates the nuclear translocation of constitutive active/androstane receptor. *Mol Pharmacol* 69: 1095-1102, 2006.
74. Huang W, Zhang J, Chua SS, Qatanani M, Han Y, Granata R, and Moore DD, Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 4156-4161, 2003.
75. Oguro T, Kaneko E, Kaneko Y, Numazawa S, Imaoka S, Funae Y, Mikami T, and Yoshida T, Suppressed expression of phenobarbital-inducible hepatic cytochrome P-450s in Eisai-hyperbilirubinuria rats (EHBR/Eis). *J Pharmacol Exp.Ther.* 277: 1676-1684, 1996.
76. Swales K and Negishi M, CAR, driving into the future. *Mol Endocrinol.* 18: 1589-1598, 2004.
77. Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, and Moore DD, The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 407: 920-923, 2000.
78. Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, Stoltz CA, Kliewer SA, Lambert MH, Willson TM, and Moore JT, Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J Biol Chem* 278: 17277-17283, 2003.
79. Jaiswal AK, Rivkin E, and Adesnik M, 5' flanking sequence of the gene for rat hepatic cytochrome P450e. *Nucleic Acids Res.* 15: 6755, 1987.
80. Jaiswal AK, Haaparanta T, Luc PV, Schembri J, and Adesnik M, Glucocorticoid regulation of a phenobarbital-inducible cytochrome P-450 gene: the presence of a functional glucocorticoid response element in the 5'-flanking region of the CYP2B2 gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 4237-4242, 1990.
81. Lake BG, Reinwick AB, Cunninghame ME, Price RJ, Surry D, and Evans DC, Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver. *Toxicology* 131: 9-20, 1998.
82. Yamazoe Y, Shimada M, Murayama N, and Kato R, Suppression of levels of phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 by pituitary hormone. *J Biol Chem* 262: 7423-7428, 1987.
83. Corcos L, Phenobarbital and dexamethasone induce expression of cytochrome P-450 genes from subfamilies IIB, IIC, and IIIA in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 20: 797-801, 1992.

84. Meehan RR, Forrester LM, Stevenson K, Hastie ND, Buchmann A, Kunz HW, and Wolf CR, Regulation of phenobarbital-inducible cytochrome P-450s in rat and mouse liver following dexamethasone administration and hypophysectomy. *Biochem J* 254: 789-797, 1988.
85. Sidhu JS and Omiecinski CJ, Modulation of xenobiotic-inducible cytochrome P450 gene expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes. *Pharmacogenetics* 5: 24-36, 1995.
86. Waxman DJ, Morrissey JJ, Naik S, and Jauregui HO, Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem J* 271: 113-119, 1990.
87. Jarukamjorn K, Sakuma T, Yamamoto M, Ohara A, and Nemoto N, Sex-associated expression of mouse hepatic and renal CYP2B enzymes by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol* 62: 161-169, 2001.
88. Shaw PM, Adesnik M, Weiss MC, and Corcos L, The phenobarbital-induced transcriptional activation of cytochrome P-450 genes is blocked by the glucocorticoid-progesterone antagonist RU486. *Mol Pharmacol* 44: 775-783, 1993.
89. Gagne D, Pons M, and Philibert D, RU 38486: a potent antiglucocorticoid in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem* 23: 247-251, 1985.
90. Wang H, Faucette SR, Gilbert D, Jolley SL, Sueyoshi T, Negishi M, and LeCluyse EL, Glucocorticoid receptor enhancement of pregnane X receptor-mediated CYP2B6 regulation in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 31: 620-630, 2003.
91. Schuetz EG, Schmid W, Schutz G, Brimer C, Yasuda K, Kamataki T, Bornheim L, Myles K, and Cole TJ, The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 28: 268-278, 2000.
92. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, and Vilarem MJ, Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol* 58: 1441-1450, 2000.
93. Pascussi JM, Busson-Le Coniat M, Maurel P, and Vilarem MJ, Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element. *Mol Endocrinol.* 17: 42-55, 2003.

94. Wei P, Zhang J, Dowhan DH, Han Y, and Moore DD, Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharmacogenomics*.J 2: 117-126, 2002.
95. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T, and Lehmann JM, An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92: 73-82, 1998.
96. Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, and Kliewer SA, The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin.Invest* 102: 1016-1023, 1998.
97. Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe S, Blumberg B, Guzelian PS, and Evans RM, Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev.* 14: 3014-3023, 2000.
98. Fujisaki H, Mise M, Ishii Y, Yamada H, and Oguri K, Strychnine and brucine as the potent inducers of drug metabolizing enzymes in rat liver: different profiles from phenobarbital on the induction of cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase. *J Pharmacol Exp.Ther.* 268: 1024-1031, 1994.
99. Yamada H, Minematsu Y, Nakamura T, Mise M, Fujisaki H, and Oguri K, Brucine as a potent inducer of CYP2B3, the third member of the CYP2B subfamily P450 in rats. *Biol Pharm.Bull.* 19: 291-293, 1996.
100. Desrochers M, Christou M, Jefcoate C, Belzil A, and Anderson A, New proteins in the rat CYP2B subfamily: presence in liver microsomes of the constitutive CYP2B3 protein and the phenobarbital-inducible protein product of alternatively spliced CYP2B2 mRNA. *Biochem Pharmacol* 52: 1311-1319, 1996.
101. Rencurel F, Stenhouse A, Hawley SA, Friedberg T, Hardie DG, Sutherland C, and Wolf CR, AMP-activated protein kinase mediates phenobarbital induction of CYP2B gene expression in hepatocytes and a newly derived human hepatoma cell line. *J Biol Chem* 280: 4367-4373, 2005.
102. Swales K, Kakizaki S, Yamamoto Y, Inoue K, Kobayashi K, and Negishi M, Novel CAR-mediated mechanism for synergistic activation of two distinct elements within the human cytochrome P450 2B6 gene in HepG2 cells. *J Biol Chem* 280: 3458-3466, 2005.
103. Paquet Y, Trottier E, Beaudet MJ, and Anderson A, Mutational analysis of the CYP2B2 phenobarbital response unit and inhibitory effect of the constitutive androstane receptor on phenobarbital responsiveness. *J Biol Chem* 275: 38427-38436, 2000.

104. Adeli K and Sinkevitch C, Secretion of apolipoprotein B in serum-free cultures of human hepatoma cell line, HepG2. *FEBS Lett.* 263: 345-348, 1990.
105. Hannon GJ and Rossi JJ, Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431: 371-378, 2004.
106. Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ, and Hannon GJ, Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat.Genet.* 37: 1281-1288, 2005.
107. McManus MT and Sharp PA, Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat.Rev.Genet.* 3: 737-747, 2002.
108. McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J, and Sharp PA, Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA.* 8: 842-850, 2002.
109. Slitt AL, Cherrington NJ, Dieter MZ, Aleksunes LM, Scheffer GL, Huang W, Moore DD, and Klaassen CD, trans-Stilbene oxide induces expression of genes involved in metabolism and transport in mouse liver via CAR and Nrf2 transcription factors. *Mol Pharmacol* 69: 1554-1563, 2006.
110. Swales K, Plant N, Ayrton A, Hood S, and Gibson G, Relative receptor expression is a determinant in xenobiotic-mediated CYP3A induction in rat and human cells. *Xenobiotica* 33: 703-716, 2003.
111. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, and Guguen-Guillouzo C, The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 168: 66-73, 2007.
112. Castanotto D, Li H, and Rossi JJ, Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA.* 8: 1454-1460, 2002.
113. [http: and codex.cshl.edu/scripts/newmain.pl](http://and.codex.cshl.edu/scripts/newmain.pl). 2006.  
Ref Type: Internet Communication
114. [http: and www.sirnawizard.com](http://and.www.sirnawizard.com). 2006.  
Ref Type: Internet Communication
115. Miyagishi M and Taira K, U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* 20: 497-500, 2002.
116. Cao M, Ren H, Pan X, Pan W, and Qi ZT, Inhibition of EGFP expression by siRNA in EGFP-stably expressing Huh-7 cells. *J Virol.Methods* 119: 189-194, 2004.

117. Tompkins LM and Wallace AD, Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J Biochem Mol Toxicol.* 21: 176-181, 2007.
118. Huss JM and Kasper CB, Two-stage glucocorticoid induction of CYP3A23 through both the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Mol Pharmacol* 58: 48-57, 2000.
119. Bauer D, Wolfram N, Kahl GF, and Hirsch-Ernst KI, Transcriptional regulation of CYP2B1 induction in primary rat hepatocyte cultures: repression by epidermal growth factor is mediated via a distal enhancer region. *Mol Pharmacol* 65: 172-180, 2004.
120. Roberge C, Beaudet MJ, and Anderson A, GABA(A)/central benzodiazepine receptor and peripheral benzodiazepine receptor ligands as inducers of phenobarbital-inducible CYP2B and CYP3A. *Biochem Pharmacol* 68: 1383-1389, 2004.
121. Waxman DJ, Rat hepatic cytochrome P-450 isoenzyme 2c. Identification as a male-specific, developmentally induced steroid 16 alpha-hydroxylase and comparison to a female-specific cytochrome P-450 isoenzyme. *J Biol Chem* 259: 15481-15490, 1984.
122. Leenders F, Adamski J, Husen B, Thole HH, and Jungblut PW, Molecular cloning and amino acid sequence of the porcine 17 beta-estradiol dehydrogenase. *Eur.J Biochem* 222: 221-227, 1994.
123. Renwick AG, Soon CY, Chambers SM, and Brown CR, Estradiol-17 beta dehydrogenase from chicken liver. *J Biol Chem* 256: 1881-1887, 1981.
124. Henderson LL and Warren JC, Purification and characterization of epimeric estradiol dehydrogenases (17 alpha and 17 beta) from equine placenta. *Biochemistry* 23: 486-491, 1984.
125. Sueyoshi T and Negishi M, Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu.Rev.Pharmacol Toxicol.* 41: 123-143, 2001.
126. Wiwi CA, Gupte M, and Waxman DJ, Sexually dimorphic P450 gene expression in liver-specific hepatocyte nuclear factor 4alpha-deficient mice. *Mol Endocrinol.* 18: 1975-1987, 2004.
127. Bernier D, Thomassin H, Allard D, Guertin M, Hamel D, Blaquiére M, Beauchemin M, LaRue H, Estable-Puig M, and Belanger L, Functional analysis of developmentally regulated chromatin-hypersensitive domains carrying the alpha 1-fetoprotein gene promoter and the albumin/alpha 1-fetoprotein intergenic enhancer. *Mol Cell Biol* 13: 1619-1633, 1993.

128. Zhang P, O'Loughlin L, Brindley DN, and Reue K, Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis. *J Lipid Res.* 49: 1519-1528, 2008.
129. Honkakoski P, Moore R, Gynther J, and Negishi M, Characterization of phenobarbital-inducible mouse Cyp2b10 gene transcription in primary hepatocytes. *J Biol Chem* 271: 9746-9753, 1996.
130. Galli A, Stewart M, Dorris R, and Crabb D, High-level expression of RXRalpha and the presence of endogenous ligands contribute to expression of a peroxisome proliferator-activated receptor-responsive gene in hepatoma cells. *Arch.Biochem Biophys.* 354: 288-294, 1998.
131. Osabe M, Sugatani J, Takemura A, Yamazaki Y, Ikari A, Kitamura N, Negishi M, and Miwa M, Expression of CAR in SW480 and HepG2 cells during G1 is associated with cell proliferation. *Biochem Biophys.Res.Comm.* 369: 1027-1033, 2008.
132. Grange T, Roux J, Rigaud G, and Pictet R, Two remote glucocorticoid responsive units interact cooperatively to promote glucocorticoid induction of rat tyrosine aminotransferase gene expression. *Nucleic Acids Res.* 17: 8695-8709, 1989.
133. Falkner KC, Ritter JK, and Prough RA, Regulation of the rat UGT1A6 by glucocorticoids involves a cryptic glucocorticoid response element. *Drug Metab Dispos.* 36: 409-417, 2008.
134. Lee HC, Shibata H, Ogawa S, Maki K, and Ikuta K, Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor. *J Immunol.* 174: 7800-7806, 2005.
135. Sheldon LA, Smith CL, Bodwell JE, Munck AU, and Hager GL, A ligand binding domain mutation in the mouse glucocorticoid receptor functionally links chromatin remodeling and transcription initiation. *Mol Cell Biol* 19: 8146-8157, 1999.
136. Corcos L and Weiss MC, Phenobarbital, dexamethasone and benzanthracene induce several cytochrome P450 mRNAs in rat hepatoma cells. *FEBS Lett.* 233: 37-40, 1988.
137. Woods MJ, Zisterer DM, and Williams DC, Two cellular and subcellular locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor in rat liver. *Biochem Pharmacol* 51: 1283-1292, 1996.
138. Leeb-Lundberg F, Snowman A, and Olsen RW, Barbiturate receptor sites are coupled to benzodiazepine receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77: 7468-7472, 1980.

139. Minuk GY, Zhang M, Gong Y, Minuk L, Dienes H, Pettigrew N, Kew M, Lipschitz J, and Sun D, Decreased hepatocyte membrane potential differences and GABAA-beta3 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 45: 735-745, 2007.
140. Yamada H, Matsuki Y, Yamaguchi T, and Oguri K, Effect of a ligand selective for peripheral benzodiazepine receptors on the expression of rat hepatic P-450 cytochromes: assessment of the effect in vivo and in a hepatocyte culture system. *Drug Metab Dispos.* 27: 1242-1247, 1999.
141. Kamiyama Y, Matsubara T, Yoshinari K, Nagata K, Kamimura H, and Yamazoe Y, Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metab Pharmacokinet.* 22: 287-298, 2007.
142. Pascual M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV, and Jover R, ATF5 is a highly abundant liver-enriched transcription factor that cooperates with constitutive androstane receptor in the transactivation of CYP2B6: implications in hepatic stress responses. *Drug Metab Dispos.* 36: 1063-1072, 2008.
143. Kawamoto T, Kakizaki S, Yoshinari K, and Negishi M, Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene. *Mol Endocrinol.* 14: 1897-1905, 2000.
144. Rodriguez-Antona C and Ingelman-Sundberg M, Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 25: 1679-1691, 2006.
145. Ekins S, Vandenbranden M, Ring BJ, Gillespie JS, Yang TJ, Gelboin HV, and Wrighton SA, Further characterization of the expression in liver and catalytic activity of CYP2B6. *J Pharmacol Exp. Ther.* 286: 1253-1259, 1998.
146. Lindley C, Hamilton G, McCune JS, Faucette S, Shord SS, Hawke RL, Wang H, Gilbert D, Jolley S, Yan B, and LeCluyse EL, The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 30: 814-822, 2002.
147. Xie H, Giskevicius L, Stahle L, Hassan Z, Yasar U, Rane A, Broberg U, Kimby E, and Hassan M, Pharmacogenetics of cyclophosphamide in patients with hematological malignancies. *Eur.J Pharm.Sci.* 27: 54-61, 2006.
148. Affolter M, Labbe D, Jean A, Raymond M, Noel D, Labelle Y, Parent-Vaugeois C, Lambert M, Bojanowski R, and Anderson A, cDNA clones for liver cytochrome P-450s from individual aroclor-treated rats: constitutive expression of a new P-450 gene related to phenobarbital-inducible forms. *DNA* 5: 209-218, 1986.

# **Annexe 1 – Induction des CYP2B endogènes dans les cellules H4IIEC3**

## **A1.1 Introduction**

Il est connu depuis plusieurs années que CYP2B1 et CYP2B2 de rat et CYP2B10 de la souris sont inductibles à la DEX [39;81;83;87;136]. De plus, il avait été rapporté que ces mécanismes d'induction étaient conservés dans les cellules H4IIEC3, cellules dérivées d'un hépatocarcinome de rat [136]. Cette annexe a pour but de montrer l'induction endogène des CYP2B dans les H4IIEC3. Les niveaux protéiques de CYP2B1 et CYP2B2 dans cette lignée cellulaire étant trop faible pour une détection avec les moyens conventionnels, la démonstration de l'induction des gènes endogènes a donc été effectuée en regardant les niveaux de leur ARNm.

## **A1.2 Méthodologie**

### **A1.2.1 Culture cellulaire**

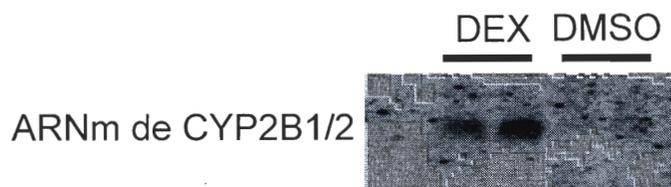
Les cellules H4IIEC3 ont été traitées à la trypsine, puis étalées à raison de 2 millions de cellules par puits de 10 cm de diamètre dans 8 mL de milieu B avec antibiotique et 10% de FBS. Le lendemain matin, il y avait un rinçage au tampon HEPES avant l'addition de milieu B avec DMSO ou DEX à 100 nM (1 : 1000, v/v). Après 24 heures, il y eu un nouveau rinçage avant l'addition de milieu B avec 10% FBS, encore une fois avec DMSO ou DEX, et les cellules furent récoltées après 48 heures de traitement. L'isolement d'ARN à partir des cellules H4IIEC3 a été effectué à l'aide du TRIzol (Invitrogen), selon les instructions du fournisseur. Les culots d'ARN purifiés ont été repris dans du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 0.5%.

### **A1.2.2 Northern**

Les analyses de type *Northern* ont été effectuées selon le protocole fourni par le laboratoire du Dr Tom Moss. Les échantillons d'ARN ont été mis dans de l'eau à 65°C pendant 10 min avant d'être mis sur glace pour la même durée. Par la suite, il y a eu

migration sur un gel d'agarose à 1%, contenant du tampon MOPS (0.04 M de 3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid, pH 7.0; 0.01 M de Sodium acetate; 1 mM d'EDTA, pH 8.0) et 18% de formaldéhyde pendant 4 heures à 5 Volts/cm. Le gel était ensuite installé pour faire un transfert de type *Northern* pendant 16 heures, avec une membrane de nylon chargée (membrane *Genescreen*, de Perkin Elmer). La membrane était par la suite séchée à 65°C avant un traitement aux rayons ultraviolets. La préhybridation était faite dans du tampon phosphate de sodium (0.33 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0.17 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) contenant de l'ADN de sperme de hareng à 150 µg/mL pendant une heure, avant une hybridation de 16 heures dans le même tampon contenant la sonde PB7 [148] préalablement dénaturée. La sonde a été marquée à l'aide de la trousse Rediprime (GE Healthcare). La membrane était ensuite lavée à trois reprises dans 15 mL de tampon I (5% de SDS et 4% v/v de phosphate de sodium) pendant 10 min, suivi d'un dernier rinçage dans le tampon II (1% SDS et 4% v/v de phosphate de sodium) pendant 15 min. La préhybridation, l'hybridation et les lavages ont été effectués à 65°C. Finalement, l'hybridation était révélée avec un écran au phosphore.

### A1.3 Résultats et discussion



**Figure A1-1.** Induction des CYP2B endogènes dans les cellules H4IIEC3. En ce qui a trait au chargement, il y a eu par puits l'équivalent de l'ARN isolé du quart des cellules d'un contenant de culture de 10 cm de diamètre (environ 500 000 cellules H4IIEC3).

Bien que la qualité ne soit pas excellente, étant donné les niveaux très faibles, il est tout de même évident qu'il y a eu induction à la DEX dans les cellules H4IIEC3. Cette expérience a été effectuée deux fois, donnant des résultats similaires à chaque fois. Il semble donc qu'il n'y ait pas que les gènes rapporteurs qui sont en mesure de répondre à la DEX, mais aussi les gènes cibles endogènes, dont les gènes *CYP2B1* et *CYP2B2*.

## Annexe 2 – Réponse à la strychnine des *CYP2B* de rats et de souris

### A2.1 Avant-propos

Décrit plus en détail dans l'introduction, l'induction à la strychnine des CYP2B de rat était d'intérêt, puisque son mode d'action supposait un mécanisme différent que celui impliqué dans la réponse au PB. Ce xénobiotique est le seul, avec la brucine, à induire CYP2B3 en plus de CYP2B1 et de CYP2B2 [98;99]. L'étude de l'induction de l'orthologue de CYP2B3 chez la souris, CYP2B9, serait des plus intéressantes, étant donné que des souris où CAR a été inactivé sont disponibles [77]. Il serait donc possible de vérifier, dans le cas où l'induction à la strychnine des CYP2B serait conservée chez la souris, l'impact de l'absence de CAR sur la réponse à la strychnine/brucine. L'idée était donc de vérifier si le même patron d'induction était observable pour CYP2B9 et CYP2B10. Si tel était le cas, le but était de vérifier dans les souris CAR<sup>-/-</sup> l'impact de l'absence de CAR lors de la réponse, afin de vérifier si ce dernier a un rôle ou non à jouer dans l'induction à la strychnine ou à la brucine.

### A2.2 Méthodologie

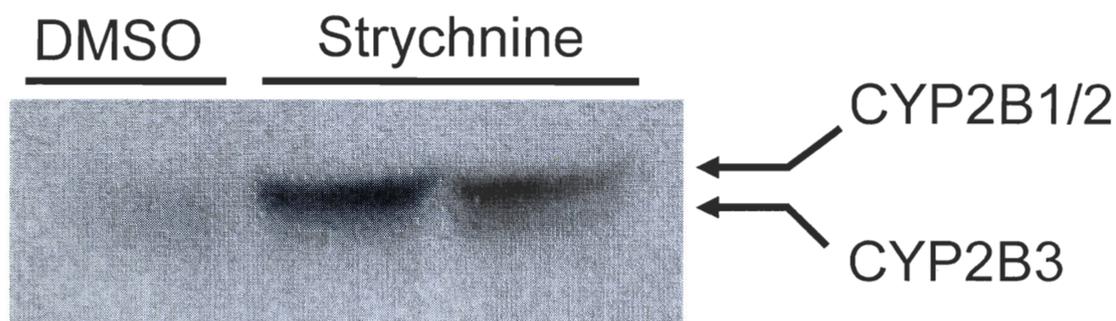
Brièvement, les hépatocytes en culture primaire ont été obtenus par perfusion de la manière conventionnelle [103]. Les cellules furent traitées pendant 48 heures en présence de DMSO ou de la strychnine dissoute dans du DMSO, à une concentration finale de 1 µM. Il y eut rinçage au tampon HEPES puis addition de milieu frais et récolte des extraits totaux de protéines après 48 heures de traitement par l'ajout de 300 µl de tampon de Laemmli directement dans le contenant de culture. L'extrait (25 µl) était utilisé pour faire des analyses de type *Western*.

Pour le traitement à la strychnine des souris, l'article de Fujisaki et collaborateurs [98], fut pris comme référence. Brièvement, la strychnine fut dissoute dans de l'eau stérile, à raison de 0.15 mg/ml et de 0.075 mg/ml et cette eau fut fournie aux souris comme seule source de boisson, et ce *ad libidum*. Trois souris par test ont été utilisées : 3 souris témoin,

3 souris à la première concentration de strychnine, 3 souris à la deuxième concentration, le tout chez des souris sauvages et chez des souris ayant eu l'inactivation ciblée de CAR, pour un total de 18. Trois jours après le début du traitement, les souris furent euthanasiées au CO<sub>2</sub> et leurs foies récoltés pour faire des extraits de microsome [100]. Le poids des souris a été mesuré à chaque jour, afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de baisse importante de masse corporelle.

### A2.3 Résultats et discussion

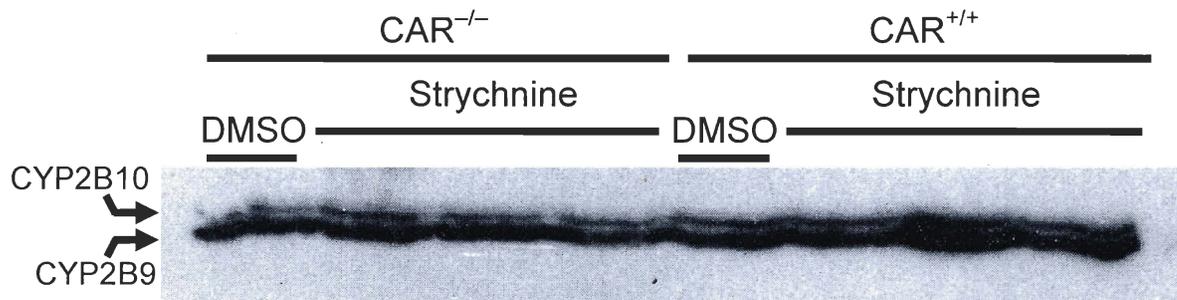
Afin de valider les rares résultats démontrant l'induction à la strychnine de CYP2B1, CYP2B2 et CYP2B3 [98;99], des tests d'induction ont été effectués dans les hépatocytes en culture primaire. La figure A3-1 montre la confirmation que la strychnine est bel et bien un inducteur des 3 CYP2B d'intérêt dans les hépatocytes de rat.



**Figure A3-1.** Induction à la strychnine de CYP2B1, CYP2B2 et CYP2B3 dans des hépatocytes de rat en culture primaire. Ces résultats sont représentatifs d'une seule expérience, mais où les échantillons furent examinés deux fois par transfert de type *Western*.

Deux souris sauvages traitées à la plus grande concentration, soit 0.15 mg/mL, sont mortes durant l'expérience, probablement à la suite d'une surdose puisque le récipient dans lequel l'eau contenant la strychnine était endommagé, permettant ainsi au mélange de couler dans la cage. Bien que cela n'ait pas empêché le bon déroulement du reste de l'expérience, la strychnine allait s'avérer ne pas être un inducteur ni de CYP2B10, ni de

CYP2B9 dans les souris sauvages, et donc non plus dans les souris  $CAR^{-/-}$ , comme démontré à la figure A3-2.



**Figure A3-2.** Absence d'induction à la strychnine de CYP2B9 et CYP2B10 chez les souris sauvages et les souris  $CAR^{-/-}$ . Dix  $\mu$ g de protéine microsomale de foie de souris différent fut déposé par puits. Les extraits microsomaux sont ceux de souris traitées à 0.15 mg/mL de strychnine. Les résultats furent similaires pour les souris traitées à 0.075 mg/mL de strychnine.

Bien que la figure A3-2. ne représente qu'une seule expérience, il est clair que : 1) soit la strychnine n'est pas un inducteur de CYP2B9 et CYP2B10 chez la souris ou 2) les doses utilisées étaient insuffisantes. Cette absence d'induction chez la souris pourrait être par exemple causée par une différence interspèce du récepteur impliqué dans la réponse. En effet, il est possible que le récepteur responsable de l'induction chez le rat soit capable de se lier la strychnine, tandis que le récepteur orthologue de souris ne le soit pas.

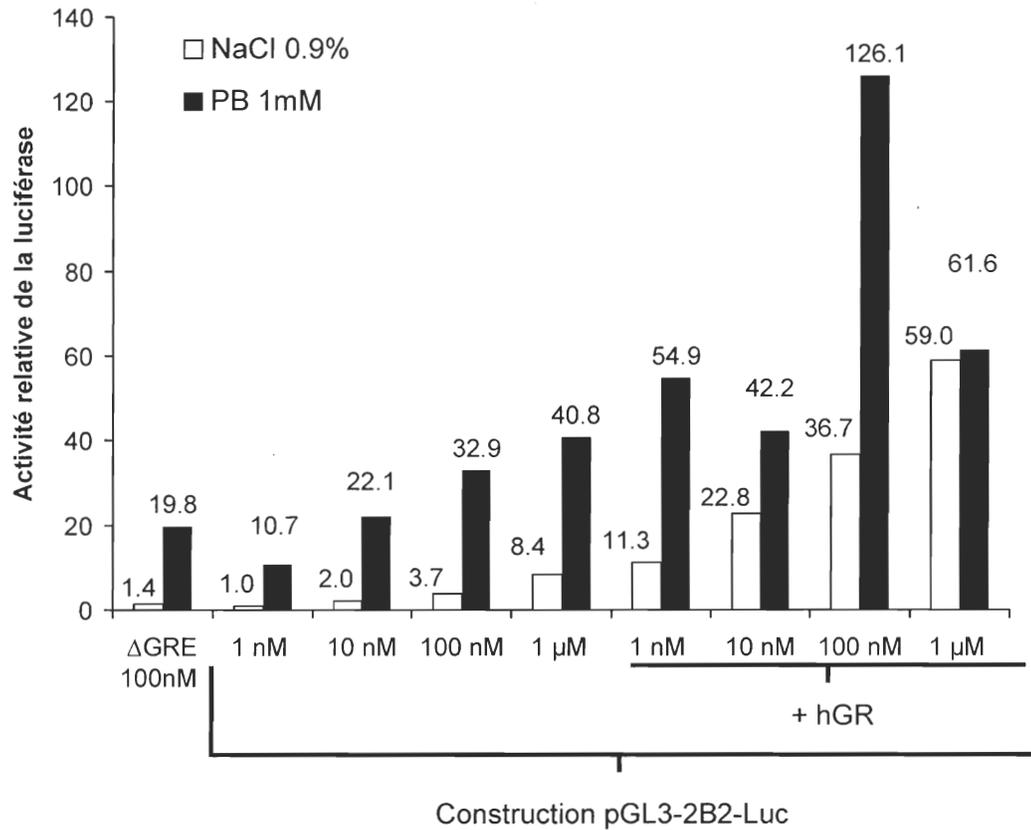
## **Annexe 3 – Influence de la DEX et du GR dans les hépatocytes en culture primaire**

### **A3.1 Introduction et méthodologie**

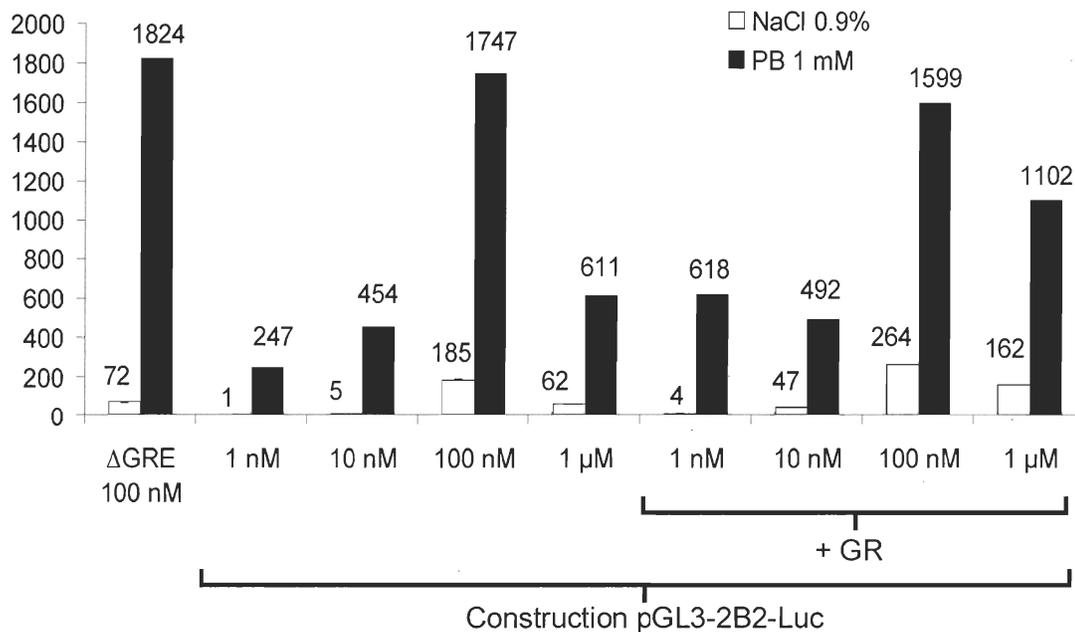
Les lignées cellulaires HepG2 et H4IIEC3 ont été utilisées dans l'étude la réponse des CYP2B à la DEX pour plusieurs raisons. La principale fut que les hépatocytes en culture primaire nécessitent de la DEX afin d'être en bon état. Mais l'impact de la DEX dans ces cellules est tout de même d'intérêt, étant donné que ce système est beaucoup plus similaire à ce qui se passe *in vivo* que les systèmes utilisant des lignées cellulaires. Par conséquent, les données préliminaires de réponse à la DEX dans des hépatocytes sont présentées dans cette annexe. Deux expériences indépendantes ont été effectuées, et les résultats sont présentés séparément, parce que la différence de réponse au PB est trop grande d'une expérience à l'autre.

Les hépatocytes en culture primaire ont été recueillis de la manière conventionnelle [103]. Par contre, le milieu de Chee utilisé lors de la reprise des hépatocytes, après les multiples rinçages suivant la perfusion, contenant une faible concentration de DEX pour tous les hépatocytes (10 nM pour les résultats de la figure A3.1 et 1 nM pour ceux de la figure A3.2). Il en est de même pour le milieu utilisé pour la transfection. Autrement dit, tous les hépatocytes utilisés ont été, la première journée, dans du milieu de Chee contenant une faible concentration de DEX (10 nM pour l'expérience de la figure A3.1 et 1 nM pour celle de la figure A3.2). Finalement, le lendemain et le surlendemain, le milieu utilisé était additionné de DEX pour arriver aux concentrations désirées (1 nM, 10 nM, 100 nM et 1  $\mu$ M). Mis à part les concentrations variables de DEX aux jours 2 et 3, tout le reste du protocole était semblable à celui déjà cité.

### A3.2 Résultats et discussion



**Figure A3.1.** Influence de la DEX sur les niveaux de base et induit au PB de rapporteurs de *CYP2B2* dans des hépatocytes en culture primaire. Les résultats représentent une seule expérience.



**Figure A3.2.** Influence de la DEX sur les niveaux de base et induit au PB de rapporteurs de *CYP2B2* dans des hépatocytes en culture primaire. Les résultats représentent une seule expérience.

Bien que les réponses au PB varient grandement entre les deux expériences, certaines tendances sont conjointes aux deux séries d'hépatocytes. Tout d'abord, il est clair qu'il y a induction à la DEX du rapporteur pGL3-2B2-Luc. En effet, plus la concentration à la DEX augmente, plus les niveaux sans PB augmentent. Il y a donc induction. De plus, en présence de GR, les niveaux sans PB augmentent encore plus avec l'ajout de DEX. Finalement, il semble qu'une concentration de 1 μM nuise à l'induction au PB. Les niveaux induits au PB sont aussi stimulés par la DEX, puisque plus il y a de DEX, plus les niveaux induits sont élevés. Des niveaux élevés de DEX ont par contre l'effet de diminuer le taux global d'induction et ce à cause de l'augmentation des niveaux de base.

La construction où le GRE1.3 de Jaiswal et collaborateurs [80] a été enlevé, la  $\Delta$ GRE, a été testée. Dans les deux expériences, les niveaux sans PB ont été diminués d'environ un facteur de deux par rapport à la construction pGL3-2B2-Luc à la même concentration de DEX. Ainsi, le GRE1.3 semble, tout comme dans les lignées cellulaires, être important dans la réponse à la DEX, bien qu'il ne semble pas intervenir dans la réponse au PB. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les lignées cellulaires, où les niveaux induits avec la construction  $\Delta$ GRE diminuaient de moitié environ et où l'activation par CAR restait inchangée.

Il est donc clair, à la lumière de ses résultats, que les rapporteurs de *CYP2B2* sont inductibles à la DEX. L'induction reste détectable malgré la nécessité d'avoir de la DEX de façon constante dans le milieu de culture. Bien que le GRE1.3 semble impliqué, il reste à voir si toutes les autres régions impliquées dans la réponse à la DEX dans les lignées cellulaires sont actives dans les hépatocytes en culture primaire. Finalement, il serait intéressant de voir l'impact de la délétion de ces régions sur la réponse au PB.