



HAL
open science

Métabolisme du bisphénol A, de la vinchlozoline et de la génistéine dans les systèmes biologiques utilisés pour étudier les perturbateurs endocriniens

Julian Bursztyka

► To cite this version:

Julian Bursztyka. Métabolisme du bisphénol A, de la vinchlozoline et de la génistéine dans les systèmes biologiques utilisés pour étudier les perturbateurs endocriniens. Toxicologie. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2008. Français. NNT : 2008INPT014A . tel-04456868

HAL Id: tel-04456868

<https://hal.science/tel-04456868v1>

Submitted on 14 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 2589

Thèse

présentée

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : SEVAB

Spécialité : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Par

Julian BURSZTYKA

METABOLISME DU BISPHENOL A, DE LA VINCHLOZOLINE ET DE LA GENISTEINE DANS LES SYSTEMES BIOLOGIQUES UTILISES POUR ETUDIER LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

conséquences en terme de toxicité

Soutenue le 21 Janvier 2008 devant le jury composé de :

Mme CASELLAS Claude	Rapporteur
Mme BENNETAU-PELISSERO Catherine	Rapporteur
M. PERIQUET Alain	Examineur
M. ALVINERIE Michel	Examineur
M. MEUNIER Jean-Roch	Examineur
M. CRAVEDI Jean-Pierre	Directeur de thèse

Je tiens à remercier en premier lieu Jacques Tulliez, le Directeur de l'Unité des Xénobiotiques qui m'a accueilli il y a quatre ans lors de mon stage de DEA de Toxicologie et ensuite lorsque je suis resté au Laboratoire pour y effectuer mon doctorat. Je remercie également vivement Jean-Pierre Cravedi, mon directeur de thèse, actuel Directeur de l'Unité, pour son accueil et la proposition qu'il m'a faite de m'engager dans des travaux de thèse au sein du Laboratoire, à l'aide d'un financement européen dont le plus beau des inconvénients m'obligeait à travailler quelques mois dans des laboratoires situés à Stockholm et Grenade. Jean-Pierre Cravedi a dirigé ce travail et m'a transmis son savoir faire scientifique. Toujours disponible, il a été un guide précieux, m'autorisant une grande liberté d'action.

C'est avec Elisabeth Perdu que j'ai réalisé l'essentiel des travaux de ces trois années de thèse. Elle m'a fait découvrir le monde de l'*in vitro*, et m'a accompagné avec une bonne humeur invincible dans mon combat contre la scoumoune. Je ne sais comment la remercier pour tout cela.

Je remercie également Laurent Debrauwer et Cécile Canlet dont les travaux d'identification des métabolites, qui en masse, qui en RMN, ont représenté pour moi comme des cadeaux de Noël hors saison.

Je remercie Daniel Zalko, avec qui j'ai pu discuter science, mais pas que : tous nos échanges ont été pour moi toujours profitables.

Je tiens particulièrement à apporter mes remerciements les plus chaleureux à Maryse Baradat, qui m'a formé à l'usage de l'HPLC et des divers compteurs de radioactivité du laboratoire lors de mon stage de DEA, et qui à cette occasion m'a donné l'envie d'en savoir toujours un peu plus.

Enfin, je remercie toutes celles et tous ceux avec qui j'ai pu discuter de mes travaux et partager des connaissances, scientifiques ou non. Travailler et vivre avec vous tous fut toujours des plus agréable et des plus profitable.

J'ai également été accueilli chaleureusement à Stockholm, dans l'équipe de Ingemar Pongratz et Katarina Pettersson, et à Grenade, dans l'équipe de Nicolas Olea et Marietta Fernandez. I thank you very much for your excellent help and your kindness. Stockholm et Grenade sont deux villes extrêmement agréables.

Je souhaite également remercier les membres du Jury de thèse , Madame Claude Casellas, Madame Catherine Bennetau-Pellissero, Monsieur Alain Périquet, Monsieur Michel Alvinerie et Monsieur Jean-Roch Meunier qui m'ont fait l'honneur de consacrer de leur temps à lire et juger ce travail.

Je ne pourrai jamais remercier assez mes parents, sans qui je n'en serais pas là. Je leur dois tout ce que je suis.

Je voudrais enfin remercier Marie Ya, qui, malgré les 220 kilomètres qui nous ont séparés pendant ces trois années, a toujours su m'accompagner au quotidien et m'apaiser quand mon humeur flanchait.



Maëster 2006

<http://maester.over-blog.com/10-archive-02-2006.html>

SOMMAIRE

Remerciements	p.1
Abréviations	p.7
INTRODUCTION	p.9
1 Perturbation endocrinienne.	p.12
1-1 Brefs rappels d'endocrinologie.	p.12
1-1-1 Mode d'action des hormones	p.12
1-1-2 La super famille des récepteurs nucléaires.	p.13
1-1-2-1 Mode d'action et classification	p.13
1-1-2-2 Les récepteurs aux estrogènes (ER).	p.14
1-1-2-3 Le récepteur aux androgènes (AR).	p.16
1-2 Perturbateur endocrinien (PE).	p.17
1-3 Modes d'action	p.19
1-3-1 Interactions directes avec les récepteurs aux hormones.	p.19
1-3-1-1 Action agoniste.	p.19
1-3-1-2 Action antagoniste.	p.19
1-3-2 autres interactions.	p.20
1-3-2-1 Modification de la concentration en hormone.	p.20
1-3-2-2 Modification de la concentration en récepteurs.	p.21
1-4 Interférences avec les hormones stéroïdiennes.	p.21
1-4-1 Les notions d' « (anti-)estrogénicité » et d' « (anti-)androgénicité »	p.21
1-4-2 Effets sur la faune sauvage et les espèces d'élevage .	p.22
1-4-3 Observations chez l'Homme	p.22
2 Méthodes de screening des perturbateurs endocriniens.	p.24
2-1 Tests de liaison au récepteur.	p.24
2-2 Tests de prolifération cellulaire.	p.25
2-3 Tests utilisant un gène rapporteur.	p.25
2-4 Limitations de ces tests <i>in vitro</i> .	p.26
3 Métabolisme et activité endocrinienne	p.27
3-1 Les systèmes de biotransformation	p.27
3-2 Exemple des stéroïdes endogènes	p.29
3-3 Rôle du métabolisme dans l'activation et l'inactivation des perturbateurs endocriniens	p.31
3-4 Conséquences vis-à-vis de l'évaluation de l'activité perturbatrice endocrinienne à l'aide de tests <i>in vitro</i> .	p.31
4 La génistéine	p.32
4-1 La génistéine et autres phytoestrogènes	p.32
4-2 Sources et voies d'exposition de l'homme	p.34

4-3 Données toxicologiques	p. 35
4-3-1 Absorption, distribution, métabolisme et élimination	p.35
4-3-2 Propriétés estrogéniques	p.36
4-3-2-1 <i>In vitro</i>	p.36
4-3-2-2 <i>In vivo</i>	p.37
4-3-3 Fertilité et développement des organes reproducteurs	p.37
4-3-4 Système nerveux central	p.38
4-3-5 Système immunitaire	p.38
4-3-6 Ostéoporose	p.39
4-3-7 Système cardiovasculaire	p.39
4-3-8 Génotoxicité et mutagénicité	p.39
4-3-9 Cancérogénicité	p.40
4-3-10 Autres propriétés	p.41
5 Le bisphénol A	p.41
5-1 Propriétés physiques et chimiques	p.41
5-2 Origine	p.42
5-3 Usages	p.42
5-4 Devenir du BPA dans l'environnement	p.43
5-5 Sources et voies d'exposition de l'homme	p.43
5-5-1 Contamination par l'environnement	p.43
5-5-2 Contamination par l'alimentation	p.44
5-5-2-1 Migration du BPA dans les aliments depuis les revêtements	p.44
5-5-2-2 Ingestion de BPA	p.45
5-6 Données toxicologiques	p.46
5-6-1 Toxicocinétiques, distribution et métabolisme	p.46
5-6-2 Toxicité aiguë	p.47
5-6-3 Toxicité subaiguë, subchronique et chronique	p.48
5-6-4 Génotoxicité et mutagénicité	p.48
5-6-5 Cancérogénicité	p.49
5-6-6 Reprotoxicité et embryotoxicité	p.49
5-6-7 Perturbation endocrinienne	p.50
5-6-7-1 Effets estrogéniques	p.50
5-6-7-2 Effets antiandrogéniques	p.51
5-6-7-3 Effets à faibles doses <i>in vivo</i>	p.51
5-6-7-4 Autres effets	p.53
6 la vinchlozoline	p.53
6-1 Propriétés physiques et chimiques	p.54
6-2 Usages	p.54
6-3 Devenir de la vinchlozoline dans l'environnement	p.54
6-3-1 Hydrolyse	p.54
6-3-2 Photodégradation	p.55
6-3-3 Biodégradation	p.56
6-4 Sources et voies d'exposition de l'Homme	p.56

6-5 Données toxicologiques	p.56
6-5-1 Absorption, distribution, métabolisme, élimination	p.56
6-5-2 Toxicité aigüe	p.57
6-5-3 Toxicité subaigüe, subchronique, et chronique	p.57
6-5-4 Reprotoxicité et embryotoxicité	p.57
6-5-5 Mutagénicité, génotoxicité	p.58
6-5-6 Carcinogénicité	p.58
6-5-7 Propriétés antiandrogéniques	p.58
7 Présentation et objectifs de la thèse	p.59
RESULTATS	p.63
Chapitre 1 : Biotransformation de la génistéine et de la vinchlozoline	p.65
Article 1 : COMPARISON OF GENISTEIN METABOLISM IN RATS AND HUMANS USING LIVER MICROSOMES AND HEPATOCYTES	p.69
Article 2 : BIOTRANSFORMATION OF VINCLOZOLIN IN RAT PRECISION-CUT LIVER SLICES: COMPARISON WITH <i>IN VIVO</i> METABOLIC PATTERN	p.83
Chapitre 2 : Caractérisation des capacités métaboliques de trois lignées cellulaires utilisées dans l'étude des propriétés des PE <i>in vitro</i> .	p.99
Article 3 : BIOTRANSFORMATION OF GENISTEIN AND BISPHENOL A IN CELL LINES USED FOR SCREENING ENDOCRINE DISRUPTORS	p.103
CONCLUSION	p.137
BIBLIOGRAPHIE	p.145

Abréviations :

AhR : récepteur aux arylhydrocarbones
AR : récepteur aux androgènes
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
BPA : Bisphénol A
CE₅₀ : concentration effectrice 50%
CI₅₀ : concentration inhibitrice 50%
CL₅₀ : concentration létale 50%
CLHP : chromatographie liquide haute performance
DAG : diacylglycérol
DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DES : diéthylstilbestrol
DHT : dihydroxytestostérone
DHEA : dihydroépiandrosétrone
DL₅₀ : Dose létale 50%
E₂ : estradiol
ER : récepteur aux estrogènes
ERE : élément de réponse aux estrogènes
GnRH : gonadolibérine
HRE : élément de réponse aux hormones
IP3 : inositol triphosphate
LH : Hormone lutéinisante
LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level
NOAEC : No Observed Adverse Effect Concentration
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
PCBs : polychlorobiphényles
PE : perturbateur(s) endocrinien(s)
PVC : chlorure de polyvinyle
RMN : résonance magnétique nucléaire.
T3 : triiodothyronine
T4 : tétraiodothyronine
UGT : Uridine diphosphate glucuronyltransférase

INTRODUCTION

Lors des deux dernières décennies, l'attention des scientifiques, des media puis du public vis à vis des effets délétères pouvant résulter d'une exposition de l'homme ou de la faune à des substances chimiques ayant la propriété d'interférer avec le système endocrinien est allée croissant. D'après John McLachlan (2001), l'une des toutes premières références à la problématique posée par ce qu'on appelle désormais « les perturbateurs endocriniens » est due à Roy Hertz qui, en 1958, estimait « qu'il fallait prendre en considération le fait que l'utilisation d'hormones dans l'alimentation animale risquait d'exposer certains individus à ces hormones, alors qu'ils n'auraient jamais du être en contact de leur vie avec de telles molécules. [...], que nous étions en train de créer un cycle des stéroïdes dans notre environnement, et que nous devons sérieusement prendre en considérations les implications que cela pouvait entraîner pour notre développement, notre croissance et peut-être pour nos fonctions de reproduction ». Le meilleur exemple permettant de souligner ces propos est le cas du diéthylstilbestrol ou DES. Cette molécule découverte en 1938, a montré une activité estrogénique bien plus importante que toutes celles synthétisées auparavant. Moins onéreuse à produire que les estrogènes de synthèse ou naturels, le DES a connu un rapide succès en médecine et, plus tard, en production animale. Ses usages médicaux incluaient les thérapies de substitution estrogénique, la suppression de la lactation, la contraception post-coïtale, le traitement du cancer de la prostate, et la prévention de l'avortement spontané. En agriculture, il était utilisé pour stériliser chimiquement les poulets et stimuler la croissance du bétail. Ce n'est qu'au début des années 1970 que le monde scientifique et médical réussit à faire le lien entre le DES et une série d'anomalies du tractus génital observées chez les jeunes femmes exposées durant leur vie foetale, en particulier l'apparition d'adénocarcinome à cellules claires du vagin et des malformations des organes reproducteurs. Les individus de sexe masculin exposés *in utero* ont également révélé des anomalies structurales et fonctionnelles du tractus génital, telles que hypospadias, microphallus, cryptorchidie, mais aussi baisse de la fertilité (Newbold, 2004). Des malformations du tractus génital ont été également observées chez les souris femelles et mâles (cryptorchidie, testicules atrophiés, fertilité réduite, sperme anormal, tumeurs génitales) (McLachlan et al., 1975). L'utilisation du DES pour ses propriétés estrogéniques a ainsi entraîné un problème majeur de santé publique qui reste d'actualité, plus de trente ans après la fin de l'utilisation de cette molécule chez l'Homme. Ces effets délétères différés et de ce fait difficiles à mettre en évidence, ont été associés à la même époque à un nombre croissant de troubles de la reproduction dans la faune sauvage des pays industrialisés. En 1980, l'hypothèse d'une perturbation endocrinienne d'origine environnementale était avancée et les molécules associées à cette perturbation étaient appelées « estrogènes

environnementaux ». Depuis, l'intérêt pour ce sujet croît régulièrement et le nombre de publications sur les « perturbateurs endocriniens » a atteint près d'un millier en 2006.

Selon MacLachlan (2001), le phénomène de perturbation endocrinienne pourrait être l'évènement de santé publique le plus important depuis la découverte de la mutagenèse d'origine chimique.

1 Perturbation endocrinienne.

1-1 Brefs rappels d'endocrinologie.

1-1-1 Mode d'action des hormones

Bien que l'ensemble des tissus et organes d'un organisme puisse être exposé aux hormones empruntant la circulation sanguine, seuls certains répondront de manière spécifique à une hormone donnée. Les hormones peuvent être classées en deux grandes catégories pour ce qui concerne leur site d'action initiale : les hormones hydrophobes qui traversent les bicouches lipidiques des membranes plasmiques et les hormones hydrophiles qui ne le peuvent pas. Ces dernières agissent en se liant à des récepteurs membranaires.

Il existe plusieurs types de récepteurs transmembranaires dont les mécanismes de transmission du signal hormonal sont différents mais conduisent tous, en une ou plusieurs étapes, à l'activation d'une ou plusieurs protéine-kinases intracellulaires. Une majorité d'hormones (dont l'adrénaline, le GnRH, le glucagon ou la LH) se lient à des récepteurs protéiques complexes appelés récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Après liaison de l'hormone, ces récepteurs interagissent avec divers composants membranaires conduisant ainsi à la biosynthèse d'un ou plusieurs seconds messagers intracellulaires (AMPc, IP3 et DAG...) qui activent les protéine-kinases intracellulaires. Il existe d'autres types de récepteurs membranaires comme les récepteurs à un seul segment transmembranaire qui interagissent directement avec les kinases, ou les récepteurs ayant eux-mêmes une activité protéine-kinase (récepteurs tyrosine-kinase ou sérine/thréonine-kinase).

Les hormones hydrophobes, comme l'acide rétinoïque, les hormones thyroïdiennes ou stéroïdes, traversent les membranes plasmiques des cellules et agissent en se fixant à des récepteurs spécifiques appelés récepteurs nucléaires.

1-1-2 La super famille des récepteurs nucléaires.

Il s'agit d'un large groupe de protéines, agissant comme récepteurs à des ligands endogènes et/ou exogènes (fig.1). Les récepteurs nucléaires sont impliqués dans la régulation d'un très grand nombre de fonctions physiologiques chez les organismes eucaryotes comme la croissance, la multiplication et la différenciation cellulaires ou le maintien de l'homéostasie.

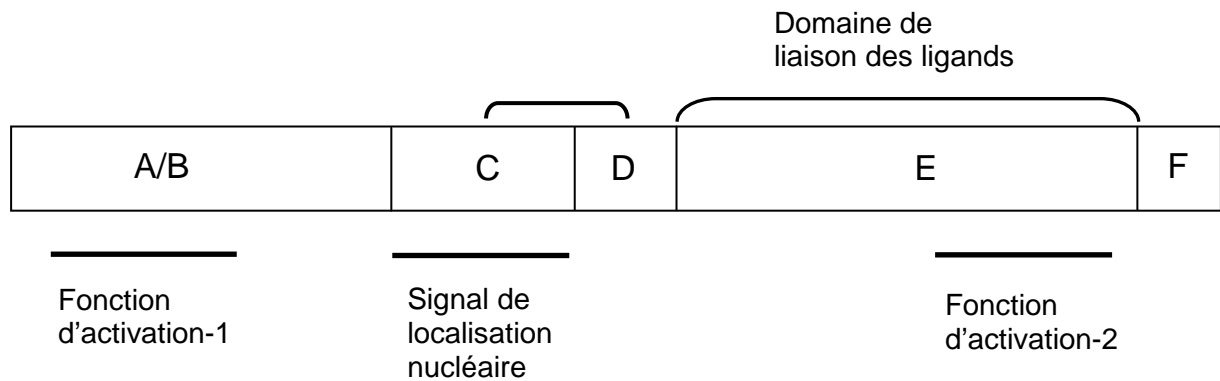


Fig.1 : Domaines structuraux d'un membre type de la famille des récepteurs nucléaires. (d'après Gillesby & Zacharewski, 1998).

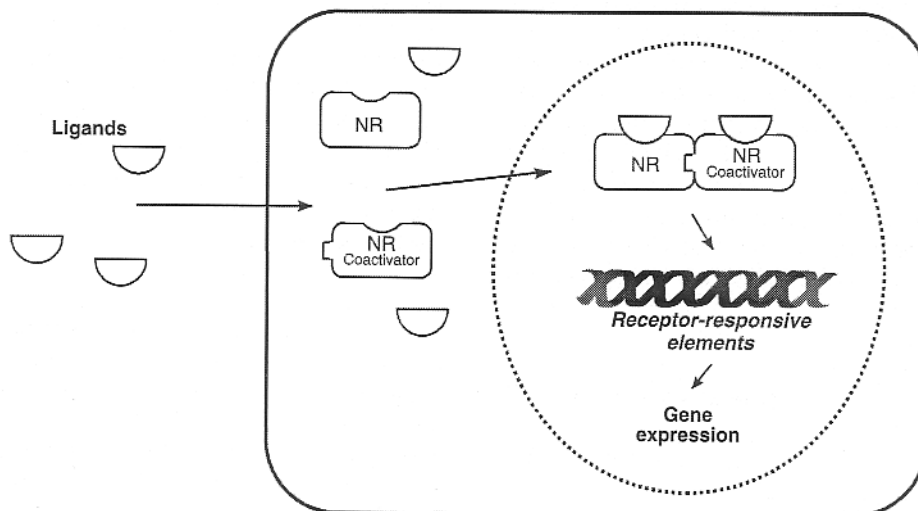


Fig.2 : mécanisme général de transduction du signal par les récepteurs nucléaires (Janosek et al., 2006). La formation d'holo- ou d'hétérodimères, ou encore l'absence de liaison d'un coactivateur sont également possibles. NR = récepteur nucléaire.

1-1-2-1 Mode d'action et classification

Ces récepteurs sont appelés « nucléaires » du fait de leur mode d'action commun (fig.2). Après la liaison d'un ligand spécifique, leur conformation structurale change et le

récepteur, souvent après une dimérisation avec un modulateur, migre dans le noyau cellulaire, se lie sur l'ADN à un élément de réponse spécifique et déclenche l'expression du gène qui en dépend (Janošek et al., 2006). Leurs ligands (dont font partie les hormones) sont le plus souvent des molécules de faible poids moléculaires, spécifiques d'un récepteur.

Quarante huit récepteurs nucléaires ont été identifiés et ont été classés parmi trois sous-classes en fonction de leurs ligands respectifs (Jacobs et al., 2003) :

- Les récepteurs de type I pour les hormones stéroïdes : récepteur à la progestérone (PR), récepteurs aux estrogènes (ER), aux androgènes (AR), aux glucocorticoïdes (GR) et aux minéralocorticoïdes (MR)).
- Les récepteurs de type II : récepteurs thyroïdien (TR), à la vitamine D (VDR), récepteurs aux rétinoïdes totaux (RXR) et récepteurs à l'acide rétinoïque *all-trans* (RAR), récepteurs au proliférateur de peroxysoxe activé (PPAR) et récepteur à l'aryl hydrocarbure (AhR).
- Les récepteurs de type III : les récepteurs orphelins qui n'ont pour l'instant pas de ligands spécifiques connus, dont font partie les « pregnan X receptor » (PXR ou SXR) et le « constitutive androstane receptor » (CAR).

Seuls les récepteurs nucléaires liés aux hormones stéroïdiennes seront traités ici.

1-1-2-2 Les récepteurs aux estrogènes (ER).

Le 17- β -estradiol, l'estrone et l'estriol sont les ligands endogènes majeurs de l'ER, produits principalement au niveau des ovaires, mais également par le placenta, le cortex des glandes surrénales et par les tissus graisseux périphériques. Au moins deux sous-types ont été identifiés chez les mammifères, l'ER α et l'ER β (fig.3) (Green et al., 1986, Kuiper et al., 1996, Mosselman et al., 1996), et un troisième, ER γ , a été décrit chez les poissons (Drummond et al., 2002).

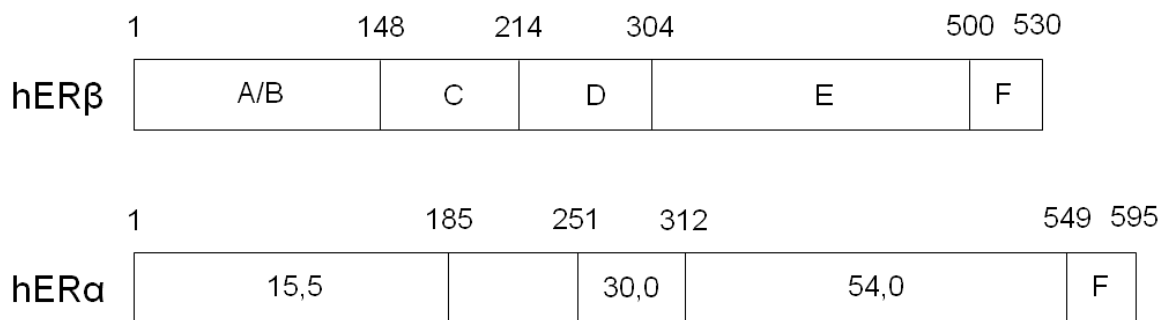


Fig.3 : Les deux sous-types de récepteurs aux estrogènes identifiés chez l'Homme. Les nombres au dessus des représentations schématiques indiquent le nombre d'acides aminés de la séquence. Les nombres dans la représentation schématique de l'hERα indiquent le pourcentage d'acides aminés identiques par rapport à l'hERβ. (d'après Phytoestrogen & health, 2003).

Il s'agit d'une protéine cytosolique associée aux protéines chaperonnes de poids moléculaire 70 et/ou 60 kDa (HSP70/60) (Massaad et al., 2002) qui bloquent le site de liaison à l'ADN du récepteur et masquent le domaine d'adressage nucléaire. La liaison d'un ligand spécifique à ce complexe provoque des changements conformationnels menant à sa translocation dans le noyau. La liaison des ER à un élément de réponses aux estrogènes (ERE) de l'ADN est responsable de la différenciation médiée par l'estradiol. Les ER peuvent également se lier aux sites AP-1 (« activating protein 1 ») et Sp 1 (« GC-box binding protein »), et influencer les voies impliquées dans la prolifération (Gustafsson, 2003, Paech et al., 1997). Des études *in vitro* ont montré que des homodimères (ERα-ERα ou ERβ-ERβ) ou des hétérodimères (ERα-ERβ) pouvaient être formés. L'existence de ces deux sous-types d'ER permet une modulation de l'activité des molécules estrogéniques en fonction de leur expression tissulaire et de l'affinité différente de ces molécules pour l'un ou l'autre des sous-types (Barkhem et al., 1998, Gustafsson, 2003, Gustafsson and Warner, 2000, Kuiper et al., 1997, Kuiper and Gustafsson, 1997). Par exemple, l'utilisation d'anticorps spécifiques de l'un ou l'autre récepteur a montré qu'ERα aussi bien qu'ERβ étaient exprimés dans les glandes mammaires de rat, mais la présence et la distribution cellulaire des deux récepteurs étaient distinctes (Saji et al., 2000). Ainsi, les ER sont présents ensembles ou non, ou dans des proportions différentes, dans la plupart des tissus et organes (Jacobs et al., 2003, Nilsson and Gustafsson, 2000) (tableau n°1).

Tableau n°1 : distribution tissulaire des sous-types de l'ER chez l'Homme et les Rongeurs (d'après Kuiper et al. (1997) et Phytoestrogen & Health, 2003)

Organe/tissus	Homme		Rongeurs	
	ER α	ER β	ER α	ER β
Poumon	-	X	-	X
Vaisseaux	X	X	-	-
Surrénales	X	-	X	-
Reins	X	X	X	-
Prostate	-	X	-	X
Testicules	-	X	X	X
Cœur	X	X	X	X
Cerveau	X	X	-	X
Thymus	-	X	-	X
Glandes mammaires	X	X	-	-
Utérus	X	X	X	X
Endomètre	X	X	-	-
Vagin	X	-	-	-
Trompes de Fallope	-	X	-	-
Ovaires	X	X	X	X
Vessie	-	X	-	X
Epididyme	-	X	X	X
Hypophyse	X	X	X	X
Hypothalamus	X	X	X	-
Foie	X	-	X	X
Muscles	-	-	X	X
Graisse	-	-	X	X
Tractus gastrointestinal	-	X	-	X
Colon	-	X	-	X
Intestin grêle	-	X	-	X
Os	X	X	X	X

1-1-2-3 Le récepteur aux androgènes (AR).

La structure de cette protéine est très proche de celle du récepteur à la progestérone et des récepteurs aux minéralocorticoïdes. Il existe deux isoformes de l'AR, l'AR-A et l'AR-B. Les AR-A et B diffèrent par la longueur de leur séquence amino-terminale (McPhaul and Young, 2001). L'AR est associé aux protéines chaperonnes HSP90 et 70. La fixation d'un agoniste provoque la dissociation du complexe, et un changement conformationnel du récepteur, qui se dimérise puis se fixe aux éléments de réponse de l'ADN nucléaire qui régulent l'expression de gènes spécifiques.

L'AR est principalement exprimé dans les testicules, mais il est également présent dans la prostate, les glandes surrénales, les reins, le cerveau et l'hypophyse (Ikeuchi et al., 2001). Ses ligands endogènes sont la testostérone et son métabolite, la 5 α -dihydroxytestostérone (5 α -DHT), ainsi que l'androstènedione et la dihydroépiandrostérone (DHEA). La testostérone est produite principalement par les testicules, et dans une moindre mesure par les glandes surrénales.

Le rôle du récepteur aux androgènes chez les organismes mâles est très similaire à celui des récepteurs aux estrogènes chez les organismes femelles. Les androgènes jouent un rôle clé dans le développement des caractéristiques sexuelles primaires et secondaires masculines. Ils régulent également la masse musculaire et la croissance osseuse.

1-2 Perturbateur endocrinien (PE).

Plusieurs définitions du terme « perturbateur endocrinien » ont été proposées. L'une des premières à avoir été établie fait la distinction entre un perturbateur endocrinien, et un perturbateur endocrinien potentiel (1996, Weybridge, Royaume-Uni) :

« Un perturbateur endocrinien est une substance exogène provoquant des effets délétères sur la santé dans un organisme intact, ou sur sa descendance, suite à des changements dans ses fonctions endocriniennes. Un perturbateur endocrinien potentiel est une substance possédant des propriétés qui pourraient éventuellement provoquer une perturbation endocrinienne dans un organisme intact. »

En mai 1997, un groupe de travail sur la perturbation endocrinienne (EDSTAC) de l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA) a établi la définition suivante, étendant le principe de perturbation endocrinienne aux populations :

« Un perturbateur endocrinien est une substance chimique ou un mélange qui, d'après les principes et les données scientifiques, le poids de l'évidence, et le principe de précaution, altère une ou plusieurs fonctions du système endocrinien et provoque des effets délétères au niveau de l'organisme, de sa descendance, des populations ou des sous-populations. »

Une troisième définition précise les modes d'actions des perturbateurs endocriniens, indiquant qu'ils sont « des substances qui, interférant avec les fonctions du système hormonal, risquent d'influer négativement sur les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones » (UE 2002). La perturbation endocrinienne n'est pas considérée

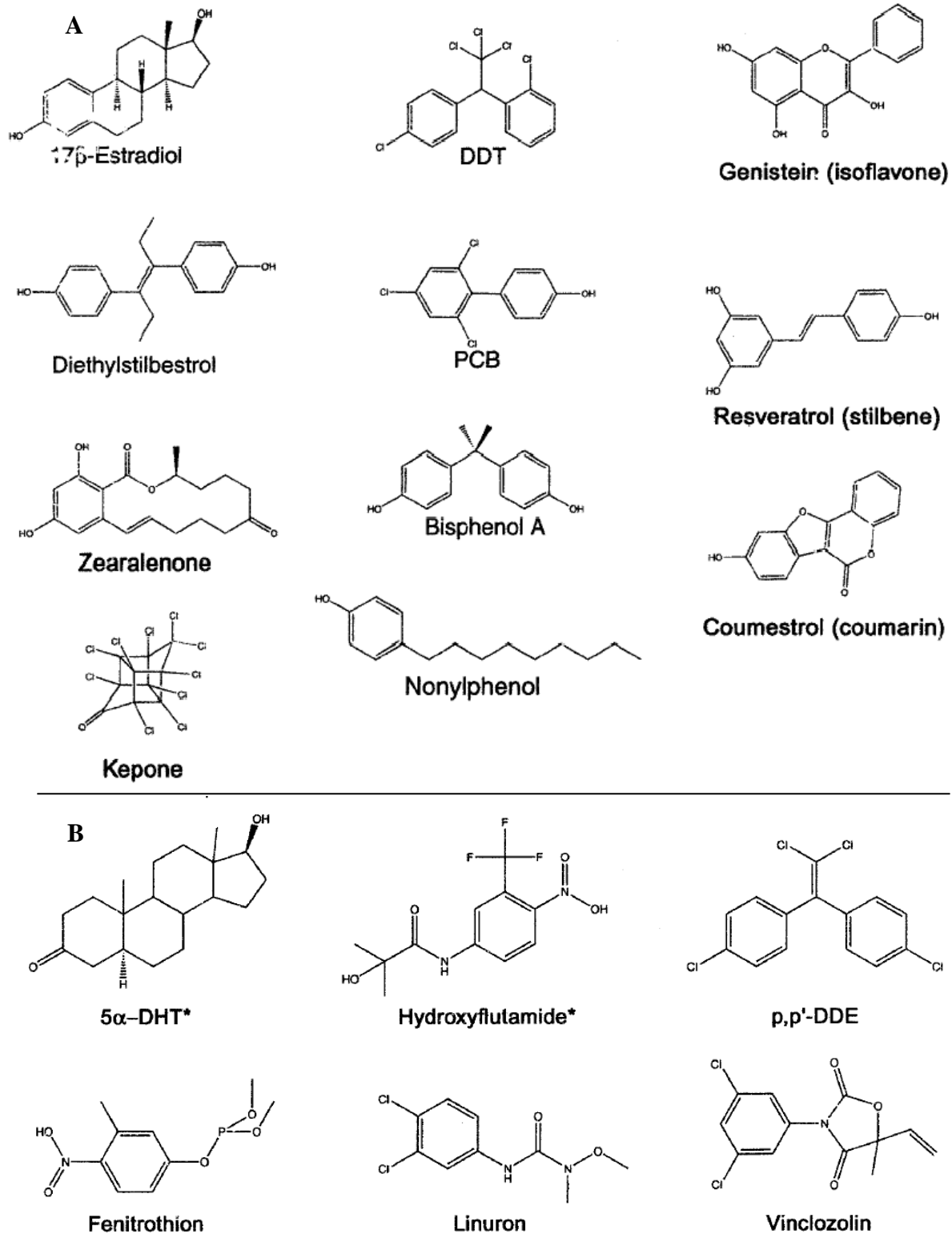


Fig.4 : Structures chimiques de différents perturbateurs endocriniens estrogéniques ou principalement estrogéniques (A) et antiandrogéniques ou principalement antiandrogéniques (B). Le 17β-estradiol et la 5α-DHT, hormones naturelles, sont présentés à titre indicatif afin de comparer leur structure à celle des PE.

comme un effet adverse en soit, mais comme un mode d'action pouvant mener à des changements fonctionnels et à des effets délétères au niveau de l'individu ou des populations.

Ainsi, les PE pris dans leur ensemble n'ont pas d'autre point commun que la propriété qui les définit. Leurs structures chimiques comme leurs origines sont extrêmement variées (fig.4). Les PE englobent un grand nombre de classes chimiques, incluant les hormones naturelles et synthétiques, des constituants de plantes, des pesticides, des composés utilisés dans l'industrie des plastiques et des produits de consommation, des sous-produits industriels et des polluants. Ils sont souvent largement répandus dans notre environnement. Certains sont persistants, et peuvent être transportés sur de grandes distances jusqu'à des régions peu fréquentées par l'homme. D'autres, fugaces, sont rapidement dégradés dans l'environnement, mais peuvent néanmoins contaminer des êtres vivants à des périodes critiques de leur développement.

1-3 Modes d'action.

Les mécanismes selon lesquels les PE peuvent interférer avec les systèmes de régulation hormonale sont nombreux et un PE peut agir selon plusieurs mécanismes à la fois. Les plus étudiés sont ceux faisant intervenir les récepteurs hormonaux.

1-3-1 Interactions directes avec les récepteurs aux hormones.

1-3-1-1 Action agoniste.

Une molécule exogène agoniste est capable de se lier à un récepteur comme le fait une hormone et de l'activer, entraînant les effets normalement provoqués par l'hormone endogène. La réponse dépend de son affinité pour le récepteur et de sa capacité à l'activer.

1-3-1-2 Action antagoniste.

Une molécule exogène antagoniste est capable d'empêcher ou de diminuer l'activation d'un récepteur en présence d'une molécule agoniste. Cette inhibition peut être compétitive si l'agoniste endogène et l'antagoniste exogène sont en compétition pour le même site de liaison du récepteur, ou non compétitive si l'inhibiteur se lie au récepteur ou au complexe (récepteur + hormone) ailleurs que sur le site d'activation.

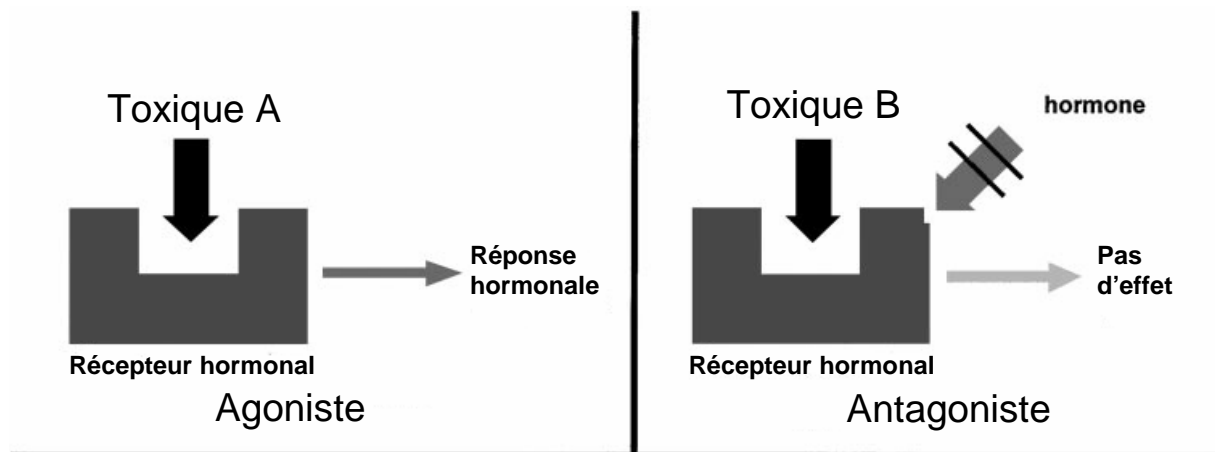


Fig.5 : modes d'action agoniste et antagoniste par interaction directe avec le récepteur hormonal (d'après McLachlan et al., 2001).

1-3-2 autres interactions.

1-3-2-1 Modification de la concentration en hormone.

Une molécule exogène peut perturber indirectement les fonctions d'une hormone en influant sur sa concentration, via une modification de sa métabolisation (production ou élimination), de son transport ou de sa libération depuis son lieu de stockage.

Ainsi, un inhibiteur de l'aromatase empêchera ou diminuera la formation de 17- β -estradiol à partir de la testostérone, amenant une concentration plus élevée que la normale en cette dernière hormone et une concentration plus faible en estrogène. Ce type de mécanisme est par exemple responsable des effets du tributylétain (une des substances actives des peintures anti-salissures utilisées pour protéger les carènes) observés sur les populations de bulots en mer du Nord. Il a été observé chez ces gastéropodes marins un phénomène d'imposex (les femelles possèdent des organes sexuels masculins en plus des organes féminins) provoqué par l'inhibition de l'acylcoenzyme A:testostérone acyltransférase normalement responsable de l'inactivation de la testostérone (Gooding and LeBlanc, 2001). De même, l'induction des enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones peut modifier leur niveau circulant. Ainsi, l'induction au niveau du foie du cytochrome P450 1A1, impliqué dans l'hydroxylation de l'E₂, serait responsable de l'activité anti-estrogénique de certains PCBs substitués en positions non-ortho, en facilitant l'inactivation et l'élimination de l'E₂ (Pang et al., 1999).

Enfin, une interaction avec le transport plasmatique des hormones peut également aboutir à une perturbation endocrinienne. En effet, seule une petite partie des molécules lipophiles circule librement dans le sang. La majeure partie circule liée à des protéines de

transport comme l'albumine par exemple. Une substance entrant en compétition avec une hormone pour les sites de liaison de son transporteur peut provoquer un accroissement de sa fraction libre qui est active et capable de se lier à son récepteur. Par exemple, les PCB et en particulier leurs métabolites hydroxylés entrent en compétition avec les hormones thyroïdiennes pour leurs protéines sériques de transport, dont la transthyrétine. Ainsi, tandis que des concentrations élevées, de l'ordre de 20 ppm (microgrammes par gramme), doivent être atteintes dans les tissus cibles pour que les métabolites hydroxylés des PCB altèrent de façon significative la liaison de la T3 à son récepteur, des concentrations de seulement 0,017 ppm seraient suffisantes pour que ces mêmes métabolites altèrent le transport de la T3 via la transthyrétine, rendant ce mécanisme d'action prépondérant par rapport à une interaction directe avec le récepteur nucléaire (Cheek et al., 1999).

1-3-2-2 Modification de la concentration en récepteurs.

Si la concentration en ligand joue sur sa capacité à entraîner un effet, il en va de même de son récepteur. Ainsi, certains PE peuvent agir en modifiant la concentration en récepteur d'une hormone. C'est le cas en particulier de la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD). Cette dernière est un agoniste d'origine exogène pour l'Ahr, dont l'activation induit une augmentation de l'expression des enzymes responsables de la dégradation du récepteur aux estrogènes (Safe and Krishnan, 1995). Cet effet se cumule d'ailleurs avec une augmentation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'E₂ et une inhibition de l'expression des gènes contrôlés par cette même hormone.

1-4 Interférences avec les hormones stéroïdiennes.

Les activités perturbatrices mises en évidence pour un grand nombre de molécules naturelles ou synthétiques vis-à-vis des hormones stéroïdiennes ont été les plus étudiées. Ce sont d'ailleurs elles qui sont à l'origine de la prise de conscience de la communauté scientifique de l'existence des phénomènes de perturbation endocrinienne et des risques qu'ils représentent.

1-4-1 Les notions d' « (anti-)estrogénicité » et d' « (anti-)androgénicité ».

Un xénobiotique est considéré comme estrogénique lorsqu'il agit selon le même mécanisme que les estrogènes naturels et/ou qu'il provoque toute ou partie des effets des

estrogènes naturels. Ces effets peuvent être mis en évidence par des tests *in vivo* chez la souris ou la rate immature ou ovariectomisée comme l'induction de la cornification vaginale, la hausse du poids de l'utérus, ou la prolifération de l'épithélium utérin. Ils peuvent également être évalués *in vitro* par la mesure de la prolifération cellulaire sur des lignées sensibles aux estrogènes, ou encore en déterminant la liaison aux récepteurs (ER α ou ER β), en déplaçant la liaison estradiol-récepteur, en étudiant l'expression des gènes cibles des estrogènes (McLachlan, 2001). Un xénobiotique est antiestrogénique lorsqu'il empêche l'activité d'un estrogène naturel. De même, un xénobiotique est androgénique lorsqu'il agit selon le même mode que les androgènes et/ou qu'il induit des effets similaires à ceux d'androgènes naturels. Il est antiandrogénique lorsqu'il empêche leur activité et provoque l'apparition d'un phénotype plus ou moins féminisé.

1-4-2 Effets sur la faune sauvage et les espèces d'élevage.

Seuls quelques exemples significatifs sont rappelés ici. Chez les oiseaux, l'exposition au DDT a provoqué une diminution des capacités de reproduction, en particulier en altérant la calcification des œufs, laquelle est dépendante des estrogènes et de la vitamine D. Le DDT et son métabolite, le DDE, ont également été à l'origine de troubles de la reproduction chez l'alligator. En effet, des anomalies des organes génitaux mâles (micro-pénis) et des concentrations anormalement basses de testostérone chez les crocodiles mâles du lac Apopka en Floride ont été relevées après une contamination massive, en 1980, par un pesticide qui contenait du dicofol et du DDT. Les poissons d'eau douce ont fait l'objet d'un grand nombre d'études relatives à l'action des PE (en particulier des substances estrogéniques) dans le milieu aquatique. Par exemple, des phénomènes d'inversion sexuelle ont été rapportés chez des populations de poissons vivant immédiatement en aval des stations d'épuration d'eau du réseau domestique (Hemming et al., 2001). Parmi les substances responsables de ces effets figurent le 17- β -éthinyloestradiol (entrant dans la composition des pilules contraceptives) et le p-nonylphénol (produit de dégradation de certains détergents). Ces composés entraînent à faible dose (< 50 μ g/L) une diminution des capacités de reproduction et une synthèse de vitellogénine chez les poissons mâles (White et al., 1994).

1-4-3 Observations chez l'Homme.

La perturbation des effets des hormones stéroïdiennes a été relevée dès les années 1940 chez l'homme, quand il a été observé que les pilotes d'avions d'épandage avaient une diminution du nombre de spermatozoïdes liée à leur exposition au DDT (Singer, 1949). De

manière plus générale, et sans qu'un lien de cause à effet avec un PE particulier ait pu être déterminé, des études épidémiologiques et des méta-analyses ont fait état d'une fréquence accrue d'anomalies liées au développement du système reproducteur masculin. Ainsi, Auger et al. (1995), Carlsen et al. (1993), Irvine et al. (1996) et Swan et al. (1997) ont observé une diminution de la qualité du sperme (concentration spermatique, mobilité et caractéristiques morphologiques des spermatozoïdes) mais avec des différences géographiques marquées. Ces dernières suggèrent l'implication de facteurs environnementaux, tels que l'exposition à des contaminants. L'incidence du cancer des testicules, qui touche le plus souvent les hommes entre 20 et 35 ans, a augmenté significativement dans les pays industrialisés, mais là aussi, avec des différences géographiques marquées (Adami et al., 1994, Dearnaley et al., 2001). Les facteurs de risques principaux reconnus pour le cancer des testicules est la cryptorchidie (non descente des testicules dans le scrotum) suivie de l'hypospadias. L'hypospadias se caractérise par un déplacement du méat urétral vers la face inférieure du pénis. Malgré les différences dans les méthodes d'analyse et de diagnostic d'une étude à l'autre (Toppari et al., 2002), des indications claires montrent que sa fréquence a augmenté dans les pays européens, aux USA et au Japon (Dearnaley et al., 2001, Jensen et al., 1995, Paulozzi et al., 1997). L'accident de Seveso en 1976 en Italie s'est traduit quelques années plus tard par une hausse de l'incidence de l'hypospadias chez les enfants dont les pères avaient été exposés à la dioxine (Baskin et al., 2001). En outre, une hausse du risque transgénérationnel d'hypospadias a été relevé chez les fils des femmes qui ont été exposées *in utero* au diethylstilbestrol (Klip et al., 2002). Par ailleurs, certaines études suggèrent un risque accru de cryptorchidie chez les fils de femmes travaillant avec des pesticides (Weidner et al., 1998). Il est avancé que ces anomalies seraient liées entre elles et ont été liées à un « syndrome de dysgenèse testiculaire » (Edwards et al., 2006, Skakkebaek et al., 2001). Néanmoins, il demeure difficile d'associer un pesticide particulier à des effets observés chez les populations exposées. Ainsi, les media (parmi lesquels « Le Monde » du 19 septembre 2007) ont récemment évoqué le cas de la pollution des Antilles françaises au chlordécone (képone), un insecticide dont l'usage est interdit en France depuis 1990 mais qui s'est poursuivi jusqu'en 1993. Ce pesticide chloré présente des propriétés estrogéniques *in vitro* et agit comme un agoniste compétitif pour les ER α et β (Kuiper et al., 1998). Il est associé à des effets estrogéniques chez l'Homme d'après des cas de troubles de la reproduction et de neurotoxicité chez des hommes exposés lors d'un accident sur leur lieu de travail dans les années 1970 (Taylor et al., 1978). Le chlordécone induit un œstrus persistant, des troubles de la fertilité ainsi qu'une diminution de la taille et du nombre des portées chez la souris (Good et al., 1965). Le chlordécone augmente également la

mortalité embryonnaire et fœtale chez le rat et la souris, et, lors des études de toxicité chronique, il a provoqué une atrophie testiculaire et des carcinomes mammaires chez le rat (Chernoff and Rogers, 1976, Reuber, 1978). Malgré l'importance des concentrations environnementales en chlordécone et de l'exposition à ce pesticide mesurées en Guadeloupe et en Martinique, aucune donnée épidémiologique ne permet d'associer les observations relevées au sein des populations exposées (telles l'incidence du cancer de la prostate qui est la plus élevée au monde en Guadeloupe) au chlordécone.

2 Méthodes de « screening » des perturbateurs endocriniens.

Les méthodes de « screening » des perturbateurs endocriniens incluent des tests réalisés *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, les perturbateurs endocriniens sont capables d'interférer à différents niveaux des mécanismes complexes de régulation du système endocrinien. Ils peuvent être pris en charge par les différents systèmes métaboliques de l'organisme. Les tests *in vivo* permettent ainsi d'observer les effets entraînés par une molécule testée en prenant en compte l'ensemble de ces interactions (Eertmans et al., 2003, Gray et al., 2002). Bien que les tests utilisant des animaux présentent des avantages liés à la prise en compte de cette complexité mais également des différences interspèces (Zacharewski, 1998), ils sont longs et coûteux et de très nombreuses méthodes alternatives sont développées. Par ailleurs, il est aujourd'hui nécessaire de se préoccuper du bien être de l'animal lors de l'élaboration des protocoles expérimentaux. Ce soucis éthique se traduit par la réduction du nombre d'animaux dans les expérimentations scientifiques voire par la substitution des essais *in vivo* par des tests *in vitro*.

2-1 Tests de liaison au récepteur.

Les tests de liaison à un récepteur particulier sont utilisés pour détecter des molécules capables d'interagir directement avec un récepteur endocrinien, comme les récepteurs α et β aux estrogènes ou le récepteur aux androgènes. Ces tests permettent de mesurer l'affinité de liaison du récepteur pour les ligands testés. Ils sont basés sur l'étude de la compétition entre la molécule testée non radiomarquée et un ligand standard radiomarqué pour le récepteur (Wong et al., 1995). Le défaut principal de ces tests est qu'ils ne fournissent aucune information sur l'activité hormonale du composé testé, c'est-à-dire qu'ils ne permettent pas de faire la

différence entre une activité agoniste ou antagoniste (Branham et al., 2002, Eertmans et al., 2003). Il est donc impératif d'utiliser un autre test fonctionnel *in vitro* pour la déterminer.

2-2 Tests de prolifération cellulaire.

Le test E-Screen est l'exemple le plus connu de ce type de tests. Il est basé sur la propriété qu'ont les cellules MCF7 à proliférer lorsqu'elles sont en présence d'une molécule estrogénique dans le milieu de culture (Soto et al., 1995). Ce test est l'un des plus sensibles pour analyser l'estrogénicité des molécules et permet de distinguer entre une activité agoniste ou non. Ainsi, une molécule est considérée comme un antagoniste pur lorsque (a) il n'affecte pas le nombre de cellules en absence d'estrogène, (b) il bloque les effets prolifératifs de l'estradiol, et (c) ce blocage est réversible en augmentant la dose d'estradiol tout en gardant constante la concentration de l'antagoniste (Sonnenschein and Soto, 1998). Néanmoins, du fait de la sensibilité du test aux conditions de culture (sous-clones cellulaires différents, lots de sérum), la variabilité des résultats inter- et intra-laboratoire est relativement importante (Eertmans et al., 2003). Des tests de prolifération cellulaire ont également été développés pour détecter les molécules ayant une activité androgénique ou antiandrogénique. Ces tests « A-Screen » utilisent les cellules de carcinome de la prostate d'origine humaine LNCaP-TAC, dont la prolifération est dépendante de la présence d'un androgène dans le milieu de culture (Sonnenschein et Soto, 1998). Comme il a été démontré que cette lignée cellulaire présentait un point de mutation au niveau du site de liaison aux androgènes provoquant une affinité pour les estrogènes, une lignée de cellules MCF7 transfectées pour exprimer de façon stable le récepteur aux androgènes a été développées (Sonnenschein et Soto, 1998). Cette lignée répond de façon spécifique aux androgènes par une diminution de sa vitesse de prolifération.

2-3 Tests utilisant un gène rapporteur.

Le principe des tests d'expression d'un gène rapporteur est de mesurer l'induction de la transcription de ce gène suite à l'activation d'un récepteur hormonal. Ces tests sont basés sur le développement de cellules de mammifères ou de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) génétiquement modifiées (Balaguer et al., 1996). Les cellules sont transfectées de façon transitoire ou stable avec un plasmide vecteur portant les séquences ADN d'un élément de réponse à une hormone (« Hormone response element » ou HRE) couplé à un gène rapporteur comme celui de la β -galactosidase ou la luciférase. Ce plasmide peut également contenir la

séquence ADN codant pour un récepteur hormonal spécifique (par exemple un récepteur aux estrogènes ou le récepteur aux androgènes). Cette séquence est indispensable pour les souches de levure et pour les cellules qui n'expriment pas le récepteur étudié. L'exposition à une molécule active vis-à-vis du récepteur hormonal visé provoquera une liaison de cette molécule et de ce récepteur. Le complexe ligand-récepteur formera un dimère qui interagira avec le HRE, entraînant une activation de la transcription et l'expression du gène rapporteur. Si par exemple ce gène est la β -galactosidase, elle métabolisera un substrat spécifique présent dans le milieu de culture comme le CPRG (chlorophénol rouge-beta-D-galactopyranoside), conduisant à une coloration rouge due à la libération de chlorophénol. Cette coloration peut être mesurée avec un spectrophotomètre (De Boever et al., 2001). L'intensité de la coloration est un indicateur de l'estrogénicité de la molécule testée.

Ces tests utilisant un gène rapporteur ont l'avantage de permettre une quantification de l'activité agoniste ou antagoniste des molécules testées en évitant l'utilisation de molécules radiomarquées, d'être assez rapides à mettre en œuvre, et d'être adaptables à divers récepteurs hormonaux. Ils permettent en outre de tester des mélanges de xénobiotiques (Arnold et al., 1996).

2-4 Limites des tests *in vitro*.

Si ces tests fournissent des moyens rapides et relativement économiques d'obtenir des informations sur l'activité d'une molécule testée vis-à-vis d'un récepteur donné, ils ne sont néanmoins pas dépourvus de défauts. Le premier est qu'on ne peut simuler *in vitro* les systèmes endocriniens intégrés des organismes vivants et plus précisément les conséquences toxiques à l'échelle d'un organisme entier d'une perturbation endocrinienne. Une autre limitation concerne les carences métaboliques, tant qualitatives que quantitatives des modèles *in vitro* quand on les compare au métabolisme *in vivo*.

3 Métabolisme et activité endocrinienne.

3-1 Les systèmes de biotransformation.

La connaissance du métabolisme d'une substance est particulièrement importante dans l'évaluation de son éventuelle toxicité. Elle peut fournir des informations sur le potentiel de cette substance à être bioaccumulée, à être convertie en une molécule plus active (activation métabolique) ou au contraire moins active (détoxification métabolique).

Les étapes clés de la biotransformation des xénobiotiques ou des hormones stéroïdiennes sont (1) l'oxydation de ces composés (par des enzymes dites de phase I ou de fonctionnalisation) (2) souvent suivie de la conjugaison de la fonction ainsi introduite avec des molécules très polaires comme l'acide glucuronique, l'acide sulfurique, le glutathion ou encore un glucose (conjugaison par les enzymes dites de phase II) (fig.6).

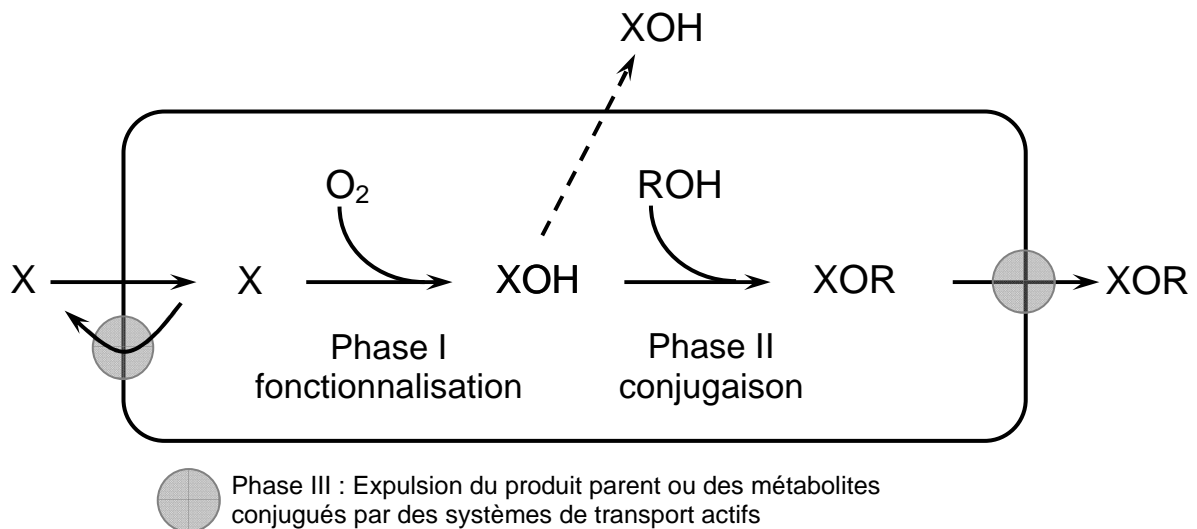


Fig.6 : Etapes clés de la biotransformation des xénobiotiques ou des hormones stéroïdiennes

Les enzymes clés d'oxydation sont principalement les isoformes de la superfamille des cytochromes P450 (CYP). Les CYP catalysent les réactions de mono-oxygénation, de réduction, et d'hydrolyse de nombreux substrats, les rendant plus polaires et solubles dans l'eau, plus facilement pris en charge par les enzymes de phase II et potentiellement plus rapidement éliminés. Néanmoins, la phase I du métabolisme, et dans une moindre mesure la phase II, peuvent amener à la formation de métabolites plus actifs ou toxiques que le composé parent. Les principaux CYP impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques chez l'homme sont les CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 et CYP4A11. Les CYP ont une localisation essentiellement hépatique (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C8, 2C9, ...), parfois extrahépatique (CYP1A1), parfois ubiquitaire (CYP2D6). Parmi toutes ces enzymes, le CYP3A4 est le plus abondant dans le foie humain et joue un rôle clé dans le métabolisme des stéroïdes et des xénobiotiques.

Les enzymes de phase II catalysent la conjugaison des métabolites générés par les enzymes de phase I du métabolisme à des molécules polaires, solubles dans l'eau, comme l'acide glucuronique ou le glutathion. Le composé parent peut également être directement pris en charge par des enzymes de phase II, sans intervention préalable d'enzymes de phase I, s'il possède les fonctions chimiques adéquates. Les réactions de phase II entraînent généralement la détoxification du xénobiotique actif ou de ses métabolites. Les sulfotransférases appartiennent à une large classe d'enzymes qui transfèrent un groupe sulfate du donneur de sulfate universel qu'est la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS). Les molécules prises en charge sont de natures chimiques extrêmement diverses, allant des petites molécules endogènes comme les hormones stéroïdes ou thyroïdiennes ou les vitamines, aux macromolécules comme les glycosaminoglycanes ou les peptides. Les fonctions les plus susceptibles d'être conjuguées sont les hydroxyles aromatiques et aliphatiques. (Scrott et al., 1996 et 2002). Les sulfotransférases sont présentes dans le cytosol et les membrane de l'appareil de Golgi des cellules. Les UGT sont un ensemble de deux familles d'enzymes possédant de nombreux isoformes catalysant la glucuronidation de composés exogènes et endogènes. Elles sont présentes dans le réticulum endoplasmique des cellules. Les deux familles – UGT1 et UGT2 – n'ont pas les mêmes substrats. Les UGT1 métabolisent la bilirubine, les amines et les phénols tandis que les UGT2 ont un spectre de métabolisation plus large (stéroïdes, acides biliaires, opioïdes...).

Ainsi, *in vivo*, les molécules endogènes comme exogènes voient leur activité modulée par l'ensemble des enzymes du métabolisme capables de les prendre en charge.

3-2 Exemple des stéroïdes endogènes.

Tous les stéroïdes sont dérivés du cholestérol. La synthèse des hormones stéroïdes est effectuée au niveau des cellules du cortex des glandes surrénales, des cellules de la thèque de l'ovaire et des cellules de Leydig des testicules. La pregnénolone, produit initial de la réaction de clivage de la chaîne latérale du cholestérol par le CYP11A1, est utilisée dans différentes voies de synthèse menant à la formation de stéroïdes variés dont les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes dans les surrénales, et les stéroïdes sexuels (androgènes, estrogènes et progestérone) dans les gonades (fig.7). Les stéroïdes endogènes peuvent être convertis en métabolites actifs ou inactifs dans les tissus cibles (revue par Steimer, 2003). La conversion des androgènes par l'aromatase, membre de la famille des cytochromes P450 (CYP19), est une étape essentielle de la biosynthèse des estrogènes dans les ovaires, le placenta et les testicules (fig.8). Les tissus non stéroïdogènes exprimant l'aromatase incluent le foie, le tissu adipeux et le système nerveux central.

Ces étapes de phase I du métabolisme permettant l'obtention d'estrogènes et d'androgènes à partir du cholestérol, sont l'exemple parfait démontrant qu'elles peuvent activer un substrat et en modifier radicalement l'activité.

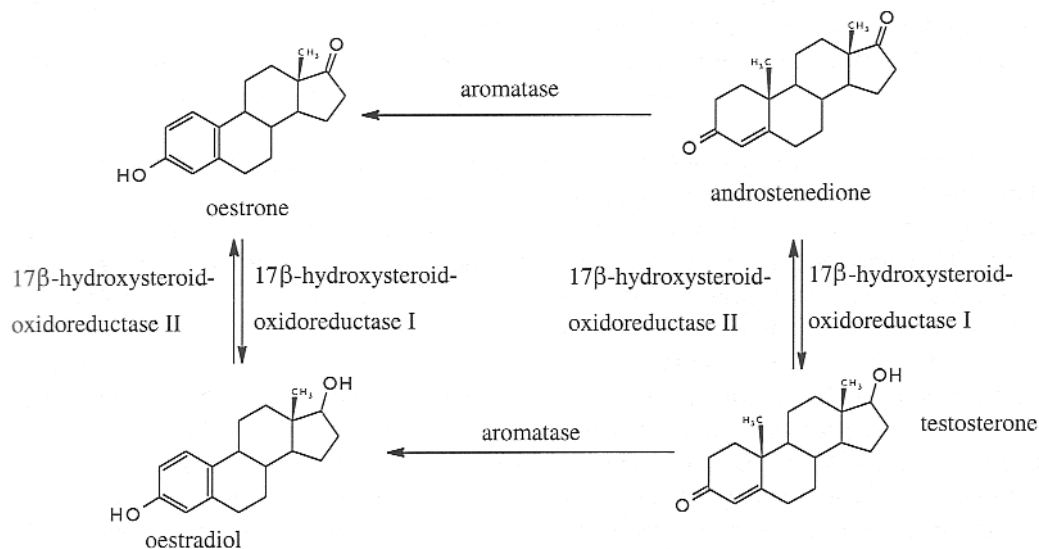


Fig.8 : Exemple de l'influence des réactions de biotransformation sur l'activité des molécules métabolisées : rôle de l'aromatase dans la conversion des androgènes en estrogènes.

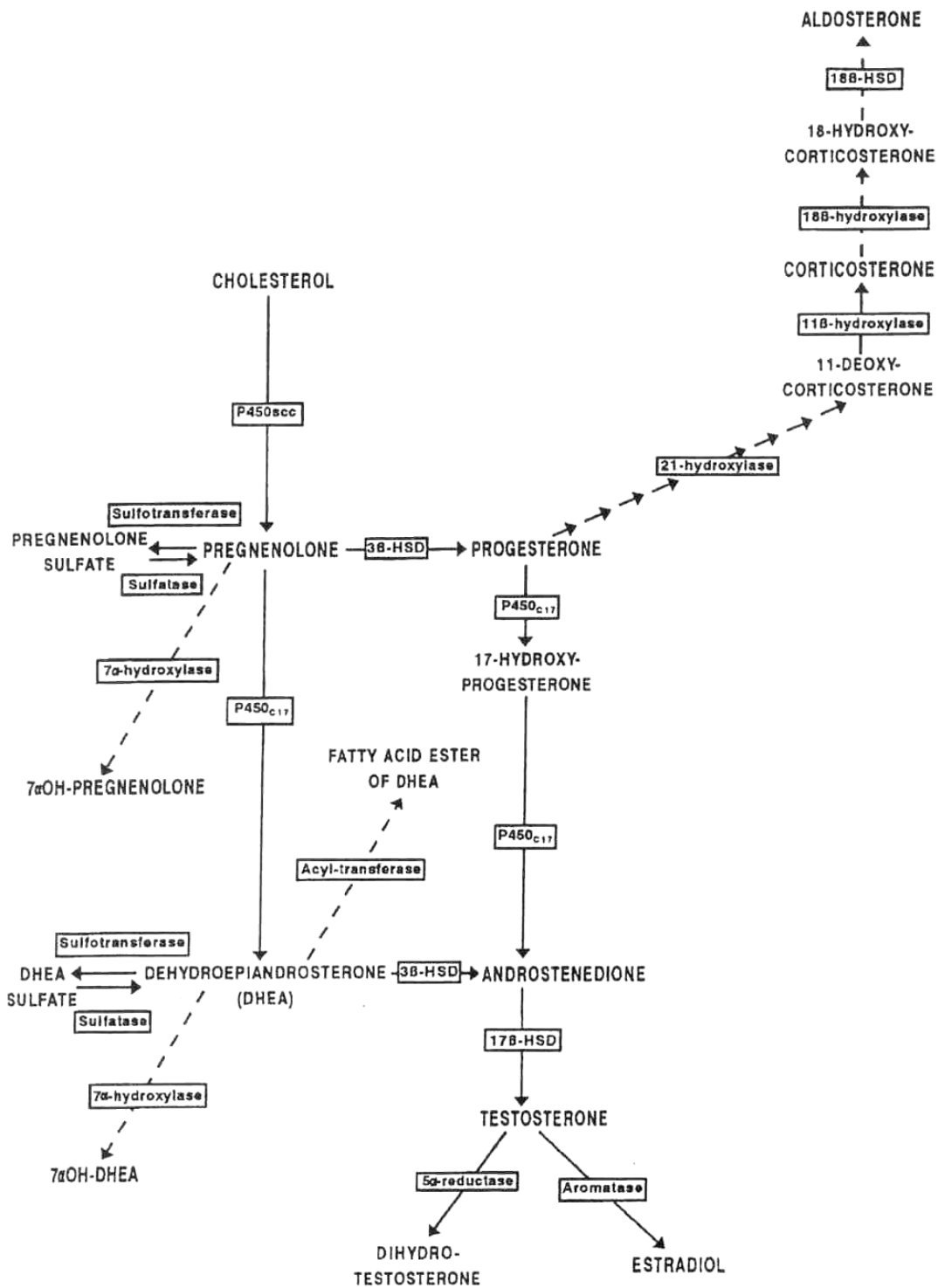


Fig.7 : Voies de synthèse des hormones stéroïdes (d'après Mensah-Nyagan et al., 1999).

3-3 Rôle du métabolisme dans l'activation et l'inactivation des perturbateurs endocriniens.

Le rôle du métabolisme dans l'activation ou la modification de l'activité des perturbateurs endocriniens peut être souligné par quelques exemples. Ainsi, la conversion du tamoxifène en un dérivé 4-hydroxylé par les CYP 3A4 et 2D6 est requise pour conférer à cette molécule l'activité anti-estrogénique suffisante pour laquelle elle est utilisée en médecine (Dehal and Kupfer, 1999). Alors que le *p,p'*-DDT est un estrogène environnemental, son métabolite *p,p'*-DDE ne se lie que très faiblement au ER (Kelce et al., 1995). Néanmoins, l'administration de *p,p'*-DDE (100mg/kg/jour) à des rates en gestation entre les 14^{ème} et 18^{èmes} jours de gestation réduit la distance anogénitale et provoque le maintien des mamelons thoraciques chez les nouveau-nés mâles. En outre, le *p,p'*-DDE se lie *in vitro* au AR avec une affinité modérée et inhibe l'activation transcriptionnelle induite par la DHT aussi efficacement que l'hydroxyflutamide, un médicament antiandrogénique. Le mécanisme responsable de cette inhibition, qui indique un effet antiandrogénique de ce métabolite, est l'inhibition de la liaison AR-ADN (Kelce et al., 1995).

3-4 Conséquences vis-à-vis de l'évaluation de l'activité perturbatrice endocrinienne à l'aide de tests *in vitro*.

Il est reconnu que les tests employant des lignées cellulaires ne permettent pas de prendre en compte une activation métabolique des xénobiotiques (Gray et al., 2002), du fait de l'expression réduite voire de l'absence des enzymes de phase I. Le risque dans ce cas particulier est donc d'observer des faux négatifs, c'est-à-dire que le test puisse donner une réponse négative alors que l'activité endocrinienne existe *in vivo*. En outre, une éventuelle métabolisation des molécules testées n'est pratiquement jamais prise en compte lors de l'analyse des résultats obtenus avec ces lignées cellulaires. Ainsi, si une activation de la molécule n'est pas prise en compte, son inactivation par des enzymes de phase II non plus alors que dans un tel cas, la réponse observée pourrait être sous évaluée. Enfin, ces essais peuvent entraîner des réponses faussement positives lorsque les molécules sont testées à des concentrations plus élevées que celles observées *in vivo* (Gray et al., 2002).

4 La génistéine.

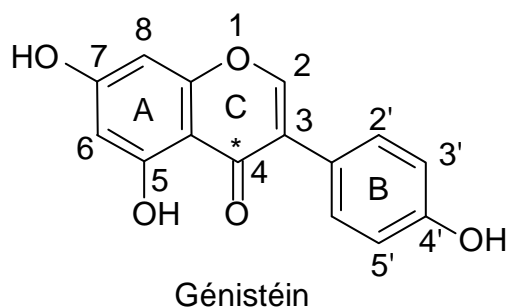


Fig. 9 : structure chimique de la génistéine

4-1 La génistéine et autres phytoestrogènes.

Les phytoestrogènes sont des substances présentant des propriétés estrogéniques qui sont produites naturellement par certaines plantes. La majorité des phytoestrogènes appartient au groupe des flavonoïdes (tableau n°2), parmi lesquels se distinguent trois classes : les isoflavones, les coumestans et les flavonoïdes prénylés. Un autre groupe de phytoestrogènes rassemble des molécules non flavonoïdes.

Tableau n°2 : Classification structurale des phytoestrogènes (les composés entre parenthèse ne sont pas présents dans les plantes mais sont issus de la biotransformation des molécules de leur classe)

<u>Phytoestrogènes</u>			
Flavonoïdes			Non flavonoïdes
Isoflavones	Coumestanes	Prénylflavonoïdes	Lignanes
Génistéine	Coumestrol	8-prénylnaringénine	Laricirésinol
Daidzéine		6-prénylnaringénine	Isolaricirésinol
(Equol)		Xanthohumol	Matairésinol
Glycitéine		Isoxanthohumol	Sécoisolaricirésinol
Biochanine A			(Entérodol)
Formononetine			(Entérolactone)

Les isoflavones sont définies par leur structure moléculaire, basée sur le squelette indiqué figure 10.

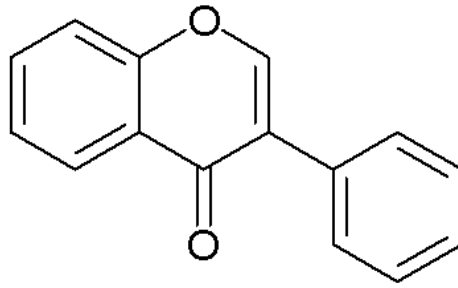


Fig.10 : structure d'une isoflavone.

Les phytoestrogènes possèdent des propriétés estrogéniques qui peuvent s'expliquer en raison des analogies structurales qu'ils partagent avec l'estradiol (fig.11).

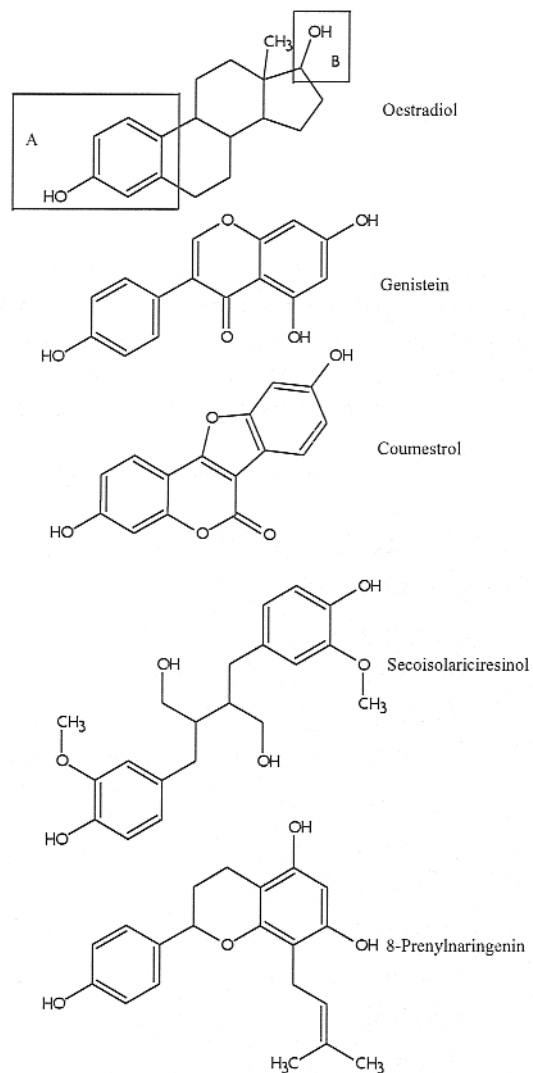


Fig.11 : structures chimiques de quelques phytoestrogènes comparées à celle de l'estradiol.

4-2 Sources et voies d'exposition de l'homme.

Les sources d'exposition humaine à la génistéine (et aux phytoestrogènes en général) sont essentiellement alimentaires, via la consommation de plantes telles le soja et de leurs produits de transformation. La concentration en phytoestrogènes des plantes peut être très variable. Les facteurs mis en cause sont l'espèce de plante considérée, la souche, l'année et/ou la zone géographique de récolte (Wang and Murphy, 1994). Ainsi, les concentrations en phytoestrogènes peuvent varier de quantités indétectables jusqu'à des concentrations de l'ordre du gramme par kilogramme de plante (poids frais). Dans les plantes, les isoflavones sont présentes principalement sous forme conjuguée au glucose. Le soja est la source majeure en phytoestrogènes, et en génistéine en particulier (Mazur and Adlercreutz, 1998), de telle manière que l'ingestion quotidienne d'isoflavones est généralement corrélée avec la consommation de soja (Wiseman et al., 2002). Les produits préparés par fermentation du soja, tel que le miso ou le tofu, ou par cuisson contiennent également de fortes concentrations en isoflavones. Les isoflavones y sont alors majoritairement présentes sous forme d'aglycone. Les isoflavones, dont la génistéine, sont ainsi retrouvées dans les laits infantiles à base de soja (18 – 41 mg d'isoflavones par litre). La consommation d'isoflavones chez les nourrissons âgés de 4 mois nourris à ces laits maternels serait de 4,5 à 8 mg/kg pc/j (Setchell et al., 1998). Les enfants nourris au sein maternel peuvent également être exposés aux isoflavones, en fonction du régime alimentaire de leur mère. Ainsi, des concentrations allant de $5,1 \pm 2,2$ à $70,7 \pm 19,2$ nM voire 200 nM d'isoflavons ont été retrouvés dans les laits de mères consommant de la nourriture à base de protéines de soja (Francke et al, 1998 & 2006). L'injection journalière de génistéine, sur la base d'un régime végétarien, serait en moyenne de 0,1 mg/kg pc/j (Clarke et al., 2003), tandis qu'un régime normal apporterait moins d'1 mg d'isoflavones totales par personne (Wiseman et al., 2002).

Enfin, il existe sur le marché des suppléments riches en phytoestrogènes vendus comme traitements hormonaux substitutifs afin de traiter les troubles climériques ou pour développer « naturellement » chez la femme la taille de la poitrine. Leurs contenus en phytoestrogènes sont extrêmement variables, autant qualitativement que quantitativement. Ils sont même très souvent inférieurs à ce qui est indiqué par les fabricants (Nurmi et al., 2002, Setchell et al., 2001).

Il est à noter qu'en Asie orientale, la consommation quotidienne d'isoflavones, dont la génistéine, est bien plus élevée qu'en Europe ou aux USA, du fait de l'utilisation habituelle du soja comme ingrédient dans les régimes traditionnels. Ainsi, au Japon, la consommation

d'isoflavones serait de l'ordre de 20 à 50 mg/j sous forme glycosylée pour la population générale (Arai et al., 2000, Nagata et al., 2000). Des valeurs deux fois inférieures ont été rapportées pour la Chine (Chen et al., 1999, Mei et al., 2001) et la Corée (Kim and Kwon, 2001), mais avec une variation très importante entre les communautés.

4-3 Données toxicologiques.

4-3-1 Absorption, distribution, métabolisme et élimination

Comme les autres isoflavones, la génistéine est présente dans les plantes non transformées principalement sous forme de glucoside (la génistine). Pour être absorbée, la génistine doit être hydrolysée et libérer la génistéine (Setchell et al., 2002). L'hydrolyse de la forme glycosylée est effectuée par la β -glucosidase de l'intestin grêle, mais également par la microflore intestinale (Barnes et al., 1996, Xu et al., 1995). La microflore intestinale joue d'ailleurs un rôle très important dans le métabolisme de la génistéine avant même que celle-ci soit absorbée, formant la dihydrogénistéine et l'acide 4-hydroxyphényle-2-propionique. Une fois absorbée, la génistéine est facilement conjuguée à l'acide glucuronique et/ou au sulfate en position 3' et 7 au niveau du foie mais aussi de l'épithélium intestinal qui possède des activités glucuronosyl transférase et sulfotransférase (Setchell, 1998, Sfakianos et al., 1997).

Après administration orale chez le rat de [14 C]-génistéine, la radioactivité retrouvée dans les organes reproducteurs (vagin, utérus, ovaires et prostate) est supérieure à celle mesurée dans autres organes périphériques (Coldham and Sauer, 2000). Toujours chez le rat, après administration intrapéritonéale, la génistéine inchangée est retrouvée dans le cerveau (Setchell, 1998). La génistéine circule principalement sous forme conjuguée à l'acide glucuronique dans le plasma (Holder et al., 1999). Les concentrations plasmatiques et tissulaires en génistéine augmentent avec la dose ingérée chez le rat (Chang et al., 2000). Chez l'homme, la génistéine a été retrouvée dans de nombreux fluides biologiques, tels que l'urine, le plasma, les fèces, le fluide prostatique, la bile, la salive, le lait maternel (Adlercreutz et al., 1995). La concentration plasmatique maximale est atteinte environ 8 h après l'ingestion en une prise d'environ 30 mg de génistéine sous forme de poudre de soja (Watanabe et al., 1998). L'excrétion par voie urinaire est majoritaire chez le rat. En effet, Coldham et Sauer (2000) ont retrouvé dans les urines de rats mâles et femelles 66% de la dose de [14 C]-génistéine administrée par voie orale (4 mg/kg pc). Soixante-dix à 80 % de la [14 C]-génistéine administrée par voie orale chez le rat est excrétée sous forme conjuguée à l'acide glucuronique par voie biliaire. La génistéine est ensuite à nouveau déconjuguée par la flore

intestinale et subit un cycle entérohépatique (Barnes et al., 1996). La demi-vie plasmatique de la génistéine varie de 8,5 à plus de 20 h chez l'Homme, avec des phénomènes de recirculation entérohépatique (Setchell et al., 2003, Busby et al., 2002, Vergne et al., 2007). Après une ingestion unique de 16 mg/kg pc de génistéine, la C_{max} pour la génistéine non modifiée est de 0,07 μM , et pour la génistéine et ses conjugués 7,7 μM (Busby et al., 2002). Néanmoins, le métabolisme et l'excrétion des isoflavones chez l'Homme sont sujets à des variations interindividuelles importantes (Setchell, 1998), liées à la flore intestinale ou au régime alimentaire. Des variations liées au sexe ont été observées chez le rat (Coldham et al., 1999, Coldham and Sauer, 2000).

Enfin, la génistéine et ses métabolites présents dans le plasma sont retrouvés dans le lait maternel (Franke et al., 1998). Chez la rate en gestation recevant par gavage 20, 34 ou 75 mg/kg pc, la recherche des résidus chez le fœtus montre que la génistéine et ses métabolites sont retrouvés dans le plasma et le cerveau de fœtus exposés *in utero* (Doerge et al., 2001). La concentration en génistéine était plus faible que dans le plasma maternel, mais la proportion de forme aglycone était plus importante (> 90 % dans le cerveau, pour 0,2 pmol/mg de génistéine totale contre 8 % pour 3,5 μM dans le plasma maternel).

4-3-2 Propriétés estrogéniques.

4-3-2-1 *In vitro*.

La génistéine présente une affinité pour les deux sous-types de l'ER. Néanmoins, son affinité est plus marquée pour l'ER β que pour l'ER α (Kuiper and Gustafsson, 1997). Les essais de liaison aux récepteurs aux estrogènes donnent une affinité de liaison relative à l'estradiol de 0,0001 pour l'ER α et 0,0088 pour l'ER β .

la génistéine présente des propriétés stimulatrices (à faible concentration) et inhibitrice (à concentration plus élevée) de la croissance auprès des lignées cellulaires dépendantes des estrogènes. Seul l'effet à faible dose serait lié à un mécanisme médié par les ER, puisque ces faibles concentrations ne stimulent pas la croissance des cellules dépourvues d'ER alors qu'à forte concentration, la croissance de ces dernières est toujours inhibée. D'après la C_{max} (la concentration en composé qui promeut une prolifération cellulaire maximale) ou l'EC₅₀, la génistéine est considérée comme étant environ mille fois moins active que l'estradiol (Breinholt and Larsen, 1998, Wang and Kurzer, 1997).

Lors des essais basés sur des cellules ou des levures recombinantes, exprimant un gène rapporteur sous le contrôle d'un ERE, l'estrogénicité de la génistéine allait de 1.10^{-6} à 2.10^{-3} (relativement à l'estradiol). Cette amplitude pourrait être liée aux différences de métabolisme

cellulaire et de transport membranaire de la génistéine depuis les milieux d'incubation (Nagel et al., 1999, Nagel et al., 1998).

4-3-2-2 *In vivo*.

La nourriture standard pour rongeurs peut contenir des phytoestrogènes (dont la génistéine) en quantité suffisante pour présenter un effet estrogénique, comparée à une alimentation spécifiquement dépourvue en phytoestrogènes (Odum et al., 2001).

Les expérimentations basées sur le test d'utérotrophie chez la souris ont montré que la génistéine est 100 000 fois moins puissante que le DES (Song et al., 1999). L'injection sous-cutanée de 500 mg de génistéine/kg pc/j à des rates prépubères (16, 18 et 20^{ème} jours après la naissance) intactes ou ovariectomisées induit des effets estrogéniques tels qu'une hausse significative du poids relatif de l'utérus et une hypertrophie de l'épithélium luminal et glandulaire de l'utérus (Cotroneo and Lamartiniere, 2001). Une hausse du poids de l'utérus a également été observé chez les souris femelle traitées par voie sous-cutanée avec 50 mg/kg pc/j le 15^{ème} jour après la naissance (Newbold et al., 2001).

4-3-3 Fertilité et développement des organes reproducteurs.

Les phytoestrogènes ont été associés pour la première fois à des effets délétères au niveau du développement et de la fertilité chez des brebis ayant consommé de grandes quantités de trèfle (« syndrome du trèfle »), et chez lesquelles ont été mesurées des concentrations plasmatiques anormales en hormones endogènes accompagnées d'une perte de fertilité (Moersh et al., 1967). De nombreuses études complémentaires ont été menées chez les rongeurs afin d'évaluer le risque lié à une forte consommation de phytoestrogènes tels que la génistéine, sur la fertilité humaine.

Par exemple, l'exposition de rates à 0,2 mg de génistéine/kg pc/j via la nourriture du 10^{ème} jour de gestation jusqu'au 70^{ème} jour après la naissance a provoqué une diminution du poids de leur utérus et de leurs ovaires et un oestrus irrégulier (Awoniyi et al., 1998). Néanmoins, des doses supérieures (0,4 et 4 mg/kg pc/j) via l'alimentation n'ont eu aucun effet sur le nombre et poids des nouveaux-nés (Kang et al., 2002). L'ouverture du vagin chez les femelles n'a pas été modifiée, tandis que le nombre de spermatozoïdes et leur mobilité étaient normaux chez les mâles. Cent jours après la naissance, il n'y avait pas de différences dans le poids et l'histologie des organes reproducteurs ni chez les mâles ni chez les femelles. L'injection sous-cutanée à des rats mâles de 4 mg de génistéine /kg pc/48h du 2^{ème} au 18^{ème} jours après la naissance a provoqué une réduction du poids des testicules, une augmentation

de l'apoptose des cellules germinales et une formation retardée de la lumière des tubules séminifères (Atanassova et al., 2000). Globalement, les expériences menées chez les rongeurs ont montré que la génistéine avait des effets estrogéniques à la fois chez les femelles et chez les mâles, les effets les plus marqués étant obtenus lors d'une exposition pendant les étapes périnatales, néonatales et prépubertaires du développement, mais aussi à des doses souvent supérieures à celles auxquelles l'Homme est exposé, et parfois administrées par voie sous-cutanée, qui exclut le métabolisme du premier passage gastrointestinal et hépatique.

4-3-4 Système nerveux central.

Les récepteurs aux estrogènes sont présents dans le système nerveux central (Kuiper et al., 1998). Les estrogènes sont connus pour agir sur de nombreuses aires du cerveau et pour influencer le comportement, le mouvement, la réflexion, la sensibilité à la douleur. Ils ont également un effet protecteur vis-à-vis du développement de maladies neurodégénératives (McEwen, 1999). Les phytoestrogènes, tels que la génistéine, pourraient donc exercer des effets similaires. Chez les rats, la génistéine passe la barrière hémato-méningée, mais les concentrations retrouvées dans le cerveau sont plusieurs centaines de fois inférieures à celles mesurées dans le plasma (Chang et al., 2000). Néanmoins, chez l'homme, la barrière hémato-méningée n'est pas complètement développée à la naissance ce qui laisse penser que le système nerveux central pourrait être plus accessible aux phytoestrogènes *in utero* ou à la naissance.

Les études réalisées chez les rongeurs montrent qu'une exposition via l'alimentation (600 mg d'isoflavones / kg de nourriture) ou par injection sous-cutanée (< 1 mg génistéine/j) peut provoquer une diminution du comportement d'accouplement chez les femelles (Patisaul et al., 2001).

4-3-5 Système immunitaire.

Les estrogènes, en particulier l'estradiol, sont impliqués dans le développement et l'organisation des tissus lymphoïdes (via l'ER α) et dans l'activité des cellules vectrices des fonctions immunitaires. Les femelles présentent ainsi des réponses immunitaires plus vigoureuses que les mâles (Ansar Ahmed et al., 1985, Grossman, 1984). En contrepartie, les femelles sont plus susceptibles de développer des pathologies auto-immunes (Ansar Ahmed et al., 1985, Jacobson et al., 1997). Si *in vitro* la génistéine (37 μ M) inhibe la prolifération des cellules T humaines, la production d'interleukine-2 et l'expression du récepteur de cette dernière (Atluru and Atluru, 1991), les effets observés *in vivo* sont contradictoires.

4-3-6 Ostéoporose.

L'activité ostéoclastique est favorisée par une déficience en estrogène. L'ostéoporose est donc un problème particulier chez les femmes ménopausées, du fait de l'accélération de la perte osseuse liée à des taux d'estrogènes réduits. Les traitements hormonaux substitutifs ont montré leur efficacité dans la prévention de la perte osseuse chez les femmes ménopausées (Felson et al., 1993).

Les études menées chez les rongeurs ont montré que les isoflavones, dont la génistéine, jouaient un rôle bénéfique dans la prévention de la perte osseuse due à une ovariectomie (Ishimi et al., 2000, Nakajima et al., 2001, Wu et al., 2001). Les mécanismes évoqués pour expliquer ces effets positifs des phytoestrogènes sont multiples, tels qu'un accroissement de l'absorption de calcium (Omi et al., 1994), une suppression de l'activité ostéoclastique par inhibition de la tyrosine kinase (Blair et al., 1996) ou encore une stimulation de facteurs paracrine dérivés des ostéoblastes modulant la formation et l'activation des ostéoclastes (Viereck et al., 2002). Chez l'homme les données épidémiologiques indiquent que la consommation de phytoestrogènes est associée à une densité minérale osseuse plus élevée dans les populations consommant plus de soja que la moyenne (Ho et al., 2001, Horiuchi et al., 2000, Somekawa et al., 2001).

4-3-7 Système cardiovasculaire.

Des études épidémiologiques ont montré que les régimes riches en soja ou en protéines de soja avaient un effet hypocholestérolémiant chez l'Homme (Ho et al., 2000, Ridges et al., 2001). Néanmoins, les phytoestrogènes ne seraient pas les seuls responsables, les fibres ou les phytostérols du soja, structurellement similaires au cholestérol, ont montré des effets hypocholestérolémiants (Ling and Jones, 1995). En outre, des études menées chez des sujets sains ou souffrant d'hypercholestérolémie auxquels ont été administrées des comprimés d'isoflavones (40 à 80 mg/j) n'ont montré aucun effet (Simons et al., 2000, Uesugi et al., 2002).

4-3-8 Génotoxicité et mutagénicité.

L'activité génotoxique et mutagène de la génistéine a été étudiée *in vitro*. Kulling et Metzler (1997) ont démontré que la génistéine (> 25 µM) induisait des micronoyaux dans les cellules de hamster chinois V79. En outre, la génistéine à la concentration de 25 µM provoque une augmentation significative de la fréquence des mutations du gène de l'hypoxanthine

guanine phosphoribosyl transférase. Il a été également montré que la génistéine induisait des cassures de l'ADN (7-118 μM), des mutations (10-80 μM) et des micronoyaux (6-100 μM) (Boos and Stopper, 2000). La génistéine (25 μM) induit des cassures de chromatides, des « gaps » et des échanges de chromatides sœurs dans des lymphocytes en culture (Kulling et al., 1999). Ce phytoestrogène provoque une inhibition de la croissance des cellules de tumeur de prostate humaine LNCaP et PC-3 à des concentrations inférieures à 10 μM , ainsi que des cassures de l'ADN dans ces cellules (Mitchell et al., 2000). Le mécanisme mis en jeu impliquerait la formation de métabolites hydroxylés de la génistéine. Ces catéchols formeraient des quinones pouvant réagir pour former des adduits à l'ADN (Liehr and Roy, 1990).

La génistéine est un inhibiteur de la topoisomérase II *in vitro*, une enzyme nucléaire impliquée dans la réplication, la transcription, la recombinaison, l'intégration et la transposition de l'ADN (Kaufmann, 1998, Polkowski and Mazurek, 2000). L'inhibition de cette enzyme pourrait expliquer les effets clastogéniques de la génistéine.

4-3-9 Cancérogénicité.

Les incidences de plusieurs cancers hormono-dépendants, dont ceux de la prostate et du sein, sont plus élevées dans les pays occidentaux (Europe et USA) qu'en Chine ou au Japon (Tham et al., 1998). Les études épidémiologiques, incluant les individus ayant migré d'une région à l'autre, indiquent que le régime alimentaire joue un rôle primordial dans l'étiologie de ces maladies. Or, l'une des particularités alimentaires des populations extrême-orientales est la consommation importante de soja et d'aliments dérivés du soja. Les résultats de certaines études épidémiologiques suggèrent que la consommation de soja durant l'enfance aurait un effet protecteur vis-à-vis du développement de cancers du sein lors de la vie adulte. Cette hypothèse expliquerait en partie pourquoi le risque réduit de développer certains cancers observés chez les migrants d'Asie extrême-orientale augmente au fur et à mesure des générations installées dans un pays occidental (Ziegler et al., 1993). Les données expérimentales obtenues sur des modèles animaux de cancers induits par des produits chimiques montrent un effet protecteur de la génistéine, administrée par voie alimentaire ou par injection sous-cutanée chez les rats nouveaux nés et avant la puberté (Hilakivi-Clarke et al., 1999, Lamartiniere et al., 1995). Néanmoins, des études similaires réalisées chez des souris greffées avec des tumeurs mammaires (cellules MCF-7) montrent que la génistéine stimule la croissance de ces tumeurs (Ju et al., 2001). Enfin, *in vitro*, les propriétés estrogéniques de la génistéine provoquent la multiplication, médiée par les ER, des cellules

MCF-7 (Hsieh et al., 1998). Néanmoins, la génistéine présente également des effets cytotoxiques indépendants des ER (Maggiolini et al., 2001). Elle provoque en effet un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M et stimule l'apoptose chez les cellules MCF-7 (Constantinou et al., 1998a, Santell et al., 2000).

4-3-10 Autres propriétés.

La génistéine présente des propriétés antioxydantes *in vitro*. Elle inhibe en effet la formation de dommages à l'ADN induits par des radicaux libres avec une CI₅₀ de 9 µM (Harper et al., 1999). Une inhibition de l'oxydation de certaines fractions du cholestérol (LDL) a également été observée chez l'Homme, bien que cette propriété ne puisse pas être attribuée avec certitude au contenu en phytoestrogènes du soja (Tikkanen et al., 1998, Wiseman et al., 2000).

La génistéine, ainsi que la daidzéine et la biochanine A, inhibent la thyropéroxydase, une enzyme impliquée dans la synthèse de T₃ et T₄ (Divi et al., 1997). La CI₅₀ calculée pour la génistéine est de 3,2 µM. *In vivo* chez le rat, des quantités relativement importantes en soja dans l'alimentation associée à une déficience en iode peut entraîner un effet goitrogène (Ikeda et al., 2001). Chez l'Homme, des effets goitrogènes ont été observés chez des nouveaux nés nourris avec du lait maternisé à base de farine de soja (Hydovitz, 1960). Ces effets ont été supprimés en utilisant des protéines de soja extraites plutôt que de la farine, et en supplémentant la formulation avec de l'iode.

5 Le bisphénol A.

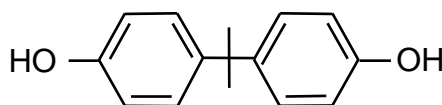


Fig.12 : structure chimique du bisphenol A

5-1 Propriétés physiques et chimiques.

Le Bisphénol A est le nom usuel du 2,2-(4,4-dihydroxyphényl)propane. Sous conditions ambiantes de température et de pression, le BPA est solide. Sa solubilité dans l'eau est de 120 à 300 mg/l, et son pKa de 9,6 à 10,2 (Staples et al., 1998). Son coefficient de partition octanol-eau log K_{ow} est de 3,40. Ces données sont résumées dans le tableau n°3.

Tableau n°3 : Propriétés physiques et chimiques du BPA

Paramètre	Valeur
No. CAS	80-05-7
Poids moléculaire	228,29 g/mol
Formule brute	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Densité spécifique	Entre 1,060 et 1,195 g/cm ³
Point de fusion	Entre 150 et 155°C
Point d'ébullition	220°C à 4 mm Hg 398°C à 760 mm Hg
Solubilité dans l'eau	120 à 300 mg/l
Log K _{ow}	3,40

5-2 Origine.

En 1936, Dodds et son équipe décrivent le premier estrogène synthétique dépourvu de noyau phénanthrène qui est la structure commune aux stéroïdes (Dodds and Lawson, 1936). Dans cet article, ils évaluent une série de molécules diphényles et concluent que seules celles possédant deux groupes hydroxyles en position para présentent une activité estrogénique ; parmi celles-ci, le di-(p-hydroxyphényl) diméthylméthane, ou bisphénol A (BPA). Le BPA pourrait ainsi être la première molécule synthétique décrite ayant une activité modulatrice sélective du récepteur aux estrogènes. Ces études structurales culminèrent en 1938 avec la découverte du diéthylstilbestrol (DES) (Dodds et al., 1938).

5-3 Usages.

Au début des années 1950 sont découverts le polycarbonate et la résine époxy obtenus par polymérisation du BPA. Ses propriétés une fois polymérisé (haute résistance à la chaleur, caractéristiques optiques, facilité d'utilisation) en ont fait une molécule de choix dans l'industrie des plastiques. En 1999, 65 % du BPA produit était utilisé dans la fabrication de polycarbonate, et environ 25 % dans celle de résine époxy. Les 10 % restant ont été utilisés dans la production de résines polyester ou de retardateurs de flamme bromés comme le

tétrabromobisphénol A. La production mondiale de BPA était de 2,2 millions de tonnes en 2003, avec une croissance de la demande attendue de 6 à 10 % par an (Richter et al., 2007). Les principaux producteurs de BPA sont les compagnies General Electric, Bayer et Dow. Les usages du BPA sont très nombreux. Il entre dans la fabrication de nombreux produits tels que disques compacts (CD), revêtement intérieur des cannettes en métal, papier thermique pour fax, casques de sécurité, bouteilles et conteneurs en polycarbonate (dont les bouteilles d'eau), plastiques de voitures, adhésifs, revêtements de protection, isolants pour les pièces électriques et électroniques... Le BPA est également utilisé dans la fabrication du PVC en temps qu'inhibiteur de réaction et antioxydant.

5-4 Devenir du BPA dans l'environnement.

Certaines données disponibles attestent de la biodégradation relativement rapide de BPA dans les eaux de surface et par les populations microbiennes acclimatées ou non utilisées dans les usines de traitement des eaux usées. Ainsi, plus de 80 % à 90 % du BPA est biodégradé en 28 jours suivant les méthodes standards employées. Les bactéries capables de biodégrader le BPA sont présentes dans les eaux de surface et la demi-vie moyenne du BPA dans ces eaux est inférieure à 5 jours en moyenne (Ike et al., 2000, Kang and Kondo, 2002a, Kang and Kondo, 2002b, Klecka et al., 2001). Néanmoins, des variations importantes dans la biodégradabilité du BPA peuvent être observées en fonction des espèces bactériennes présentes dans l'eau, de leur densité et des conditions aérobies ou anaérobies. Ainsi, le BPA peut être retrouvé non dégradé après 3 mois en conditions anaérobies (Kang et al., 2006).

5-5 Sources et voies d'exposition de l'homme.

5-5-1 Contamination par l'environnement.

Les sources d'entrée de BPA dans l'environnement sont multiples. Au niveau des usines de fabrication et d'élaboration, de faibles quantités de BPA sont autorisées à être directement rejetées dans l'atmosphère et dans les eaux de surface. Les concentrations en BPA mesurées dans des rivières des USA, d'Allemagne, des Pays-Bas et du Japon étaient inférieures ou égales à 8 ng/ml (Belfroid et al., 2002, Fromme et al., 2002, Kang et al., 2006). Des mesures dans l'air ont donné des concentrations en BPA allant de 2 à 208 ng/m³ dans trois échantillons d'air sur 7, dont un pris à proximité d'une usine de fabrication de plastiques (Rudel et al., 2001). Le BPA peut être adsorbé au niveau des sols et des sédiments où il est

plus concentré que dans les eaux de surface (Fromme et al., 2002). La demi-vie du BPA dans les sols, où il forme alors des résidus liés, pourrait être inférieure à 3 jours (Fent et al., 2003). Néanmoins, dans les zones à forte densité de population humaine, la contamination des sols par le BPA est entretenue par les déchets domestiques et industriels (Kawahata et al., 2004).

5-5-2 Contamination par l'alimentation.

Si les objets contenant du BPA se trouvent partout dans notre environnement immédiat, et si ce dernier contient du BPA monomère (air, eau, sol), notre exposition se fait principalement par voie orale, au travers de la consommation d'aliments ayant été conditionnés dans des emballages fabriqués à partir de BPA polymérisé. Des molécules de BPA monomère, non polymérisé, peuvent en effet migrer vers les matrices alimentaires ou l'eau de boisson depuis les plastiques (bouteilles, conserves, cannettes, biberons...). Les amalgames dentaires sont une autre source d'exposition au BPA monomère.

5-5-2-1 Migration du BPA à partir des emballages alimentaires.

Du BPA a été détecté dans des légumes, des boissons, des viandes, des poissons, des produits laitiers et des laits en poudre maternels en conserves ou contenus dans des emballages plastiques à base de BPA (tableau n°4).

Les facteurs principaux influençant la migration de BPA monomère depuis les revêtements intérieurs des conserves sont la durée de chauffage et les températures utilisées pendant la fabrication des produits (étape de stérilisation). Depuis les contenants en polycarbonate, le facteur principal est leur usure (plastique vieilli, rayé) (Brede et al., 2003, Takao et al., 1999). Brede et al. (2003) ont mesuré des concentrations moyennes en BPA de 0,2, 8,4 et 6,7 µg/l après avoir testé des biberons respectivement neufs, utilisés depuis 51 jours et utilisés depuis 169 jours. Ainsi, bien que le polycarbonate soit considéré comme stable, une hydrolyse peut avoir lieu à pH alcalin ou à haute température, telles celles employées pour stériliser les biberons. La limite de migration spécifique autorisée par la législation de l'Union européenne est de 3 mg de bisphénol A par kg de nourriture (EU risk assessment report, 2003).

Tableau n°4 : Concentrations en BPA dans des aliments en conserves exprimées en ng/g (d'après Kang et al., 2006).

Aliments en conserves	Nombre d'échantillons	Concentration (moyenne ^a , (valeurs extrêmes))	Références
	8	130 (17-602)	1
Viande	5	110 (17-380)	2
	6	21 (<20-98)	3
	10	22 (ND-43)	2
Poisson	8	23 (<20-109)	3
	9	30 (<5-102)	4
	14	25 (2-75)	1
Fruits et légumes	9	42 (ND-95) ^b	5
	10	25 (9-48)	2
	10	20 (ND-76)	6
	33	6 (<10-24)	3
	11	<1 (ND-<7)	2
Boissons	80	18 (ND-212)	5
	4	<10	3
	3	31 (21-43)	7
Lait maternel	14	5 (0,1-13)	8

^a Les concentrations indétectables ont été calculées comme égales à zéro. ND = non détectables.

^b concentrations en BPA dans la matière sèche.

N° des références : 1=Imanaka et al., 2001, 2=Goodson et al., 2002, 3=Thomson and Grounds, 2005, 4=Munguia-Lopez et al., 2005, 5=Yoshida et al., 2001, 6=Brotons et al., 1995, 7=Kang and Kondo, 2003, 8=Biles et al., 1999.

5-5-2-2 Ingestion de BPA.

L'analyse d'échantillons d'urine humaine a démontré que l'exposition humaine est considérable (Calafat et al., 2005, Matsumoto et al., 2003, Yang et al., 2003). Calafat et al. (2005) ont détecté la présence de BPA ($\geq 0,1$ ng/ml) dans 95 % des échantillons d'urine collectés parmi 394 adultes d'âges, de sexe et de lieux de résidences différents. Les hautes concentrations en BPA urinaire seraient corrélées avec la consommation de nourriture en conserves (Matsumoto et al., 2003). Ainsi, si l'eau, l'air ou le sol sont des sources d'exposition, la principale source de contamination serait l'alimentation. Les amalgames dentaires constitués de BPA-diglycidyléther sont une autre source d'exposition au BPA par voie orale (Olea et al., 1996, Pulgar et al., 2000). Il a été calculé que l'exposition moyenne des consommateurs de nourriture en conserve et de vin est de 9 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ (EU risk assessment report, 2003). La limite réglementaire d'ingestion maximale de BPA (DJA) est de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ dans l'Union européenne. Néanmoins, des études scientifiques ont suggéré que les BPA pourrait avoir des effets délétères à des doses inférieures à cette limite.

5-6 Données toxicologiques.

5-6-1 Toxicocinétiques, distribution et métabolisme.

Environ 28% de la dose administrée à trois groupes de 4 rats mâles a été retrouvée dans les urines au cours des 8 jours qui ont suivi l'administration par voie orale d'une dose unique de BPA (800 mg/kg) (Knaak and Sullivan, 1966). Le reste a été éliminé par voie fécale. Une heure après l'administration par voie orale d'une dose unique de 10 mg/kg de BPA, environ 90 % du BPA présent dans le sang de rates Wistar en gestation était sous forme glucuroconjuguée. La concentration en BPA glucuroconjugué a diminué de moitié pendant 3 h avant de revenir à sa valeur initiale après 8 h, suggérant un cycle entérohépatique du BPA (Miyakoda et al., 2000).

Dès 1 heure après administration par gavage, le [¹⁴C]-BPA est retrouvé dans le lait, le sang, le plasma, et dès 2 h dans la graisse sous cutanée, le foie, les reins, les poumons, les embryons, les testicules de rates et de rats traités par gavage. Néanmoins, la majeure partie du BPA administrée par gavage est retrouvée dans les intestins et leur contenu (Miyakoda et al., 2000, Snyder et al., 2000).

Le BPA subit un effet de premier passage hépatique. La métabolisation du BPA (100 mg/kg p.o.) chez les rates F344 et CD en gestation donne majoritairement du BPA monoglucuroconjugué (> 80 % après 24 h) dans les urines, tandis que c'est principalement le BPA inchangé qui est retrouvé dans les fécès. Le BPA glucuroconjugué est également le métabolite majoritaire dans le plasma et le lait de ces rates, dès 1 h après le gavage (Snyder et al., 2000). L'injection sous cutanée de 25 µg/kg de BPA à des souris CD-1 a montré que les voies de biotransformations du BPA étaient plus complexes, avec la formation majoritaire de BPA monoglucuroconjugué, mais aussi de BPA sulfate, de diconjugués, de diconjugués méthoxylés et/ou déshydratés et d'hydroxy-BPA retrouvés dans les urines et/ou les fécès (Zalko et al., 2003). Le métabolisme du BPA a été exploré à l'aide de cultures primaires d'hépatocytes de rates Wistar (Elsby et al., 2001). L'incubation de 100 et 500 µM de BPA pendant 2 h a mené à la formation de BPA glucuroconjugué (métabolite majoritaire), mais aussi de BPA sulfate et de 5-hydroxy-BPA à la concentration la plus élevée. La formation de BPA conjugué au sulfate et conjugué à la fois au sulfate et à l'acide glucuronique après incubation avec des hépatocytes humains, de rat et de souris a été rapportée (Nakagawa and Suzuki, 2001, Pritchett et al., 2002). L'incubation de BPA à la concentration de 200 µM avec des microsomes d'origine humaine ou murine indique la formation de 5-hydroxy-BPA (Elsby et al., 2001). L'incubation de BPA à la concentration de 100 µM pendant 2h avec des

microsomes de foie de souris CD-1 a permis l'identification d'un grand nombre de métabolites, certains issus du clivage du BPA (phénol + glutathion, isopropylphénol, isopropylephénol + glutathion, 2,2-bis-(4-hydroxyphényl)1-propanol, BPA+glutathion, 5-OH-BPA) (Jaeg et al., 2004). La vitesse moyenne de glucuronidation (V_{max}) du BPA par les microsomes humains est de 5,9 et 5,2 nmol/min/mg de protéines respectivement chez l'homme et la femme. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative dans les capacités métaboliques vis-à-vis du BPA observées *in vitro* entre les microsomes de foie d'homme et de femme. Selon cette même étude, la conjugaison du BPA à l'acide glucuronique serait plus rapide dans les microsomes de foie de rates en gestation ($V_{max} = 31,6$ nmol/min/mg). Enfin, la bisphénol-O-quinone pourrait être formée *in vivo* par un ou plusieurs CYP et former des adduits à l'ADN (Atkinson and Roy, 1995a, Atkinson and Roy, 1995b).

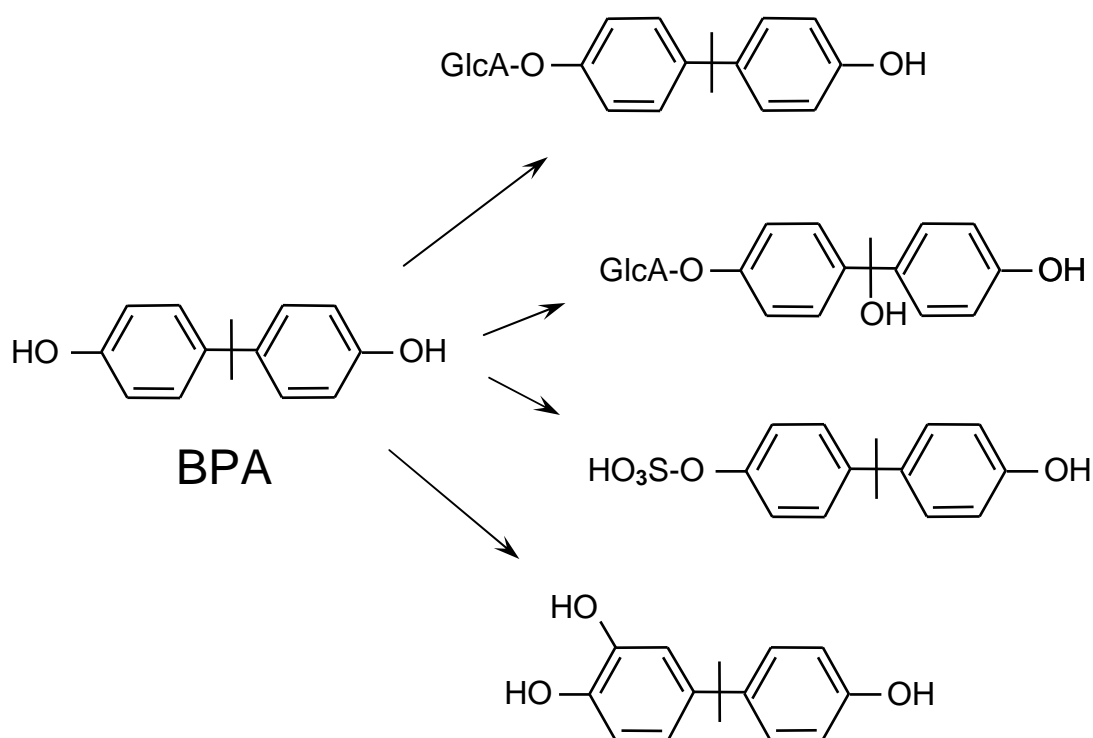


Fig.13 : voies métaboliques majeures du BPA identifiées à la fois *in vivo* et *in vitro* chez le rat et la souris. GlcA=acide glucuronique.

5-6-2 Toxicité aiguë.

La toxicité par inhalation est considérée comme relativement faible chez le rat, où la CL_{50} est supérieure à 170 mg/m³ (Nitshke et al., 1985a cité dans EU risk assessment report, 2003).

La DL₅₀ par voie orale se situe entre 3,3 g/kg et 5 g/kg chez le rat, avec une sensibilité plus grande des femelles. Les valeurs sont sensiblement les mêmes chez la souris et le lapin, indiquant une faible toxicité aiguë du BPA.

La toxicité aiguë par voie dermique a été évaluée chez le lapin. Elle semble faible, avec une DL₅₀ > à 2 g/kg.

5-6-3 Toxicité subaiguë, subchronique et chronique.

Une étude d'inhalations répétées chez le rat a révélé une légère inflammation de l'épithélium du tractus respiratoire supérieur, avec une NOAEL mesurée de 10 mg/m³ (Nitshke et al., 1985b cité dans EU risk assessment report, 2003).

Takahashi et Oishi (2001) ont observé une perte de poids de rats mâles F344 exposés à 466 et 950 mg/kg/jour pendant 44 jours via l'alimentation. Ils ont relevé une baisse du poids du foie, de la prostate et des glandes séminales, en particulier pour la plus forte dose. Une NOAEL de 74 mg/kg a été établie à partir d'une étude de deux ans chez le rat (EU risk assessment report, 2003).

Les études d'exposition via l'alimentation chez la souris indiquent que le foie est une cible chez cette espèce, avec en particulier des changements dans la taille et le noyau des hépatocytes lors des études 90 jours et 2 ans. L'incidence et l'importance de ces hépatocytes hypertrophiés et multinucléés étaient plus importantes chez les mâles (LOAEL de 120 mg/kg) que chez les femelles (650 mg/kg) (EU risk assessment report, 2003).

5-6-4 Génotoxicité et mutagénicité.

Le BPA, jusqu'aux plus fortes doses testées (500 µg/ml), n'entraîne pas la formation de révertants dans le test d'Ames mené sur *Salmonella typhimurium* (Schweikl et al., 1998). Il a été observé que le BPA provoque une aneuploïdie sans activation métabolique après incubation avec des cellules de hamster chinois V79 (Ochi, 1999, Pfeiffer et al., 1997), et dans une expérience d'aneuploïdie non conventionnelle utilisant des cellules d'embryon de hamster syrien en culture (Tsutsui et al., 1998), probablement par perturbation de la formation des microtubules (Pfeiffer et al., 1997). Atkinson et Roy (1995a et b) ont détecté la formation de plusieurs adduits après incubation pendant 2 h de BPA avec de l'ADN de rat purifié en présence d'un système d'activation peroxydase. La formation de ces adduits était inhibée par la présence d'inhibiteurs des CYP. Néanmoins, le BPA ne semble pas provoquer de mutations de l'ADN ni d'aberrations chromosomiques dans des cellules de mammifères en culture (EU

risk assessment report, 2003). *In vivo*, le BPA provoque la formation d'adduits dans les foies de rats traités par voie orale (200 mg/kg/jour) (Atkinson et Roy, 1995a).

5-6-5 Cancérogénicité.

In vivo, le BPA administré dans l'aliment (0, 74 et 135 à 148 mg/kg/j) chez des rats F344 n'a pas provoqué de hausse significative de l'incidence de tumeurs. De même, le BPA administré via l'alimentation (120 et 600 mg/kg/j chez les mâles et 650 et 1300 mg/kg/j chez les femelles) n'a eu aucun effet significatif sur l'incidence de tumeurs chez les souris B6C3F1 (NTP, 1982 cité dans EU risk assessment report, 2003). Néanmoins, une dose de 10 µg/kg/j administrée à des rats Sprague-Dawley par voie sous-cutanée entre les 1^{er} et 5^{ème} jours après la naissance a provoqué la formation de lésions néoplasiques interépithéliales de la prostate chez tous les mâles à l'âge adulte, ces lésions étant considérées comme précancéreuses (Ho et al., 2006). De même, l'administration de BPA à une dose de 2,5 µg/kg p.c./j à des rates en gestation est à l'origine de la formation de lésions préneoplasiques et néoplasiques au niveau des glandes mammaires chez les rates exposées *in utero* (Murray et al., 2007).

5-6-6 Reprotoxicité et embryotoxicité.

L'administration par voie orale ou sous-cutanée de 10 µg/kg/j de BPA à des souris femelles n'affecte pas l'implantation des embryons. Cette dernière n'est significativement diminuée qu'à la dose de 70 mg/kg/j (Berger et al., 2007).

Certains effets négatifs sur la fertilité chez le rat et la souris ont été relevés lors d'études multigénérationnelles. Ainsi, lors d'une étude menée avec des rats Sprague-Dawley, seule la plus forte (500 mg/kg/j p.o.) dose a entraîné une diminution du nombre de nouveau-nés à chaque mise-bas. Une NOAEL de 50 mg/kg/j a été avancée chez le rat concernant les effets sur la fertilité. La LOAEL chez le rat pourrait être de 500 mg/kg, et 300mg/kg chez la souris (EU risk assessment report, 2003). Aucun effet sur le développement des embryons et des nouveaux nés n'a été relevé d'après les tests standards chez le rat et la souris (NOAEL de 640 mg/kg/j et 1000 mg/kg/j chez les fœtus respectivement de rat et de souris).

5-6-7 Perturbation endocrinienne.

5-6-7-1 Effets estrogéniques.

In vitro

Le BPA présente une activité estrogénique passant par l'activation des récepteurs aux estrogènes dans différents tests *in vitro*. Ainsi, le BPA montre une activité estrogénique 10 000 fois moindre que l'E₂ dans les systèmes utilisant des levures recombinantes (Coldham et al., 1997, Sohoni and Sumpter, 1998). Le BPA entre en compétition avec l' [³H]E₂ pour la liaison à l'ER α et l'ER β avec une affinité 10 000 fois plus faible que l'E₂ et induit une activité de gènes rapporteurs médiée par les deux récepteurs (Kuiper et al., 1998, Matthews et al., 2001). Le BPA déplace l'E₂ lié au ER α avec une CI₅₀ de 10⁻⁵ M (Nakagawa and Suzuki, 2001). Dans des cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 transfectées avec soit ER α soit ER β et un plasmide de réponse codant pour l'activité luciférase, le BPA a montré une CE₅₀ de 6,4.10⁻⁷ M vis-à-vis de l'ER α et 8,9.10⁻⁷ M vis-à-vis de l'ER β (respectivement 1,9.10⁻⁹ et 1.10⁻⁸ M pour l'E₂) tandis qu'aucune expression significative médiée par l'un ou l'autre des récepteurs n'était observée avec le BPA glucuroconjugué (Snyder et al., 2000). Le BPA induit également une prolifération des cellules MCF7 (Coldham et al., 1997, Dodge et al., 1996, Krishnan et al., 1993, Soto et al., 1995) ainsi que le 3-OH-BPA, à des concentrations de 10⁻⁷ à 10⁻⁶ M (Nakagawa and Suzuki, 2001). L'hydroxytamoxifène, un antagoniste des estrogènes agissant au niveau de leurs récepteurs, inhibe la prolifération des cellules MCF7 induite par le BPA (Olea et al., 1996).

In vivo

L'activité estrogénique du BPA a été évaluée dans de nombreuses études *in vivo* utilisant généralement le test utéroprophique chez le rat. Par exemple, (Ashby and Tinwell, 1998) ont observé que des rates Alpk :AP immatures recevant par gavage 400, 600 ou 800 mg/kg de BPA pendant trois jours montraient une hausse du poids sec de l'utérus de 40 à 150 %. Le test utéroprophique ne répond généralement pas aux faibles doses de BPA (inférieures à 50 mg/kg/j) (Richter et al., 2007), néanmoins, il a pu être relevé une hausse statistiquement significative du poids de l'utérus chez des rates Sprague-Dawley ovariectomisées ayant reçu 10 et 40 mg/kg/j pendant 4 jours par gavage (Dodge et al., 1996).

Un certain nombre de résultats expérimentaux indiquent chez la souris adulte que l'E₂, en agissant sur l'ER α , inhibe le nombre d'adipocytes ainsi que de la lipogenèse. Le retrait des estrogènes par ovariectomie ou une mutation d'ER α provoque une intolérance au glucose et

une résistance à l'insuline en plus d'augmenter la masse corporelle (Cooke et al., 2001, Heine et al., 2000). Or, il a été rapporté que le BPA diminuait le poids des souris (Al-Hiyasat et al., 2002, Nunez et al., 2001). En outre, de très faibles doses de BPA stimulent la sécrétion rapide d'insuline par les cellules β pancréatiques de souris en culture via un système de réponse aux estrogènes non classique et non génomique (Alonso-Magdalena et al., 2006). Les mêmes auteurs ont observé qu'une exposition prolongée à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ par voie orale provoquait une stimulation de la sécrétion d'insuline chez la souris adulte contrôlée classiquement par les récepteurs nucléaires. La sécrétion prolongée d'insuline était suivie d'une insulino-résistance.

5-6-7-2 Effets antiandrogéniques.

Dans une expérimentation utilisant une souche de levure contenant un système d'expression codant pour la β -galactosidase inducible par les androgènes, le BPA s'est montré pratiquement aussi puissant que l'anti-androgène flutamide dans l'inhibition de l'activité de la dihydrotestostérone (Sohoni and Sumpter, 1998). Des tests de compétition de liaison à l'AR ont montré que 50 nM de BPA inhibaient au maximum la liaison de [^3H]5 α -dihydrotestostérone de 40 % (Lee et al., 2003). La même équipe a évalué, à l'aide d'un système de levure hybride reflétant l'interaction entre l'AR et son coactivateur (ARSC1 : « ARhLBD-activating signal cointegrator 1 »), que le BPA agissait comme antagoniste de l'AR de façon aussi forte que l'acétate de ciproterone (antagoniste puissant de l'AR). Dans la même étude, il est démontré que le BPA diminue la translocation de l'AR vers le noyau à l'aide d'une protéine de fusion (GFP)-AR. Enfin, dans des essais de transfection transitoire, le BPA inhibe l'activité transcriptionnelle induite par l'activation de l'AR par un androgène (Lee et al., 2003).

5-6-7-3 Effets à faibles doses *in vivo*.

Des dizaines d'études rapportent des effets significatifs du BPA chez les rongeurs à des faibles doses, c'est-à-dire inférieures à la LOAEL de 50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ (vom Saal and Hughes, 2005).

Le BPA administré à 25 et 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ augmente le nombre d'ER α et β dans différentes aires du cerveau chez des rats mâles Wistar exposés depuis le 8^{ème} jour de gestation jusqu'à la naissance (Ramos et al., 2003). Des modifications induites par le BPA ont été observées dans les fonctions de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades chez les rats mâles et femelles. Ainsi, des nouveau-nés femelles exposées pendant la gestation et l'allaitement à 1,2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ de BPA ont montré un cycle de l'oestrus perturbé et prolongé

(Rubin et al., 2001). Des altérations de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde ont également été rapportées. L'exposition de rats Sprague-Dawley par voie orale à des doses de 1, 10 ou 50 mg/kg/j du 6^{ème} jour de gestation jusqu'au sevrage a provoqué une hausse significative en T4 sérique (Zoeller, 2005). En outre, des effets des faibles doses de BPA sur les structures du cerveau dépendant du sexe ont été observées chez les souris CD-1 (Rubin et al., 2006).

La concentration en testostérone testiculaire chez des rats mâles Long-Evans a été diminuée par l'administration par voie alimentaire de 2,4 µg/kg pc/j de BPA à la mère depuis le 12^{ème} jour de gestation jusqu'au sevrage, sans qu'une baisse des taux de LH sérique soit observée (Akingbemi et al., 2004). De même, l'administration à des souris CD-1 en gestation de 2 µg/kg pc/j de BPA via l'alimentation, entre les 11^{ème} et 17^{ème} jours de gestation, provoque une diminution de la testostérone sérique chez les mâles exposés *in utero* (Kawai et al., 2003). Enfin, le traitement de rats mâles Sprague-Dawley par voie orale pendant leur puberté (du 23^{ème} au 30^{ème} jours après la naissance) par 40 µg/kg/j de BPA diminue la testostérone de façon persistante, même à l'âge adulte (Della Seta et al., 2006).

Le BPA provoque également une hausse du poids de la prostate et du nombre d'AR prostatiques chez la souris adulte lorsqu'une exposition à de faibles doses a lieu *in utero* (Gupta, 2000, vom Saal et al., 1998). Des souris CF-1 mâles exposées *in utero* au BPA (mère en gestation consommant 2 µg/kg/j de BPA) ont montré une diminution du poids de l'épididyme et des glandes séminales, une hausse des glandes préputiales et de la prostate. Une dose de 20 µg/kg/j a provoqué chez ces souris une diminution de la production journalière de sperme, exprimée par gramme de testicule (vom Saal et al., 1998). Il a été observé que l'exposition par voie orale de rats mâles Sprague-Dawley à des doses allant de 20 µg/kg/j à 200 mg/kg/j provoque une diminution significative de la production journalière de sperme, la diminution maximale (environ 40 %) étant observée dans le groupe exposé à la plus faible dose de BPA (Sakaue et al., 2001). De même, l'exposition de souris adultes à 25 ou 100 µg/kg/j pendant un mois a provoqué une diminution de la production journalière de sperme associée à une diminution de la fertilité tandis qu'une dose de 5 µg/kg/j diminue le poids des testicules et des vésicules séminales (Al-Hiyasat et al., 2002).

Enfin, le développement des glandes mammaires est modifié par une exposition périnatale à de faibles doses de BPA chez la souris (Maffini et al., 2006, Markey et al., 2001, Munoz-de-Toro et al., 2005) et chez le rat (Murray et al., 2007). Un accroissement significatif ($P < 0,05$) du nombre et de l'extension des canaux galactophores a été observé chez des souris CD-1 de 6 mois exposées *in utero* à partir du 9^{ème} jour de gestation au BPA (25 et 250 µg/kg p.c. de la souris en gestation/j). L'apparence des glandes mammaires de ces souris vierges est

identique à celle de souris en début de gestation (Markey et al., 2001). Une exposition fœtale à 2,5 µg /kg p.c./j provoque une hyperplasie des canaux galactophore des rates âgées de 50 et 95 jours (Murray et al., 2007).

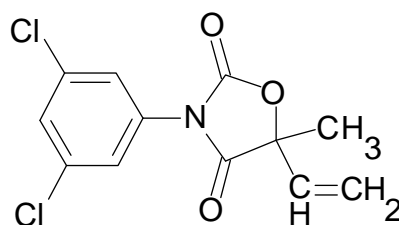
5-6-7-4 Autres effets.

Le BPA se lie au récepteur aux hormones thyroïdiennes et inhibe l'action de la T3 (Moriyama et al., 2002, Zoeller, 2005) avec un K_i d'environ 10^{-4} M mais inhibe significativement l'expression de gènes sous le contrôle du récepteur thyroïdien dès 10^{-6} M.

Le BPA modulerait certaines fonctions immunitaires à des doses comprises entre 2,5 et 30 µg/kg/jour, incluant la production de cytokines et d'anticorps, la réponse à une infection et l'évolution de maladies autoimmunes chez la souris (Richter et al., 2007, Sawai et al., 2003, Yoshino et al., 2003).

Enfin, le BPA induirait l'expression de l'Ahr, de l'Arnt (AhR nuclear translocator), et d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques (CYP1A1, UGT et GST) chez la souris ICR après exposition *in utero* à des doses pour la mère allant de 0,02 à 20000 µg/kg/j (Nishizawa et al., 2005). (Hanioka et al., 1998) ont observé que l'administration par voie i.p. de BPA à des rats à des doses de 20 et 40 mg/kg diminuait la concentration en CYP2C11 et 3A2 (respectivement testostérone 2 α -hydroxylase et 6 β -hydroxylase) dans les microsomes de foie préparés après traitement. Ces auteurs ont également observé que l'expression des CYP4A1 et 2 était augmenté. (Niwa et al., 2001) ont en revanche mis en évidence une inhibition du CYP17, alors que (Pfeiffer and Metzler, 2004) ont montré une inhibition du CYP2C11 mais pas du 3A4.

6- la vinchlozoline.



Vinchlozoline

Fig.14 : structure chimique de la vinchlozoline

6-1 Propriétés physiques et chimiques.

La vinchlozoline (3-(3, 5-dichlorophenyl)-5-ethenyl-5-methyl-2,4-oxazolidinedione) est un solide cristallin blanc et sans odeur à température ambiante, très faiblement soluble dans l'eau.

Tableau n°5 : Propriétés physiques et chimiques de la vinchlozoline

Paramètre	Valeur
No. CAS	50471-44-8
Poids moléculaire	268,1 g/mol
Formule brute	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃
Densité spécifique	1,51 g/cm ³
Point de fusion	Entre 108°C
Point d'ébullition	131°C à 0,05 mm Hg
Solubilité dans l'eau	2,6 mg/l à 20°C
Log K _{ow}	3

6-2 Usages.

La vinchlozoline est un fongicide dicarboximide d'usage non systémique à action protectrice commercialisé par BASF AG sous le nom de Ronilan[®]. Elle prévient la germination des spores de *Botrytis* et *Sclerotinia* spp. sur les vignes, les graines de colza, les fruits et légumes et les plantes d'agrément, *Monilia* spp. sur certains fruits dont les fruits à noyau, *Sclerotinia*, *Helminthosporium* et *Corticium* spp. sur le gazon. Le Journal Officiel du 24 mars 2007 indique que « la date limite d'écoulement des stocks et d'utilisation des produits phytopharmaceutiques contenant de la vinchlozoline est fixée au 30 juin 2007 pour la distribution et au 31 décembre 2007 pour l'utilisation ».

6-3 Devenir de la vinchlozoline dans l'environnement.

6-3-1 Hydrolyse.

La vinchlozoline est instable en milieu aqueux où elle s'hydrolyse pour donner deux produits de dégradation par ouverture de l'hétérocycle. La formation de l'acide 2-[[[3,5-

dichlorophényl)carbamoyle]oxy]-2-méthyl-3-buténoïque, appelé M1, est réversible tandis que la formation du 3',5'-dichloro-2-hydroxy-2-méthylbut-3-énanilide, appelé M2, ne l'est pas (fig.15). Le produit de dégradation final de la vinchlozoline dans l'eau est la 3,5-dichloroaniline (M3) (Szeto et al., 1989). A pH basique, la réaction menant à M1 est favorisée, tandis qu'à pH acide, c'est la production de M2 qui l'est. Les facteurs accélérant l'hydrolyse de la vinchlozoline sont la température et un pH basique. Ainsi à une température de 35°C, à pH 7,5 la demi-vie de la vinchlozoline est de 2,8 heures, tandis qu'à pH 4,5 elle est supérieure à 500 heures (Szeto et al., 1989).

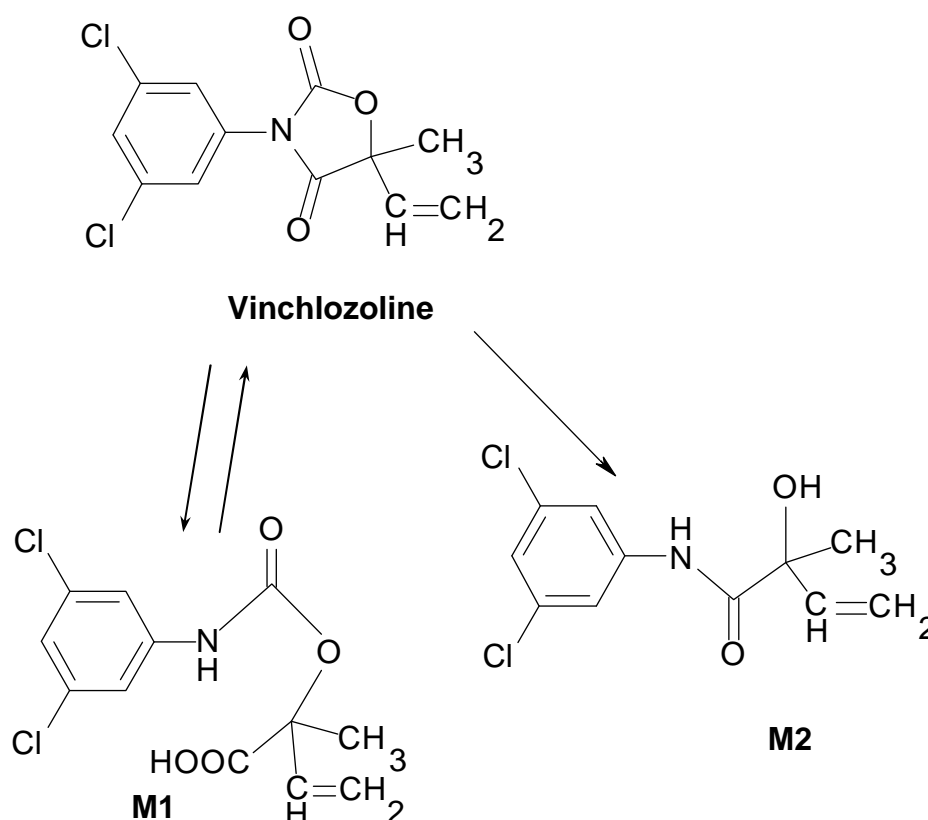


Fig.15 : schéma d'hydrolyse de la vinchlozoline en milieu aqueux (Szeto et al., 1989)

6-3-2 Photodégradation.

La vinchlozoline et M2 dissous dans l'eau peuvent subir une photodégradation s'ils sont exposés à la lumière du soleil, donnant en particulier la 3,5-dichloroaniline et du 3,5-dichlorophényl isocyanate. Environ 10 % de la vinchlozoline est dégradée après une exposition aux UV ($\lambda \geq 290$ nm) pendant 8 h (Schick et al., 1999).

6-3-3 Biodégradation.

Une perte d'efficacité de la vinchlozoline a été constatée après des traitements successifs sur un même sol, phénomène lié à une dégradation microbienne accrue (Mercadier et al., 1998, Mitchell and Cain, 1996). Ainsi, la demie-vie mesurée de la vinchlozoline dans un sol jamais traité précédemment, est de 22 jours après le premier traitement, et seulement 2,15 heures après le 6^{ème} (10 mg de vinchlozoline par kg de sol sec, 20 % d'humidité, à 28°C) (Mercadier et al., 1998). Le produit de dégradation final obtenu est la 3,5-dichloroaniline. M3 était retrouvé avec M1 après le premier traitement, tandis qu'il était retrouvé avec M2 après les traitements successifs.

6-4 Sources et voies d'exposition de l'Homme.

L'exposition de l'homme à la vinchlozoline est avant tout professionnelle. Chez les ouvriers agricoles travaillant sous serre et utilisant de la vinchlozoline, l'exposition a été évaluée à 25 mg après 8 h de travail, et l'exposition dermique à 2,5 mg/jour, cette valeur étant supérieure aux limites autorisées aux USA ou dans l'UE (Nilsson and Papantoni, 1996). La concentration en vinchlozoline non métabolisée dans les urines de deux opérateurs sous serre a été évaluée à 64,4 ng/ml (Carlucci et al., 2005). L'évaluation de l'exposition de 67 ouvriers travaillant dans la synthèse et la formulation de la vinchlozoline conduit à des valeurs supérieures à 25 µg/kg pc/jour (Watson, 1995). Les résidus de traitements phytosanitaires des fruits et légumes constituent la principale voie de contamination des consommateurs.

6-5 Données toxicologiques.

6-5-1 Absorption, distribution, métabolisme, élimination.

Chez les rats traités par voie orale par la [U-¹⁴C-phenyl]-vinchlozoline administrée pendant 7 jours à une dose de 40 mg/kg pc/j, une moyenne de 47 % de la quantité totale administrée a été éliminée par voie urinaire et 54 % dans les fèces six jours après la dernière dose. Aucune radioactivité n'a été détectée dans la carcasse ou dans l'air expiré à ce moment là. La canulation du canal cholédoque après une prise orale unique a montré une excrétion de 65 % de la radioactivité administrée dans la bile, 19 % dans l'urine et 15 % dans les fèces. Le pic plasmatique a été détecté après environ 1 h et la demi-vie plasmatique était de 20 h. Après 7 doses, les concentrations les plus élevées en radioactivité ont été détectées dans le foie, les

reins, le tractus gastrointestinal, la graisse, les glandes surrénales et les ovaires (Watson, 1995).

6-5-2 Toxicité aigüe.

La DL₅₀ aigüe par voie orale chez le rat est supérieure à 10000 mg/kg, et d'environ 8000 mg/kg chez le cobaye. La vinchlozoline est un irritant modéré de la peau, des voies aériennes supérieures et des yeux (Kidd et al., 1991).

6-5-3 Toxicité subaigüe, subchronique, et chronique.

Lors d'expérimentations de 2 à 3 mois avec différentes souches de souris consommant de la nourriture traitée avec 100 à 5000 ppm de vinchlozoline, la NOAEL était équivalente à 20 mg/kg pc/j, sur la base des signes en rapport avec les effets anti-androgéniques, des signes d'hépatotoxicité, et des changements touchant les surrénales. Chez le rat, des atteintes des glandes surrénales ont été observées dès la dose de 4 mg/kg pc/j (NOAEL) pendant trois mois. Chez le chien, une hausse du poids des glandes surrénales chez les mâles et les femelles a été provoquée par une exposition à 7,5 mg/kg/j p.o. et les mâles avaient une hypertrophie de la prostate. La NOAEL relevée était de 2,4 mg/kg pc/j d'après les changements histopathologiques touchant le foie, la prostate, les testicules ou les glandes surrénales.

Les études multigénérationnelles chez le rat ont montré que la vinchlozoline provoquait une infertilité des males, du fait de la féminisation des organes génitaux externes, lors de l'exposition par l'alimentation à des doses de 1000 ppm ou plus. A 300 ppm, les rats males avaient une fertilité inférieure à la normale. A 50 ppm, le seul effet délétère relevé était une diminution du poids de l'épididyme chez les nouveaux-nés de la génération F₂, conduisant à une NOAEC de 40 ppm, soit une NOAEL d'environ 4 mg/kg pc/j. Ces problèmes de fertilité seraient liés aux effets transgénérationnels de la vinchlozoline via un mécanisme épigénétique, transmissible par les mâles uniquement (Anway et al., 2006).

6-5-4 Reprotoxicité et embryotoxicité.

Chez les rats, l'indicateur le plus sensible de tératogénicité est une réduction de la distance anogénitale. La NOAEL déterminée à partir de cet effet est de 15 mg/kg pc/j. La NOAEL pour la fœtotoxicité est d'environ 100 mg/kg pc/j, d'après les signes de retard du développement.

6-5-5 Mutagénicité, génotoxicité.

La vinchlozoline administrée chez la souris à des doses de 312.5 à 1250 mg/kg provoque une augmentation significative des érythrocytes micronucléés trouvés dans la moelle osseuse. Par ailleurs, la morphologie des micronoyaux formés indiquent un mode d'action à prédominance clastogénique (Hrelia et al., 1996). Néanmoins, ces résultats ont été contredits par ailleurs (Kevekordes et al., 1996) et le test d'Ames s'est révélé négatif (IPCS, 1995).

6-5-6 Carcinogénicité.

L'étude de carcinogénicité chez les souris C57Bl/6 exposées via l'alimentation à des doses de 0, 15, 150, 3000, ou 8000 ppm, a permis de mettre en évidence des carcinomes hépatocellulaires à la plus forte dose. Des effets toxiques (hépatotoxicité et hyperplasie des cellules de Leydig) ont été relevés à partir de 3000 ppm. La NOAEC est de 150 ppm, soit une NOAEL de 24 mg/kg pc/j. Une exposition *in utero* lors de la formation des gonades chez le rat (génération F1) a provoqué l'apparition de tumeurs au niveau des glandes mammaires chez les rates des générations F1 à F4 (Anway et al., 2006).

6-5-7 Propriétés antiandrogéniques.

M1 et plus particulièrement M2 sont responsables de l'activité antiandrogénique imputable à une exposition à la vinchlozoline. Ce sont en effet, *in vitro* et *in vivo*, des inhibiteurs compétitifs des androgènes au niveau de l'AR humain ($K_i > 700 \mu\text{M}$ pour la vinchlozoline, $92 \mu\text{M}$ pour M1 et $9,7 \mu\text{M}$ pour M2) et des inhibiteurs de l'expression de gènes induite par les androgènes (Kelce et al., 1997, Kelce et al., 1994). D'après les résultats de tests basés sur l'emploi de cellules MCF7 transfectées de façon stable avec l'AR et sur l'emploi de gènes rapporteurs (activité luciférase) exprimé dans des cellules d'adénocarcinome de la prostate humaine (PC-3) ou d'ovaire de hamster chinois, les concentrations inhibitrices médianes (CI_{50}) de la vinchlozoline sont comprises entre $1,1 \cdot 10^{-7}$ et $4,7 \cdot 10^{-7}$ M (Korner et al., 2004).

Les rats nouveaux nés exposés *in utero* à la vinchlozoline pendant la période de différenciation sexuelle présentent un phénotype féminisé (distance ano-génitale réduite, tétons, hypospadias, testicules topiques suprainguinaux, poche vaginale fermée) (Gray et al., 1994). En outre, chez l'adulte, le poids de la prostate ventrale est réduit en permanence dès 6,5 mg/kg/j et les tétons féminisés sont permanents (Gray et al., 1999). Une administration

péribubertaire par voie orale de vinchlozoline à 10, 30 et 100 mg/kg/j provoque un retard de la puberté et une réduction des glandes sexuelles accessoires et de la croissance de l'épididyme (à 30 et 100 mg/kg/j) ainsi qu'une hausse de la LH sérique à toutes les concentrations (Monosson et al., 1999). Enfin, le test Hershberger de 10 jour chez le rat Sprague-Dawley castré a montré que la vinchlozoline à 50 et 100 mg/kg/j inhibait l'activité androgénique de la testostérone (0,4 mg/kg/j) diminuant la croissance des tissus dépendant des androgènes (prostate ventrale, glandes séminales, muscle levator anibulbocavernosus) par rapport aux contrôles ne recevant que la testostérone (Kang et al., 2004).

Chez les guppies (*Poecilia reticulata*), la vinchlozoline entraîne une démasculinisation (réduction de la coloration orange, inhibition du développement du gonopodium, réduction du nombre de spermatozoïdes et suppression du comportement de cour) (Bayley et al., 2002). Une modification du sexe ratio en faveur des femelles, ainsi qu'une maturation des mâles retardée et une diminution de leur fertilité (Bayley et al., 2003). Une concentration de 5 mg/L de la formulation Ronilan[®], équivalent à 2,5 mg/L de vinchlozoline, a provoqué une faible incidence d'intersex ainsi que des troubles de la spermatogénèse chez le medaka japonais (*Oryzias latipes*) (Kiparissis et al., 2003).

Enfin, il a été observé que la vinchlozoline induisait les CYP1A2 et 2B10 chez la souris CD-1 mâle adulte après administration de 160 mg/kg/jour par gavage pendant 21 jours. Chez ces souris traitées, une augmentation de la métabolisation de la testostérone a été provoquée par le traitement décrit précédemment (Dai et al., 2001).

7 Présentation et objectifs de la thèse.

Cette thèse s'est inscrite dans le cadre des projets menés par le réseau européen CASCADE (Chemicals as contaminants in food chain : an NoE for research, risk assessment and education) qui a financé une partie de ce travail. L'un des objectifs du réseau est de fournir aux consommateurs européens une information fiable sur les risques pour la santé associés à une exposition à des contaminants alimentaires perturbateurs endocriniens. Trois molécules connues pour être des PE ont été sélectionnées comme modèles pour l'ensemble des études menées au sein du réseau : le bisphénol-A, la génistéine et la vinchlozoline. Les études de leurs propriétés sont réalisées grâce à un certain nombre de modèles *in vitro* et *in vivo*, développés pour explorer leurs mécanismes d'action ou pour faire le screening des contaminants alimentaires.

Afin d'interpréter au mieux les résultats obtenus avec ces modèles, il est important de connaître le devenir des molécules testées et de caractériser les capacités de ces systèmes biologiques à métaboliser les composés testés puisque la nature des métabolites formés et leurs cinétiques de formation influent sur l'activité observée. En effet, si la biotransformation conduit pour la majorité des xénobiotiques à une détoxification et une élimination de la molécule, certaines réactions peuvent, au contraire, mener à la production de métabolites plus actifs que le composé parent. Les réactions biochimiques de phase I et de phase II mises en jeu dans cette biotransformation augmentent pour la plupart d'entre elles l'hydrophilie de la molécule et facilitent ainsi son excrétion. Ces modifications de la structure moléculaire sont le plus souvent responsables d'une perte d'activité du xénobiotique. Cependant, certaines réactions de phase I telles que l'hydroxylation n'altèrent pas toujours voire augmentent même l'activité du composé. Ainsi, suivant le devenir de la molécule testée au sein d'un système biologique, ce dernier pourra provoquer une surestimation de l'activité d'un xénobiotique s'il est activé, ou au contraire une sous-estimation de son activité si les réactions de biotransformations mènent à la production de métabolites inactifs.

Le premier objectif du travail présenté dans ce manuscrit a été de compléter les connaissances des voies de biotransformation de la génistéine et de la vinchlozoline dans le but de développer une vision intégrée des voies de biotransformation entre l'*in vitro* et l'*in vivo*. Il a été considéré que les données de la littérature étaient suffisantes pour le BPA, ne justifiant pas d'études complémentaires pour ce contaminant.

La génistéine est une molécule dont les voies de biotransformation *in vivo* chez le rat mais aussi chez l'homme sont bien décrites et pour laquelle des données épidémiologiques existent. Nous avons néanmoins dû compléter les connaissances des voies de biotransformation *in vitro* de ce phytoestrogène. Pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles de référence, les microsomes et les hépatocytes cryoconservés et nous avons ainsi établi les différences et les similitudes entre le rat et l'homme dans les voies de biotransformation de cette molécule.

Les données publiées sur la biotransformation de la vinchlozoline étant particulièrement succinctes, nous avons ensuite exploré les voies métaboliques de ce fongicide chez le rat Wistar *in vitro* en utilisant les tranches de foie, ce qui nous a permis d'identifier les principaux métabolites produits et de déterminer leurs cinétiques de formation. Nous avons complété les observations faites en explorant ces voies de biotransformation *in*

vivo en utilisant l'urine de rats Wistar mâles, mais aussi de rates Wistar en gestation, exposés par gavage.

Le second objectif de ce travail de thèse a été de caractériser les capacités métaboliques de différentes lignées cellulaires fréquemment utilisées dans l'étude des propriétés des PE et de leur « screening ». Ces modèles cellulaires sont bien maîtrisés au sein du réseau Cascade, en particulier les cellules MCF7 (tumeur de glande mammaire humaine) et les cellules HepG2 (carcinome de foie humain). Nous avons étendu ce travail aux cellules HC11 (lignée cellulaire non cancéreuse de glande mammaire de souris) pour leurs propriétés qui en font une lignée d'origine murine intéressante dans l'étude et le screening des PE. Nous avons poursuivi cet objectif en identifiant les métabolites de la génistéine, du BPA et de la vinchlozoline et en calculant leurs cinétiques de formation au sein de ces cellules. Afin d'établir des comparaisons et de disposer d'un modèle de référence en matière de biotransformation *in vitro*, nous avons mené parallèlement aux études sur lignées cellulaires des travaux sur tranches de foie de rat Wistar.

Afin de réaliser ces objectifs, nous avons dû adapter les méthodes séparatives en CLHP pour chacune des molécules. Dans le but de faciliter l'identification des principaux métabolites de la génistéine et du BPA, nous avons également mis en place des méthodes principalement biochimiques afin de produire des standards conjugués. Nous avons adapté les protocoles d'incubation de chacune des molécules dans les différents systèmes *in vitro* employés afin de permettre le calcul des cinétiques de production des métabolites majeurs. Bon nombre d'expérimentations ont été réalisées en collaboration avec les partenaires du réseau CASCADE, en particuliers Nicolas Olea du Laboratoire de recherche médicale de l'Université de Grenade (Espagne) pour les cellules MCF7, et Ingemar Pongratz, du département de Biosciences et de Nutrition de l'Institut Karolinska (Stockholm, Suède), pour les cellules HepG2 et HC11. L'identification des structures par spectrométrie de masse et/ou RMN a été possible grâce à l'équipement dont dispose mon laboratoire d'accueil et aux compétences des ingénieurs chargés de ces approches.

RESULTATS

Chapitre 1 :
Biotransformation de la génistéine et de la
vinchlozoline

1 Introduction.

Le but des expérimentations présentées dans ce chapitre est d'une part d'étendre les connaissances des voies de biotransformation de la génistéine et de la vinchlozoline et d'autre part d'appréhender les extrapolations animal-homme et *in vitro-in vivo* en matière de métabolisme.

1-1 Génistéine.

Un rapport récent a conclu que la génistéine présentait une toxicité négligeable sur les fonctions de la reproduction et sur le développement au niveau de la population générale (Rozman et al., 2006) ; néanmoins, l'évaluation du rapport risque/bénéfice de la génistéine chez l'Homme n'est pas définitivement établi. Un grand nombre de données relatives à sa biotransformation était déjà disponible, que ce soit *in vitro*, en particulier à partir de microsomes (Breinholt et al., 2003, Kulling et al., 2001, Kulling et al., 2000, Kulling et al., 2002, Roberts-Kirchhoff et al., 1999), ou *in vivo* chez le rat et l'Homme (Clarke et al., 2002, Coldham et al., 1999, Coldham and Sauer, 2000, Doerge et al., 2000, Sfakianos et al., 1997, Shelnutt et al., 2002, Yasuda et al., 1996). En dépit de ces travaux, plusieurs voies métaboliques et capacités de biotransformations restaient à préciser, notamment chez l'Homme. Afin de disposer de ces informations, nous avons étudié le devenir de la [¹⁴C]-génistéine incubée avec des microsomes de foie et des hépatocytes cryopréservés d'urine humaine. En complément et afin de pouvoir comparer les données obtenues chez l'Homme et chez le rat, des expérimentations ont été réalisées à l'aide de tranches de foie de rats mâles Wistar, afin de vérifier l'identité et les proportions des métabolites de la génistéine produits par ce système. Chacun de ces modèles biologiques apporte en effet des informations complémentaires en matière d'enchaînement métabolique et de taux de biotransformations.

1-2 Vinchlozoline.

Bien que la vinchlozoline soit un fongicide dont l'usage sera interdit en France à partir du 31 décembre 2007, elle demeure une molécule modèle du fait de ses propriétés toxicologiques. En effet, ses deux produits de dégradation, M1 et M2, sont responsables de ses effets antiandrogéniques en inhibant de façon compétitive la liaison des androgènes à l'AR et l'expression des gènes normalement induite par les androgènes avec des K_i de 92 et

9,7 respectivement (Kelce et al., 1997, Kelce et al., 1994). En outre, il a été récemment démontré que la vinchlozoline administrée à des rates en gestation entraîne des effets transgénérationnels tels qu'une diminution de la fertilité, des atteintes de la prostate, des reins, du système immunitaire, de la spermatogenèse, ou encore le développement de tumeurs des glandes mammaires (Anway et al., 2005, Anway et al., 2006). L'incidence de ces pathologies transgénérationnelles est élevée, allant de 10% pour les tumeurs à plus de 50% pour les lésions prostatiques à chaque génération, depuis la première (F1) jusqu'à la 4^{ème} (F4). Ces effets transgénérationnels seraient transmis via des altérations épigénétiques impliquant une méthylation permanente de l'ADN des spermatozoïdes (Chang et al., 2006).

Les données publiées sur la biotransformation de la vinchlozoline sont peu nombreuses, une seule étude s'attachant à explorer la métabolisation de cette molécule chez le champignon *Cunninghamella elegans* (Pothuluri et al., 2000). Si aucune donnée publiée dans la littérature n'est disponible concernant le devenir de la vinchlozoline *in vivo*, quelques informations sur l'identité des métabolites formés chez le rat sont librement accessibles sur internet (Watson, 1995). Enfin, aucune étude n'a été publiée sur la biotransformation de la vinchlozoline dans des systèmes *in vitro* tels que les tranches de foie de rat.

Connaître le devenir de la vinchlozoline et de ses produits d'hydrolyse M1 et M2 chez le rat représente donc un intérêt certain si l'on veut mieux comprendre les processus impliqués dans les effets toxiques de cette molécule. Nous avons donc choisi en premier lieu d'explorer la biotransformation de la vinchlozoline dans les tranches de foie de rats Wistar mâles et de comparer ce profil métabolique avec celui obtenu *in vivo* à partir des urines de rats traités par ce même composé. En effet, la validité d'un modèle *in vitro* et la valeur prédictive des données qu'il est capable de produire reposent sur la représentativité de ce modèle par rapport à l'animal entier. Des expérimentations supplémentaires ont été réalisées en exposant des femelles en gestation par gavage pendant la détermination sexuelle des embryons afin d'évaluer à quels métabolites ces embryons étaient susceptibles d'être exposés.

**Article 1 : COMPARISON OF GENISTEIN METABOLISM IN RATS AND HUMANS
USING LIVER MICROSOMES AND HEPATOCYTES**



Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes

Julian Bursztyka^a, Elisabeth Perdu^a, Jacques Tulliez^a, Laurent Debrauwer^a,
Georges Delous^a, Cécile Canlet^a, Georges De Sousa^b, Roger Rahmani^b,
Emilio Benfenati^c, Jean-Pierre Cravedi^{a,*}

^a UMR 1089 Xénobiotiques, INRA, BP3, F-31931 Toulouse Cedex 9, France

^b UMR 1112 Réponse des Organismes aux Stress Environnementaux, INRA, F-06903 Sophia Antipolis, France

^c Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Via Eritrea 62, 20157 Milano, Italy

Received 20 July 2007; accepted 22 October 2007

Abstract

Species differences and metabolism are the most crucial factors in considering the effects of genistein. The aim of this study was to have a better knowledge of the metabolic fate of genistein in humans as compared with rats. For this purpose, radiolabeled genistein was incubated with human and rat liver microsomes and with cryopreserved hepatocytes from both species. Incubations were performed using a wide range of genistein concentrations to analyze the kinetics of formation of the metabolites. Metabolite profiling was obtained using an HPLC system connected to a radioactivity detector. Identification of the metabolites was based on their retention times as compared with those of authentic standards and on LC–MS (ESI-MS/MS) or NMR analyses. In both species, liver microsomes produced the same three hydroxylated metabolites (8-OH, 6-OH and 3'-OH-genistein) whereas cryopreserved hepatocytes produced the same glucurono- and sulfo-conjugates (genistein 4'-O-sulfate 7-O-glucuronide, genistein 7-O-glucuronide, genistein 4'-O-glucuronide, genistein 7-O-sulfate and genistein 4'-O-sulfate). The rate of metabolism varied with species. 3'-Hydroxygenistein was the predominant metabolite produced by rat liver microsomes, whereas in humans 3'-hydroxy and 8-hydroxygenistein were produced in the same range. In both human and rat hepatocyte incubations, genistein 7-O-glucuronide represented more than 50% of the incubated dose. Our results on hepatocytes confirmed the predominance of conjugation reaction compared to oxidative reaction observed *in vivo*.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Genistein; Microsomes; Cryopreserved hepatocytes; Cytochrome P450s; *In silico* approach; Metabolism

1. Introduction

Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) is a phytoestrogen classified as an isoflavone. Nearly all human genistein exposure is attributable to ingestion of soy products

(Dixon and Ferreira, 2002). In addition to soy-based foods, exposure to genistein can also occur through soy supplements marketed for the treatment of menopausal symptoms (Rozman et al., 2006). The potential role of genistein and other isoflavones in the prevention of breast,

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; CAD, collision-activated dissociation; COMT, catechol-O-methyl transferase; CYP, cytochrome P450; DNA, deoxyribonucleic acid; ER, estrogen receptor; EROD, Ethoxyresorufin-O-deethylase; ESI-MS/MS, electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry; FBS, fetal bovine serum; FIDs, free induction decays; HPLC, high performance liquid chromatography; LC–MS, liquid chromatography–mass spectrometry; NADP, β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NMR, nuclear magnetic resonance; PAPS, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate; R_T , retention time; SPE, solid phase extraction; Tris, hydroxymethylaminomethane; UDP, uridine-5'-diphosphate; UDPGA, uridine-5'-diphosphate glucuronic acid.

* Corresponding author. Tel.: +33 561 285 002; fax: +33 561 285 244.

E-mail address: jcravedi@toulouse.inra.fr (J.-P. Cravedi).

prostate and colon cancer, in lowering the risk of cardiovascular disease and in the improvement of bone health has been emphasized by many authors, as reviewed by Messina et al. (2006). However, some of these beneficial health effects were questioned in several recent reports (Jefferson et al., 2006; Sacks et al., 2006). In contrast, some experimental studies have shown that dietary phytoestrogens such as genistein can have deleterious effects on reproduction and development (Delclos et al., 2001; Jefferson et al., 2005). Part of the physiological or pathological effects of genistein may arise from its estrogenic activity. *In vitro* experiments indicate that genistein, rather than estradiol, binds more strongly to estrogen receptor (ER) β than ER α (Kuiper et al., 1997), and this distinction has implications for its mode of action. Furthermore, genistein has many non-hormonal activities such as interactions with enzymes involved in signal transduction resulting, at the cellular level, in apoptosis and DNA damage (Kulling et al., 2002). Although a recent report (Rozman et al., 2006) concluded that the reproductive and developmental toxicity of genistein is of negligible concern for the general population, the risk/benefit assessment of genistein in humans is not established. Species differences and metabolism are among the most crucial factors in considering the effects of genistein. In spite of several *in vitro* and *in vivo* studies carried out in rats (Coldham et al., 1999; Coldham and Sauer, 2000; Fang et al., 2002) and *in vitro* data regarding the oxidative metabolism of genistein in humans (Breinholt et al., 2003; Kulling et al., 2001; Roberts-Kirchhoff et al., 1999) some pathways remain unclear.

In addition to *in vivo* studies, most of the available reports on genistein metabolism have determined the *in vitro* metabolic pathways of this isoflavone incubated with rat or human liver microsomes, but these investigations did not use a radiolabeled substrate and did not focus on the biotransformation rates (Breinholt et al., 2003; Jager et al., 1998, 2001, 2000, 2002; Roberts-Kirchhoff et al., 1999).

The aim of the present investigation was to compare within the same study the metabolic pathways and the biotransformation rates of genistein in rats and humans. Therefore, we investigated the biotransformation of ^{14}C -genistein *in vitro* using liver microsomes and cryopreserved hepatocytes which have been shown to be reliable models to evaluate xenobiotic metabolism in humans (Li et al., 1999).

In addition, based on genistein studies, we have compared our data with those produced by two computational simulation systems in order to evaluate the predictive capabilities of these *in silico* approaches. One of the most common goals of *in silico* screens is the prediction of the metabolic fate of xenobiotics, including, the ability of a chemical to be metabolized, and the regioselectivity of metabolism. A variety of *in silico* methodologies have been applied to predict these properties (Ekins et al., 2003; van de Waterbeemd and Gifford, 2003).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Genistein (CAS number: 446-72-0) was obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). [^{14}C] genistein was purchased from Isotopchim (Ganagobie-Peyruis, France); the specific activity was 592 MBq/mmol and the radiopurity $\geq 99\%$, as controlled by radio-HPLC.

Collagenase was obtained from Roche Applied Science (Meylan, France). NADP, ATP, UDPGA, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, aryl-sulfatase and β -glucuronidase were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Williams' medium E and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen (Rockville, USA), penicillin/streptomycin solution from Bio-Whittaker (Cambrex Company, Walkersville, USA) and insulin from Nova Nordisk (Nova Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark).

Ultrapure water from Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) was used for *in vitro* preparations and for HPLC mobile phases.

2.2. Rat and human hepatocytes preparation

Hepatocytes from 2 male and 1 female human liver biopsies (resected from secondary tumors and cryopreserved after procurement) and whole male Sprague–Dawley rat livers were isolated and cultivated as previously described (Dou et al., 1992). Briefly, after isolation, cells were seeded onto type-I-collagen-coated dishes. Hepatocytes were cultured in medium I (Williams' medium E, 10% FBS, 50 UI/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ streptomycin and 0.1 UI/mL insulin) for 4 (rat) or 18 (human) h. Then medium I was replaced by a similar one that did not contain serum and was supplemented with hydrocortisone hemisuccinate (1 μM) and bovine serum albumin (240 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Hepatocytes viability was determined using the Erythrosine B exclusion test and ranged between 75% and 90%.

2.3. Subcellular fractions preparation

Male and female Sprague–Dawley rats weighing 200–250 g and fed standard commercial diets were used in this study. The animals were killed by asphyxiation in CO_2 gas followed by decapitation. The livers were removed immediately after slaughtering and perfused with 0.9% saline. Liver microsomes and cytosols from 3 male and 3 female were prepared as described previously (Perdu-Durand and Tulliez, 1985) and stored at -80°C in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 20% glycerol. The protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951).

Cryopreserved human liver microsomes were obtained from Xenotech, Tebu-bio (Le Perray en Yvelines, France). Pooled male and female human liver microsomes were prepared from at least 10 male and 10 female donors.

2.4. Synthesis of standard metabolites

2.4.1. Genistein 7-O-glucuronide and genistein 4'-O-glucuronide

Genistein glucuronidation was performed by incubating 2 mg rat liver microsomal protein with [^{14}C] genistein (200 μM , 3.3 kBq) and UDP glucuronic acid (2.5 mM) in 1 mL 0.5 M Tris buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl_2 and 0.05% Triton. After 2 h under agitation at 37°C , incubations were stopped by addition of three volumes of methanol, and centrifuged for 10 min at 8000g. The supernatant was collected and stored at -20°C until analysis. Genistein and its metabolites were analyzed and separated before identification using the radio-HPLC system described below. In addition to unchanged genistein the radiochromatogram exhibited two peaks having retention times of 13.9 min and 15.3 min respectively (data not shown). The mass spectrometric analysis of the first metabolite revealed a $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion at m/z 445, corresponding to a genistein glucuronide. This was confirmed by MS/MS on the m/z 455 precursor ion (Table 1) which gave diagnostic fragment ions at m/z 269

Table 1

Summary of ^1H NMR resonances and mass spectrometric data of isolated standards. Chemical shifts (ppm) are relative to CD_3OD (^1H , δ , 3.31, and 4.87)

Compound	HPLC R_T	^1H NMR		ESI-MS/MS
		Aglycone moiety	Glucuronide moiety	m/z (rel. int.)
Genistein 4'- <i>O</i> -sulfate 7- <i>O</i> -glucuronide ^b	11.80	H-2: 8.24 (<i>s</i>) H-6: 6.54 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-8: 6.74 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-2'/6': 7.57 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz) H-3'/5': 7.39 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)		525 (100), 349 (62), 269 (3)
Genistein 7- <i>O</i> -glucuronide ^b	13.90	H-2: 8.14 (<i>s</i>) H-6: 6.52 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-8: 6.74 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-2'/6': 7.38 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz) H-3'/5': 6.84 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)	H-1'': 5.08 (<i>d</i> , $J = 6.9$ Hz) H-2'': 3.52 (<i>m</i>) H-3'': 3.55 (<i>m</i>) H-4'': 3.66 (<i>m</i>) H-5'': 3.82 (<i>d</i> , $J = 9$ Hz)	445 (100), 269 (55), 175 (3)
Genistein 4'- <i>O</i> -glucuronide ^b	15.30	H-2: 8.10 (<i>s</i>) H-6: 6.21 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-8: 6.34 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-2'/6': 7.48 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz) H-3'/5': 7.18 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)	H-1'': 4.95 (<i>d</i> , $J = 6.9$ Hz) H-2'': 3.52 (<i>m</i>) H-3'': 3.55 (<i>m</i>) H-4'': 3.66 (<i>m</i>) H-5'': 3.76 (<i>d</i> , $J = 9$ Hz)	445 (100), 269 (96), 175 (2)
Genistein 7- <i>O</i> -4'- <i>O</i> -disulfate ^b	16.60	H-2: 8.26 (<i>s</i>) H-6: 6.71 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-8: 6.99 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-2'/6': 7.55 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz) H-3'/5': 7.38 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)		349 (14), 269 (100)
Genistein 7- <i>O</i> -sulfate ^b	18.20	H-2: 8.18 (<i>s</i>) H-6: 6.70 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-8: 6.99 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-2'/6': 7.39 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz) H-3'/5': 6.84 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)		
8-Hydroxygenistein ^a	18.40	H-2: 8.11 (<i>s</i>) H-6: 6.29 (<i>s</i>) H-2'/6': 7.37 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz) H-3'/5': 6.85 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)		287 (100), 269 (38), 259 (33), 241 (35), 231 (14), 169 (76)
6-Hydroxygenistein ^a	19.00	H-2: 8.06 (<i>s</i>) H-8: 6.47 (<i>s</i>) H-2'/6': 7.37 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz) H-3'/5': 6.85 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)		287 (98), 269 (50), 259 (48), 241 (43), 231 (45), 169 (100)
4'- <i>O</i> -sulfate ^b	19.10			349 (100), 269 (67)
3'-Hydroxygenistein ^a	20.20	H-2: 8.04 (<i>s</i>) H-6: 6.21 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-8: 6.34 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-2': 7.01 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-5': 6.81 (<i>d</i> , $J = 8.2$ Hz) H-6': 6.84 (<i>dd</i> , $J = 8.2$ and 2 Hz)		287 (24), 269 (100), 259 (42), 241 (78), 231 (44), 153 (87)
Genistein	22.90	H-2: 8.06 (<i>s</i>) H-6: 6.21 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-8: 6.34 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz) H-2'/6': 7.37 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz) H-3'/5': 6.84 (<i>d</i> , $J = 8.4$ Hz)		

Multiplicity of signals is indicated in italics: *s*, singlet; *d*, doublet and *m*, multiplet. Values in parentheses are ^1H - ^1H splittings (Hz) in cases where these are clearly resolved.

^a Metabolites analyzed by positive ESI in rat and human microsomes.

^b Metabolites analyzed by negative ESI in rat and human hepatocytes.

(genistein moiety) and m/z 175 (glucuronic acid moiety). Between genistein and the biotransformation product corresponding to R_T 13.9 min, some differences were observed in the aromatic region of the ^1H NMR spectra for H-6 and H-8 resonances (Table 1). The presence of a glucuronide moiety on position 7 changes the chemical shifts of the protons H-6 and H-8. The others aromatic resonances are unchanged. These elements indicate that this metabolite is genistein 7-*O*-glucuronide. The second metabolite (R_T 15.3 min) could also be identified as a genistein glucuronide on the basis of its $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion and related fragment ions (Table 1).

Some changes occurred in the aromatic region of the ^1H NMR spectra for H-2' and H-3' resonances, the presence of a glucuronide moiety on position 4' changing the chemical shifts of the protons H-2' and H-3'. The others aromatic resonances are unchanged. We can conclude that this metabolite is genistein 4'-*O*-glucuronide.

2.4.2. Genistein 7-*O*-4'-*O*-disulfate and genistein 7-*O*-sulfate

Rat cytosols (2 mg of liver cytosolic protein) were preincubated under agitation for 30 min at 37 °C with 50 mM Tris buffer (pH 7.5), 5 mM

MgCl₂, 5 mM ATP and 2 mM sodium sulfate in a final volume of 1 mL. Then, [¹⁴C]-genistein (200 μM, 6 kBq) was added and incubations were carried out under agitation for 2 h at 37 °C. Incubations were stored at –20 °C until analysis. The two products obtained were identified by negative ESI-MS and ¹H NMR. Mass spectrometric analyses indicated that both were sulfate conjugates of genistein (Table 1), displaying a characteristic fragment ion at *m/z* 269 (elimination of SO₃). The changes occurred in the aromatic region of the spectra (Table 1) indicate that the first product is genistein 7-*O*-4'-*O*-disulfate (changes for H-6 and H-8 resonances), and the second one is genistein 7-*O*-sulfate (changes for H-6, H-8, H-2' and H-3' resonances).

2.4.3. Genistein 4'-*O*-sulfate 7-*O*-glucuronide

Male Sprague–Dawley rats (200–250 g) were obtained from Iffa Credo (Saint Germain sur L'Arbresle, France). All animals received human care in compliance with institutional guidelines. All experiments on human tissue were in accordance with ethical standards of responsible committee on human experimentation and with the Helsinki declaration. Bile samples (0–7 h post-dose) were obtained with bile-duct cannulated rats (*n* = 2) dosed by gavage with 2.4 mg (91.7 kBq) [¹⁴C]-genistein per kg body weight, as an homogeneous suspension in 1 mL methylcellulose/water (0.5:99.5, v/v). Bile samples were stored at –20 °C until analysis. The main product obtained was identified by negative ESI-MS and ¹H NMR spectroscopy (Table 1). [M–H][–] ion of this metabolite was observed at *m/z* 525, corresponding to a doubly conjugated form of genistein by both sulfation and glucuronidation. This was confirmed by the MS/MS spectrum of the *m/z* 525 precursor ion which displayed characteristic fragment ions at *m/z* 349 (i.e. 525–176, elimination of the glucuronic acid moiety) and *m/z* 269 (i.e. genistein aglycon after consecutive elimination of both glucuronide and SO₃ groups). Compared to genistein NMR spectrum, some changes occurred in the aromatic region for the protons H-6, H-8, H-2' and H-3'. These elements suggest that there is a substitute on position 4' and a substitute on position 7. A comparison of the ¹H NMR spectrum of this metabolite with that of 7-*O*-glucuronide genistein suggest a glucuronide group to be present at C-7 (the chemical shifts for H-6 and H-8 are the same). In the same way, a comparison of the ¹H NMR spectrum of this metabolite with that of 7-*O*-4'-*O*-disulfate genistein suggest a sulfate group to be present at C-4' (the chemical shifts for H-2' and H-3' are the same). This metabolite was thus identified as genistein 4'-*O*-sulfate 7-*O*-β-D-glucuronide.

2.5. Incubation of [¹⁴C] genistein with rat and human liver microsomes

Incubations were performed in vials containing 2 mg of rat or 1 mg of human microsomal protein, 1 mM NADP, 10 mM glucose 6 phosphate, 2 units of glucose 6 phosphate dehydrogenase/mL and radio-labeled genistein in a volume of 1 mL (rat samples) or 0.5 mL (human samples) phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 5 mM MgCl₂. For rat and human samples, incubations were performed at 37 °C for 2 h under agitation with 10 μM, 20 μM, 30 μM, 60 μM, 100 μM, 200 μM and 500 μM [¹⁴C]-genistein (3.7 kBq) then stopped by adding three volumes of methanol. After centrifugation for 10 min at 8000g, the supernatant was collected and stored at –20 °C until analysis.

2.6. Incubations of [¹⁴C] genistein with cryopreserved rat and human hepatocytes

Cells were incubated for 2 h at 37 °C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. Incubation was initiated by the addition of 15 μM [¹⁴C] genistein (3.7 kBq) and stopped by removing the medium from the plates. The medium was stored at –20 °C while awaiting HPLC analysis.

2.7. Radioactivity counting

Aliquots of incubation media were counted directly in a Packard scintillation counter (Model Tricarb 2200CA; Packard Instruments, Meriden, CT, USA) using Ultimagold (Packard, Downers Grove, IL,

USA) as the scintillation cocktail. An external standard method was used for automatic quench correction.

2.8. Analytical procedures

Aliquots of supernatants from microsomal incubations were dried under a nitrogen stream and dissolved in the HPLC mobile phase A. Hepatocyte incubation media were extracted using SPE columns (Envi-18 500 mg Supelco, Sigma–Aldrich, France) conditioned with ammonium acetate 20 mM pH 3, washed with water and eluted with methanol. After drying under a nitrogen stream, the residue was dissolved in the ammonium acetate HPLC buffer. The analyses were performed on a Waters 510 apparatus connected for radioactivity detection to a Packard Flo-One/β A500 detector (Packard Instruments Co., Meriden, CT) with Flow-scint II as scintillation cocktail (Packard Instruments Co., Downers Grove, IL, USA). Metabolites were quantified by integrating the area under detected peaks.

The HPLC system consisted of an Ultrabase C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; Shandon/LSI, Cergy Pontoise, France) thermostated at 25 °C and protected by an Ultrabase C18 guard precolumn (18 × 4.6 mm; 5 μm). The mobile phases consisted of (A) ammonium acetate buffer (20 mM adjusted to pH 3.5), acetonitrile (90:10, v/v) and (B) the same components in the proportion 10:90 (v/v), respectively. The flow rate was 1 mL/min and the elution gradient was as follows: 0–5 min, 100% A; 5–30 min, linear gradient from 100% A to 100% B.

2.9. Identification of metabolites

Bacterial aryl-sulfatase (*Aerobacter aerogenes*, type VI, Sigma) and bovine liver β-glucuronidase (Type B-1, Sigma) were used to assess the formation of corresponding conjugates. One UI of β-glucuronidase in 800 μL 0.2 M sodium acetate buffer adjusted to pH 5 was added to 200 μL cell medium. Aryl-sulfatase (0.8 UI in 800 μL of 0.01 M Tris buffer adjusted to pH 7.1) was added to 200 μL cell medium. After 2 h at 37 °C under gentle shaking, hydrolysis assays were stopped by addition of methanol (1:3, v/v). The supernatant was evaporated to dryness under a nitrogen stream and recovered in 100 μL of the corresponding HPLC system mobile phase A before analysis.

To isolate the metabolites before identification, the Waters 510 apparatus was connected to an absorbance detector set at 254 nm (Waters 484) and to a Gilson Model 202 fraction collector (Gilson France, Villiers-le-Bel, France). Identification of the isolated metabolites was achieved by NMR and mass spectrometry using electrospray (ESI) ionization. ESI-MS/MS experiments were carried out on a Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer (ThermoQuest, Les Ulis, France) equipped with the Finnigan electrospray ionization source. Both positive and negative ionization modes were used depending on the metabolite considered (i.e. hydroxylated or conjugated metabolite). The sample solutions (typically 5 ng/μL in 50:50 methanol/water) were infused at 3 μL/min into the electrospray interface. Typical potentials applied to the ESI source were as follows: needle (5000 V), heated transfer capillary (5–20 V) and tube lens (15–30 V). All spectra were acquired under automatic gain control conditions. Helium was used for improving the trapping efficiency, and as the collision gas for MS/MS experiments.

NMR spectra were obtained at 300 K on a Bruker Avance DRX-600 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 600.13 MHz and equipped with a 5 mm H, C, N inverse triple resonance TX1 cryoprobe attached to a cryoplatfom (the preamplifier cooling unit). One-dimensional spectra were acquired using a standard pulse sequence for ¹H NMR. Sixteen free induction decays (FIDs) were collected with a spectral width of 12 ppm into 64 K data points. An exponential function equivalent to a line-broadening of 0.3 Hz was applied prior to Fourier transformation.

2.10. In silico prediction of metabolism

We used commercial software as a support for metabolism studies: MetaSite and MetabolExpert. MetaSite (Molecular Discovery Ltd., Pin-

ner, UK) is a computational procedure specially designed to predict the site of metabolism for xenobiotics starting from the 3D structure of a compound. We predicted metabolism for substrates of 2C9, 2D6, 3A4, 1A2 and 2C19 cytochromes P450.

MetabolExpert (ComGenex, Budapest, Hungary) is a software predicting metabolite structures, including conjugates.

2.11. Data analysis

Data analysis was conducted using an unpaired Student's *t*-test using Instat (Graph Pad software). Differences were considered significant if $P < 0.05$. V_{max} values were determined by non-linear regression analysis as previously indicated (Laurent et al., 2000).

3. Results

3.1. Metabolism of genistein by rat and human liver microsomes

As shown in Fig. 1, the radio-chromatograms obtained from 2 h incubations of 100 μM [^{14}C]-genistein with liver microsomes were similar in rats (A) and humans (B). Three major metabolites (m1, m2 and m3) were observed. In control incubations carried out without NADPH generating system (data not shown), only genistein was observed, confirming that the formation of the three metabolites was cytochrome P450 dependent. The positive ESI-MS analysis of the three metabolites gave MH^+ ions at m/z 287, indicating that m1, m2 and m3 corresponded to three different isomers of hydroxylated genistein (Table 1). Based on the data obtained by MS/MS for each metabolite and on ^1H NMR data (Table 1), the metabolites were identified as 8-hydroxy-, 6-hydroxy- and 3'-hydroxygenistein, respectively. CAD mass spectra obtained by MS/MS were very similar between m1 and m2. A comparison of the ^1H NMR spectrum from these metabolites with that of genistein showed changes for H-6 or H-8. For the first metabolite, the signal corresponding to H-8 with the chemical shift of 6.34 ppm disappeared and the signal at 6.27 ppm corresponding to H-6 is a singlet. These elements suggest that the hydroxy group is on C-8. We can conclude that m1 is 8-hydroxygenistein. For the second metabolite, the signal corresponding

to H-6 with the chemical shift of 6.21 ppm disappeared and the signal at 6.47 ppm corresponding to H-8 is a singlet. These elements suggest that the hydroxy group is on C-6. We can conclude that this metabolite is 6-hydroxygenistein. For m3, compared to genistein ^1H NMR spectrum, some changes occurred in the aromatic region for the protons H-2' and H-3'. We observed on the spectrum of this metabolite a doublet at 6.81 ppm with *ortho* coupling constant, a doublet of doublet at 6.84 ppm with *ortho* and *meta* coupling constants and a doublet at 7.01 ppm with a *meta* coupling constant instead of two doublets at 6.84 and 7.37 ppm with *ortho* coupling constant. These elements indicate that the ring B is trisubstituted and that the hydroxyl group is on position 3' because of the chemical shifts. We can conclude that this metabolite is 3'-hydroxygenistein. Qualitatively, no difference was observed between rats and humans whatever the gender or the concentrations considered (data not shown).

The phase I biotransformation rates for genistein were calculated for all microsomal incubations and expressed in nmoles of metabolized genistein/mg of protein/h (Fig. 2). Quantitatively, at 100 μM as well as for the other genistein concentrations used (data not shown), 3'-hydroxygenistein was the predominant metabolite produced in rats ($P < 0.05$), whereas in humans 3'-hydroxy- and 8-hydroxygenistein were produced in the same range. 8-hydroxy-, 6-hydroxy- and 3'-hydroxygenistein formation over the concentration range are shown in Fig. 3. In both species and for all metabolites, curves showed saturation kinetics. Based on apparent V_{max} calculation, 3'-hydroxygenistein was produced at a higher rate in humans than in rats (Table 2). The apparent V_{max} seemed to be greater in rats than in humans only for 6-hydroxygenistein.

3.2. Incubation of [^{14}C] genistein with cryopreserved rat and human hepatocytes

The formation of genistein metabolites in rat and human hepatocytes was investigated in a 2 h assay with radiolabeled genistein (3.7 kBq, 400,000 cells). In both

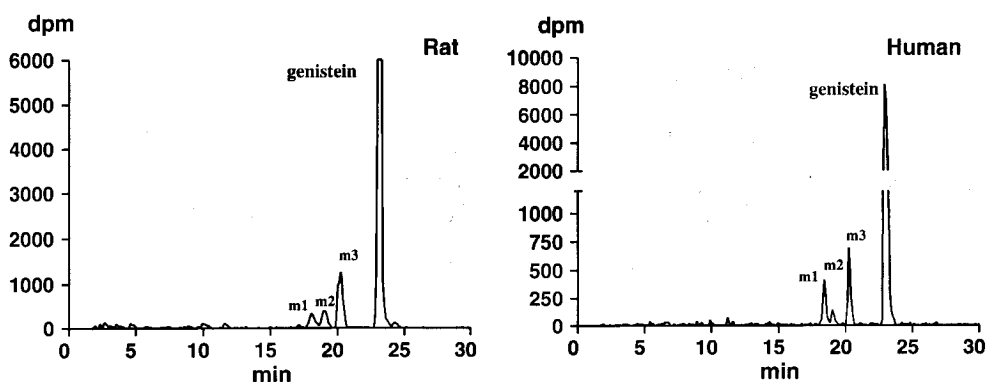


Fig. 1. Typical radio-HPLC metabolic profile obtained from incubation of radio-labeled genistein (100 μM , 3.7 kBq [^{14}C]-genistein) with 2 mg of rat or 1 mg of human microsomal protein, 1 mM NADP, 10 mM glucose 6 phosphate, 2 units of glucose 6 phosphate dehydrogenase/mL in a volume of 1 mL (rat samples) or 0.5 mL (human samples) phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 5 mM MgCl_2 (incubation time 2 h).

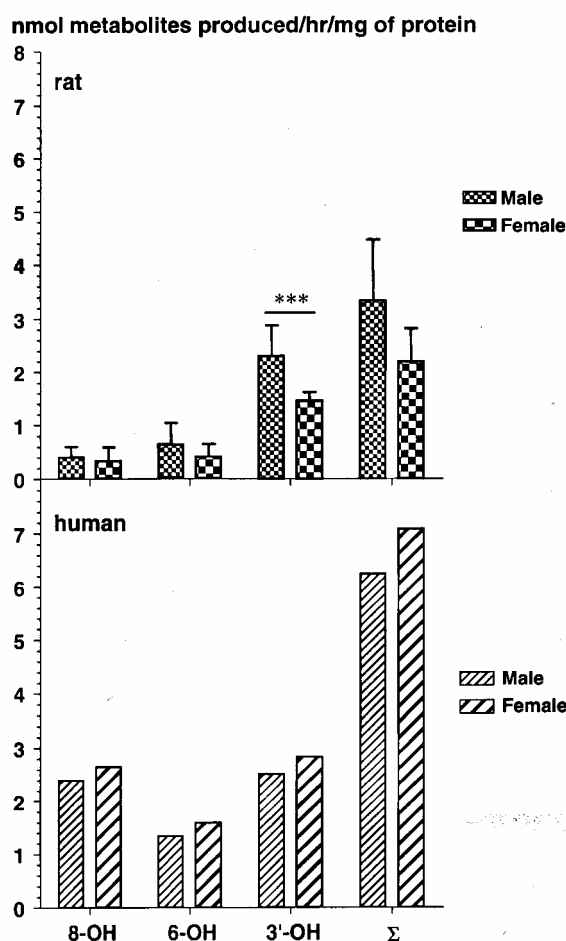


Fig. 2. Metabolic rates of genistein in rat and human liver microsomes ($100 \mu\text{M}$ [^{14}C]-genistein, incubation time 2 h). Data are mean \pm SD from three individuals for rat, and a pool of 10 individuals for human. *** significant difference between male and female using unpaired Student's *t*-test, $P < 0.01$.

species, it was observed that genistein was extensively metabolized and the radiochromatographic profiles (Fig. 4) showed five peaks (h1–h5) with R_T corresponding to 11.80, 13.90, 15.30, 18.20 and 19.10 min, respectively. The metabolites were identified on the basis of enzymatic hydrolysis, negative ESI/MS and MS/MS (Table 1) as well as by comparison of R_T with those of metabolite standards produced *in vitro* as described in Section 2.

Metabolite h1 co-eluted with the major metabolite isolated from the bile of rats dosed with ^{14}C -genistein, and the corresponding ESI-MS/MS spectra were identical; h1 was thus identified as genistein 4'-*O*-sulfate 7-*O*-glucuronide.

The enzymatic hydrolysis of metabolite h2 by β -glucuronidase gave genistein. Furthermore, peak h2 co-eluted with one of the genistein glucuronides produced by rat microsomes in presence of UDPGA, which has previously been identified by ESI-MS/MS and ^1H NMR spectroscopy. Metabolite h2 was thus identified as genistein 7-*O*-glucuronide.

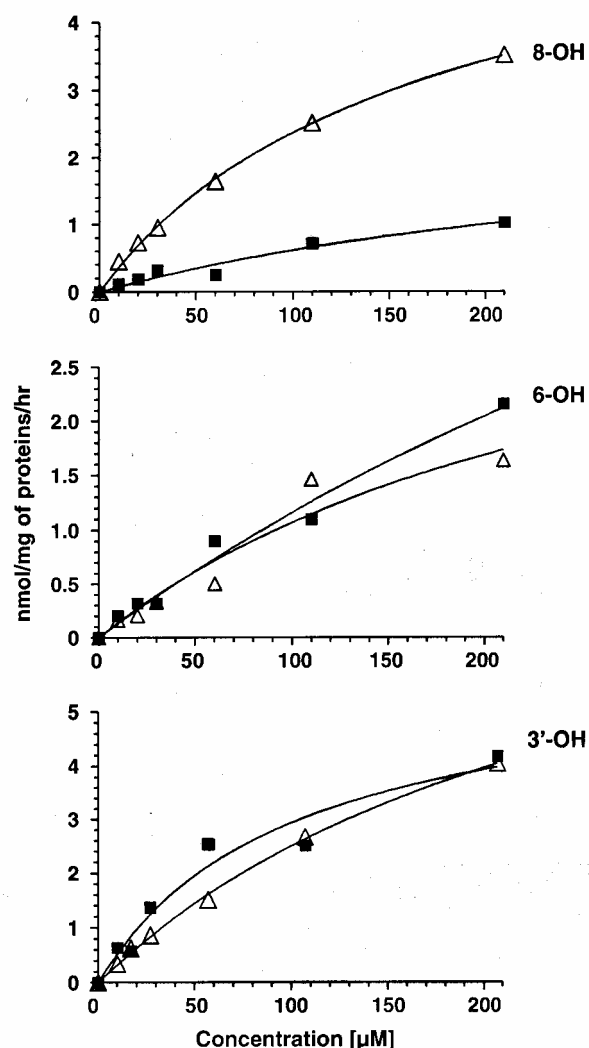


Fig. 3. Michaelis–Menten plot of 8-hydroxygenistein, 6-hydroxygenistein and 3'-hydroxygenistein formation by liver microsomes from rats (square) and humans (triangle) (values were determined from 10 males and 10 females pooled samples in each case, incubation time 2 h).

Identification of peak h3 has been achieved using negative ESI-MS/MS, suggesting a genistein glucuronide structure on the basis of its $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion and related fragment ions (Table 1). Enzymatic hydrolysis confirmed this result. This peak co-eluted with a genistein glucuronide produced by microsomes in presence of UDPGA and identified by ^1H NMR as genistein 4'-*O*-glucuronide (see Section 2).

A successful sulfatase hydrolysis was observed with h4 and h5, leading to genistein. This result suggested that h4 and h5 were genistein sulfates. Mass spectrometric analyses also indicated that h4 and h5 were both sulfate conjugates of genistein, displaying an $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion at m/z 349 and a characteristic fragment ion at m/z 269 (elimination of SO_3). h4 co-eluted with the first metabolite synthesized with cytosolic protein and PAPS, and identified by ^1H NMR (see Section 2) as genistein 7-*O*-sulfate. Due to the steric hindrance in position 5, to the fact that in the litera-

Table 2
Apparent V_{\max} and K_m of genistein biotransformation by rat and human liver microsomes (nmol/mg of protein/h)

	V_{\max}		K_m	
	Rats	Humans	Rats	Humans
8-Hydroxygenistein	2.72 ± 1.32	6.19 ± 0.26	343.1 ± 239.7	160.0 ± 11.9
6-Hydroxygenistein	8.43 ± 4.65	3.96 ± 1.91	630.1 ± 433.4	269.4 ± 198.7
3'-Hydroxygenistein	5.95 ± 1.14	9.59 ± 0.76	102.4 ± 40.3	282.4 ± 33.9

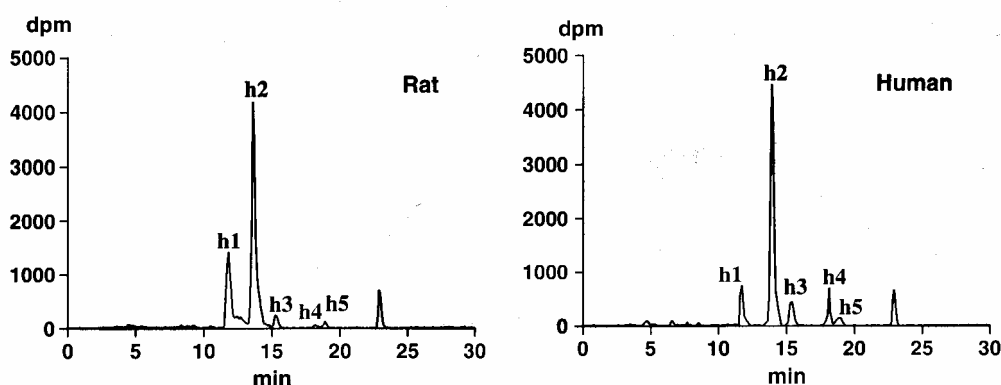


Fig. 4. Typical radio-HPLC metabolic profiles obtained from incubation of 15 μM [^{14}C]-genistein (3.7 kBq) with cryopreserved rat and human hepatocytes cultured in William's medium E, 50 UI/mL penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ streptomycin, 0.1 UI/mL insulin, supplemented with 1 μM hydrocortisone hemisuccinate and 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bovine serum albumin (incubation time 2 h).

ture no conjugated form was identified in position 5 of genistein, and by analogy with genistein glucuronides, h5 was tentatively identified as genistein 4'-O-sulfate.

As summarized in Fig. 5, our data indicate that the major metabolite in both human and rat hepatocyte incubations is genistein 7-O-glucuronide. It represents more than 50% of the incubated dose in rat and in humans. No statistical difference was observed between rats and humans regarding the production rates of this metabolite. In contrast, genistein 4'-O-sulfate 7-O-glucuronide which represented about 25% of the total radioactivity in the rat metabolic profiles, did not exceed 10% of the radioactivity in human metabolic profiles. Production of genistein 4'-O-sulfate 7-O-glucuronide was significantly higher

($P < 0.01$) in rat hepatocytes (1.59 ± 0.36 nmol/h/mg prot) compared to human hepatocytes (0.09 ± 0.12 nmol/h/mg prot) but no difference was observed for other biotransformation products such as genistein 4'-O-glucuronide and sulfo-conjugates in 7 and 4' positions which are minor metabolites in both species. At the end of the experiment, the amount of non-biotransformed genistein in incubates from rat hepatocytes ranged between 6.2% and 8.7% whereas a 0–58.3% range was observed for human hepatocyte incubates, reflecting an important heterogeneity of the samples and/or an inter-individual variability in the human donors. In both species, no hydroxylation products were observed.

3.3. *In silico* predictions

The predictions of using *in silico* tools are summarized in Table 3. According to MetaSite the most likely hydroxylation sites are positions 6, 8 and 3'. However depending on the cytochrome the first most likely position varies. Thus, with 2C9, 2C19, 1A2 and 2D6 the most likely is 3', while 3A4 activates more position 8. We notice that laboratory experiments gave as major product the metabolite with an hydroxy group in position 3', and other metabolites presented hydroxylation in 6 and 8. Thus, a good agreement is obtained with *in silico* models in this case. MetabolExpert predicted the formation of glucuronides, and in particular in positions 4', 7 and 5. There is an agreement in case of glucuronides for positions in 4' and 7, while the glucuronide in 5 was not identified. MetabolExpert

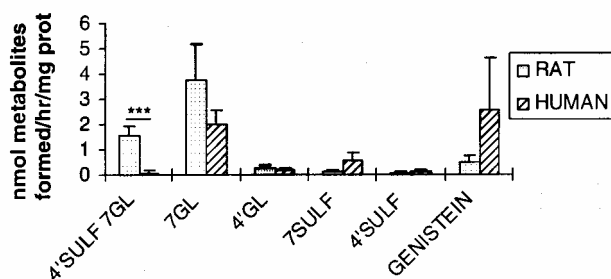


Fig. 5. Metabolic rates of genistein in rat and human cryopreserved hepatocytes (15 μM [^{14}C]-genistein, incubation time 2 h). Data are mean \pm SD from three individuals. GL, glucuronide and SULF, sulfate. *** significant difference between human and rat using unpaired Student's *t*-test, $P < 0.01$.

Table 3
Positions in genistein with likely oxidation for different cytochromes, according to the software MetaSite

Cytochrome	Oxidation position		
	3'	6	8
1A2	+++	+	++
3A4	++	++	+++
2C9	+++	+	++
2C19	+++		++
2D6	+++	+	++

predicted sulfates in position 4' (laboratory experiments identified it as glucuronide), and in 7, which was not found. MetabolExpert predicted the formation of a reduced compound, with an hydroxy group in 4, which was not found.

4. Discussion

Although there have been several detailed studies on the metabolic fate of genistein in rodents, more limited information exists in humans.

Our *in silico* approach predicts that CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 should be the major forms involved in the hydroxylation of genistein in position 3', whereas hydroxylation in position 8 should be mainly due to CYP3A4 and to a lesser extent to the others. CYP3A4, and in a lesser extent CYP1A2, CYP2C9 and CYP2D6 should be the isoforms involved in the hydroxylation in position 6. Jager et al. (1998) using microsomes of rats treated by dexamethasone, a specific inducer of CYP3A1/A2, established experimentally the involvement of the CYP3A isozymes in the hydroxylation of genistein. Other studies using recombinant human cytochrome P450, found that CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 were predominantly involved in the production of orobol, 6- and 8-hydroxygenistein (Breinholt et al., 2003; Roberts-Kirchhoff et al., 1999).

In the present study, genistein was extensively biotransformed in all the assays. *In vitro* biotransformation by rat and human liver microsomes gave three major metabolites hydroxylated at positions 8 and 6 on the A ring, and at position 3' on the B ring. The latter was identified as the 3',4',5,7-tetrahydroxyisoflavone, also known as orobol (Roberts-Kirchhoff et al., 1999). More recently, it has been reported that genistein was metabolized by rat and human liver microsomes to 3 major compounds (5,6,7,4'-tetrahydroxyisoflavone, 5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone and 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone) and three minor metabolites (2,5,7,4'-tetrahydroxyisoflavone, 5,7,8,3',4'-pentahydroxyisoflavone and 5,6,7,3',4'-pentahydroxyisoflavone) (Kulling et al., 2001, 2000, 2002). The latter compounds have been identified from incubations of unlabeled genistein with microsomes prepared from Aroclor-treated male rats and were only found in trace amount in human microsome incubations prepared from a single donor sample. The differences between these conditions and our experi-

ment may explain the reason why we found only three catechols. These metabolites are suspected to form quinones which can react to form DNA adducts after being oxidized via redox cycling and then play a critical role in the carcinogenicity of estrogens (Liehr and Roy, 1990). As a whole, the microsomal production rates of catechols are higher in humans than in rats. A similar difference was observed regarding the major catechol formed in humans, namely orobol. These results suggest that genotoxicity and carcinogenicity studies performed in rats *in vitro* or *in vivo* could underestimate the risks for humans. Although a gender difference was found in the production of orobol in rats, which could be explained by the fact that CYP levels are lower in females than in males (Litterst et al., 1977), this difference was not observed in humans.

Methylation of catechols by COMT, which is thought to be a detoxification pathway, seemed to play a minor role in further biotransformation of isoflavones *in vivo* (Kulling et al., 2001). The bio-activation process *via* catechols is thought to be counterbalanced by phase II metabolic reactions, like conjugation of possibly produced semi-quinones with GSH to form glutathione conjugates (Cavaliere et al., 2002), or conjugation of catechols with glucuronic acid or sulfate. Glucuronidation and sulfation reactions seemed to be the major metabolic pathways to biotransform catechols into conjugates unable to enter a redox cycling reaction, since it has been shown that glucuronide and sulfate conjugates of genistein hydroxylated products, such as 8-hydroxy, 6-hydroxy and 3'-hydroxy-genistein, were predominant in human urine (Kulling et al., 2001). However, the hydroxylated metabolites accounted for $\leq 10\%$ of the total urinary isoflavones (Heinonen et al., 2003; Kulling et al., 2001) and were not present in the experiments carried out by Coldham et al. (1999). Genistein conjugation may also occur before the oxidative metabolism, as we have observed on rat and human hepatocytes in which no oxidative metabolite of genistein has been identified (Fig. 6).

Qualitative production of metabolites was identical between rat and human cryopreserved hepatocytes. In contrast to a previous study (Coldham et al., 1999) where it has been found only one glucuronoconjugate in rat isolated hepatocytes incubated with ^{14}C -genistein, we separated five metabolites in both human and rat hepatocyte medium extracts, the major one being identified as genistein 7-*O*-glucuronide. Other metabolites were genistein 4'-*O*-sulfate 7-*O*-glucuronide, genistein 4'-*O*-glucuronide, genistein 7-*O*-sulfate and genistein 4'-*O*-sulfate. No hydroxylated product was detected, despite the fact that cryopreserved hepatocytes of both species expressed phase I enzymes as controlled by measuring EROD activity (data not shown, see Reinach et al., 1999, for experimental details), indicating the predominant role of phase II reactions for such a system in both species. The absence of hydroxylated metabolites may also be due to the inhibitory properties of genistein toward certain phase I enzymes, since it has been demonstrated that genistein may inhibit the enzyme activity of CYP1A1, 1A2 and 1B1 (Moon et al., 2006). It

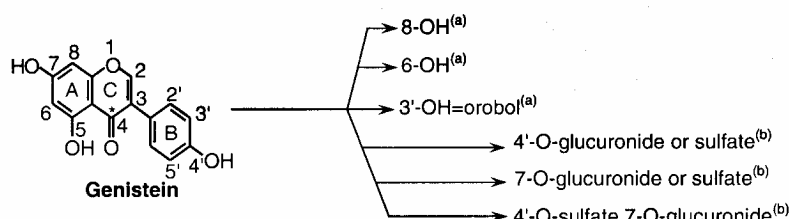


Fig. 6. *In vitro* metabolic pathways of genistein in rat and human: (a) rat and human microsomes and (b) rat and human hepatocytes.

cannot be excluded that traces of hydroxylated metabolites could be produced at level below the detection limit of our analytical system. This is the first time that these conjugates are characterized and identified from *in vitro* samples. Genistein 7-*O*-glucuronide, genistein 7-*O*-glucuronide 4'-*O*-sulfate and genistein 4'-*O*-sulfate had been previously identified in urine or bile of rats treated with genistein (Coldham et al., 1999; Sfakianos et al., 1997; Yasuda et al., 1996). All the conjugated metabolites we have identified in cryopreserved hepatocytes incubation media have also been identified in human urine by Clarke et al. (2002) who observed that genistein 7-*O*-glucuronide was the major conjugated metabolite of genistein. Glucuronide conjugates are also the predominant circulating form in rat blood and 4-hydroxyphenyl-2-propionic acid and trace amounts of parent compound have also been detected in this species (Coldham and Sauer, 2000). Low levels of free isoflavone, sulfo-conjugates and mostly glucuronides have been found in plasma of humans, the most important circulating glucuronide conjugate being 7-*O*-glucuronide (Doerge et al., 2000). These data were confirmed by Shelnett et al. (2002) who reported that glucuronides represent 48% of the total isoflavone concentration in human plasma, whereas sulfates and sulfoglucuronide correspond to approximately 8% and 30%, respectively. The estrogenicity of the conjugated metabolites of genistein has been tested in MCF-7 cells by Kinjo et al. (2004) who demonstrated that genistein 4'-*O*-glucuronide, 7-*O*-glucuronide, 4'-*O*-sulfate 7-*O*-glucuronide and 4'-*O*-sulfate were much less potent than genistein. It has been demonstrated that orobol had little but less potent estrogenic activity than genistein (Murata et al., 2004).

To conclude, we observed that biotransformation pathways of genistein in rat and human microsomes or cryopreserved hepatocytes are similar. Moreover, the *in vitro* models used in this study have been proved to be useful to predict the biotransformation of genistein in rat or in human liver. Most of the conjugated metabolites have been tested previously for their estrogenicity; however, it remains necessary to investigate the estrogenicity of the hydroxylated metabolites in position 8 and 6 of genistein.

Acknowledgement

This study has been partly supported by the European Union network CASCADE (FOOD-CT-2003-506319).

References

- Breinholt, V.M., Rasmussen, S.E., Brosen, K., Friedberg, T.H., 2003. *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. *Pharmacol. Toxicol.* 93 (1), 14–22.
- Cavaliere, E.L., Li, K.M., Balu, N., Saeed, M., Devanesan, P., Higginbotham, S., Zhao, J., Gross, M.L., Rogan, E.G., 2002. Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. *Carcinogenesis* 23 (6), 1071–1077.
- Clarke, D.B., Lloyd, A.S., Botting, N.P., Oldfield, M.F., Needs, P.W., Wiseman, H., 2002. Measurement of intact sulfate and glucuronide phytoestrogen conjugates in human urine using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with [¹³C(3)]isoflavone internal standards. *Anal. Biochem.* 309 (1), 158–172.
- Coldham, N.G., Howells, L.C., Santi, A., Montesissa, C., Langlais, C., King, L.J., Macpherson, D.D., Sauer, M.J., 1999. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentology. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 70 (4–6), 169–184.
- Coldham, N.G., Sauer, M.J., 2000. Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164 (2), 206–215.
- Delclos, K.B., Bucci, T.J., Lomax, L.G., Latendresse, J.R., Warbritton, A., Weis, C.C., Newbold, R.R., 2001. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod. Toxicol.* 15 (6), 647–663.
- Dixon, R.A., Ferreira, D., 2002. Genistein. *Phytochem.* 60 (3), 205–211.
- Doerge, D.R., Chang, H.C., Churchwell, M.I., Holder, C.L., 2000. Analysis of soy isoflavone conjugation *in vitro* and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* 28 (3), 298–307.
- Dou, M., de Sousa, G., Lacaille, B., Placidi, M., Lechene de la Porte, P., Domingo, M., Lafont, H., Rahmani, R., 1992. Thawed human hepatocytes in primary culture. *Cryobiology* 29 (4), 454–469.
- Ekins, S., Berbaum, J., Harrison, R.K., 2003. Generation and validation of rapid computational filters for cyp2d6 and cyp3a4. *Drug Metab. Dispos.* 31 (9), 1077–1080.
- Fang, N., Yu, S., Badger, T.M., 2002. Characterization of isoflavones and their conjugates in female rat urine using LC/MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 50 (9), 2700–2707.
- Heinonen, S.M., Hoikkala, A., Wahala, K., Adlercreutz, H., 2003. Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 87 (4–5), 285–299.
- Jager, W., Sartori, M., Herzog, W., Thalhammer, T., 1998. Genistein metabolism in liver microsomes of Wistar and mutant TR(-)-rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 100 (1), 105–116.
- Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Newbold, R.R., 2005. Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses. *Biol. Reprod.* 73 (4), 798–806.
- Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Newbold, R.R., 2006. Studies of the effects of neonatal exposure to genistein on the developing female reproductive system. *J. AOAC Int.* 89 (4), 1189–1196.

- Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., Aomori, T., Nagao, T., Okabe, H., Nohara, T., Masamune, Y., 2004. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2), 185–188.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138 (3), 863–870.
- Kulling, S.E., Honig, D.M., Metzler, M., 2001. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 49 (6), 3024–3033.
- Kulling, S.E., Honig, D.M., Simat, T.J., Metzler, M., 2000. Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J. Agric. Food Chem.* 48 (10), 4963–4972.
- Kulling, S.E., Lehmann, L., Metzler, M., 2002. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 777 (1–2), 211–218.
- Laurent, A., Perdu-Durand, E., Alary, J., Debrauwer, L., Cravedi, J.P., 2000. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices. *Toxicol. Lett.* 114 (1–3), 203–214.
- Li, A.P., Lu, C., Brent, J.A., Pham, C., Fackett, A., Ruegg, C.E., Silber, P.M., 1999. Cryopreserved human hepatocytes: Characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug–drug interaction potential. *Chem. Biol. Interact.* 121 (1), 17–35.
- Liehr, J.G., Roy, D., 1990. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic. Biol. Med.* 8 (4), 415–423.
- Litterst, C.L., Mimnaugh, E.G., Gram, T.E., 1977. Comparative alterations in extrahepatic drug metabolism by factors known to affect hepatic activity. *Biochem. Pharmacol.* 26 (8), 749–755.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275.
- Messina, M., McCaskill-Stevens, W., Lampe, J.W., 2006. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (18), 1275–1284.
- Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E., 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro* 20 (2), 187–210.
- Murata, M., Midorikawa, K., Koh, M., Umezawa, K., Kawanishi, S., 2004. Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry* 43 (9), 2569–2577.
- Perdu-Durand, E.F., Tulliez, J.E., 1985. Hydrocarbon hydroxylation system in liver microsomes from four animal species. *Food Chem. Toxicol.* 23 (3), 363–366.
- Reinach, B., de Sousa, G., Dostert, P., Ings, R., Gugenheim, J., Rahmani, R., 1999. Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP-glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 121 (1), 37–48.
- Roberts-Kirchhoff, E.S., Crowley, J.R., Hollenberg, P.F., Kim, H., 1999. Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s. *Chem. Res. Toxicol.* 12 (7), 610–616.
- Rozman, K.K., Bhatia, J., Calafat, A.M., Chambers, C., Culty, M., Etzel, R.A., Flaws, J.A., Hansen, D.K., Hoyer, P.B., Jeffery, E.H., Kesner, J.S., Marty, S., Thomas, J.A., Umbach, D., 2006. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of genistein. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 77 (6), 485–638.
- Sacks, F.M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P., Winston, M., 2006. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation* 113 (7), 1034–1044.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., Barnes, S., 1997. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.* 127 (7), 1260–1268.
- Shelnutt, S.R., Cimino, C.O., Wiggins, P.A., Ronis, M.J., Badger, T.M., 2002. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (3), 588–594.
- van de Waterbeemd, H., Gifford, E., 2003. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (3), 192–204.
- Yasuda, T., Mizunuma, S., Kano, Y., Saito, K., Oshawa, K., 1996. Urinary and biliary metabolites of genistein in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 19 (3), 413–417.

Expérimentation complémentaire : Biotransformation de la génistéine par les tranches de foie de rat Wistar.

Afin de compléter l'étude métabolique de la génistéine sur microsomes et hépatocytes, nous avons réalisé le même type de travail à partir d'un modèle biologique plus intégré : les tranches de foie. Ce modèle a d'ailleurs été choisi comme référence dans nos études chez le rat, en raison de sa facilité d'emploi et de l'excellent niveau d'expression d'enzymes de biotransformation qu'il permet (Ekins et al., 1996).

Les rats Wistar mâles pesant environ 250 g ont été obtenus auprès d'Iffa Credo (L'arbresle, France). A leur arrivée à l'animalerie, les animaux ont eu une période d'une semaine d'acclimatation avant toute expérimentation durant laquelle ils avaient un accès sans restriction à l'alimentation (UAR 210; Villemoisson sur Orge, France) et à l'eau. A chaque expérimentation, les animaux étaient tués par dislocation cervicale, immédiatement suivie d'une exsanguination. Les foies étaient immédiatement récupérés et perfusés avec 40 mL de tampon Krebs-Henseleit oxygéné glacé (4°C) afin d'en retirer le sang. Les carottes de foie étaient obtenues à l'aide d'un tube d'acier inoxydable monté sur une foreuse. Une trancheuse de tissus Krumdieck (Alabama Research and Development Corp., Munford, AL) a été utilisée pour produire des tranches de foie précisément coupées d'un diamètre de 8 mm et d'une épaisseur de 0.2 mm (Krumdieck et al., 1980). Une période d'équilibration de 45 min a été prévue pour permettre de retirer les cellules endommagées et pour retrouver l'homéostasie en Ca^{2+} et K^+ dans les tranches. Le poids moyen des tranches de foie était de 20 mg, contenant 2 mg de protéines. L'incubation des tranches a été réalisée dans des plaques de 12 puits (Dogterom, 1993) en utilisant du milieu DMEM. Le volume des incubations était d'1 mL, la température maintenue à 37°C dans un shaker rotatif réglé à 90 tours par minute, l'atmosphère étant saturée avec 95% O_2 /5% CO_2 . La [^{14}C]-génistéine a été incubée à une concentration de 10 μM [2420 Bq/mL] pendant 4 hr avec des tranches provenant de trois rats différents. La stabilité de la génistéine dans les conditions d'incubation a été contrôlée en l'incubant 4 hr dans un mL de DMEM en l'absence de tranches. La 7-éthoxycoumarine radiomarquée au ^{14}C a été utilisée pour contrôler l'activité métabolique des enzymes de phase I et de phase II des tranches en l'incubant pendant 4 hr à une concentration de 25 μM en présence des tranches de foie de rat. La formation de 7-hydroxycoumarine, 7-hydroxycoumarine glucuronoconjuguée ou conjuguée à l'acide sulfurique a été contrôlée par CLHP.

La génistéine s'est montrée stable pendant la durée d'incubation, aucun produit de dégradation n'ayant été détecté au bout de 4 hr à 37°C dans le DMEM seul. Les capacités métaboliques des tranches étaient conformes à la littérature, puisque plus de 50% de la 7-éthoxycoumarine a été métabolisée en 7-hydroxycoumarine et en ses conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate, ce qui correspond aux résultats obtenus par (Ekins et al., 1995).

Après incubation de 10 µM de génistéine pendant 4 hr en présence des tranches des foie, trois métabolites ont été détectées par CLHP avec des temps de rétention (R_t) de 11,8, 13,9 et 19,1 minutes (Fig.1). D'après ces temps de rétention et les hydrolyses enzymatiques décrits dans l'article 1, ces métabolites ont été identifiés comme étant la génistéine 7-O-glucuroconjuguée, 4'-O-sulfate ($R_t=11,8$ minutes), la génistéine 7-O-glucuroconjuguée ($R_t=13,9$ minutes et la génistéine 4'-O-sulfate ($R_t=19,1$ minutes). La génistéine conjuguée à la fois à l'acide glucuronique et à l'acide sulfurique et la génistéine conjuguée seulement à l'acide glucuronique en position 7 étaient majoritaires et représentaient en moyenne respectivement 37,8 % et 36,4 % de la radioactivité totale présente dans les milieu d'incubation, tandis que la génistéine 4'-O-sulfate représentait 13,4 % en moyenne de la radioactivité totale.

Ces résultats sont proches de ceux observés précédemment avec les hépatocytes cryopréservés de rats puisque les 2 métabolites prépondérants sont les mêmes dans les 2 systèmes. En revanche, la génistéine 4'-O-glucuroconjuguée et la génistéine 7'-O-sulfate, mises en évidence à partir d'hépatocytes en culture primaire, n'apparaissent pas ici.

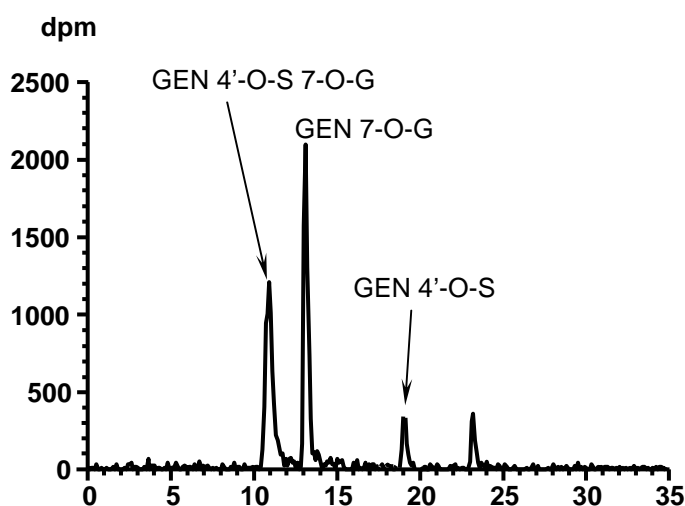


Fig.1 : profile radio-CLHP typique obtenu à partir d'incubations de 10 µM [14 C]-génistéine avec des tranches de foie de rat Wistar pendant 4 hr.

**Article 2 : BIOTRANSFORMATION OF VINCLOZOLIN IN RAT PRECISION-CUT
LIVER SLICES: COMPARISON WITH *IN VIVO* METABOLIC PATTERN**

Biotransformation of Vinclozolin in Rat Precision-Cut Liver Slices: Comparison with *in Vivo* Metabolic Pattern

JULIAN BURSZTYKA, LAURENT DEBRAUWER, ELISABETH PERDU,
ISABELLE JOUANIN, JEAN-PHILIPPE JAEG, AND JEAN-PIERRE CRAVEDI*

UMR1089 Xénobiotiques, INRA, F-31931 Toulouse, France

Vinclozolin is a dicarboximide fungicide that presents antiandrogenic properties through its two hydrolysis products M1 and M2, which bind to the androgen receptor. Because of the lack of data on the biotransformation of vinclozolin, its metabolism was investigated *in vitro* in precision-cut rat liver slices and *in vivo* in male rat using [^{14}C]-vinclozolin. Incubations were performed using different concentrations of substrate, and the kinetics of formation of the major metabolites were studied. Three male Wistar rats were fed by gavage with [^{14}C]-VZ. Urine was collected for 24 h and analyzed by radio-HPLC for metabolic profiling. Metabolite identification was carried out on a LCQ ion trap mass spectrometer. In rat liver slices and *in vivo*, the major primary metabolite has been identified as 3',5'-dichloro-2,3,4-trihydroxy-2-methylbutyranilide (M5) and was mainly present as glucurono-conjugates. M5 is produced by dihydroxylation of the vinyl group of M2. Other metabolites have been identified as 3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-(1,2-dihydroxyethyl)-1,3-oxazolidine-2,4-dione (M4), a dihydroxylated metabolite of vinclozolin, which undergoes further conjugation to glucuronic acid, and 2-[[[(3,5-dichlorophenyl)-carbamoyl]oxy]-2-methyl-3,4-dihydroxy-butanoic acid (M6), a dihydroxylated metabolite of M1.

KEYWORDS: Vinclozolin; *in vitro* and *in vivo* metabolism; toxicology; endocrine disruptor

INTRODUCTION

Vinclozolin[3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyl-1,3-oxazolidine-2,4-dione] is a nonsystemic dicarboximide fungicide efficient in controlling plants or fruit diseases caused by *Botrytis* spp., *Monilia* spp., or *Sclerotinia* spp. Vinclozolin (VZ) undergoes spontaneous hydrolysis in aqueous media, giving three products, 2-[[[(3,5-dichlorophenyl)-carbamoyl]oxy]-2-methyl-3-butenic acid (M1), 3',5'-dichloro-2-hydroxy-2-methylbut-3-enanilide (M2), and 3,5-dichloroaniline (M3) (1). M1 and M2 are responsible for the antiandrogenic effects attributable to vinclozolin since they competitively inhibit the binding of androgens to human androgen receptor (hAR) and inhibit androgen-induced gene expression *in vitro* and *in vivo* (2, 3). When administered during sexual differentiation, this fungicide has been shown to demasculinize and feminize the male rat offspring who display female-like anogenital distance at birth, retain nipples, a blind vaginal pouch, hypospadias, suprainguinal ectopic testes, and small to absent sex accessory glands (4–6). It has been demonstrated that VZ inhibits testosterone induced growth of androgen-dependent tissues (ventral prostate, seminal vesicles, and levator ani plus bulbocavernosus muscles) in a dose-additive manner in the Hershberger assay using castrated immature testosterone-treated rats (7). Hotchkiss et al. (8) also

observed that neonatal injection of vinclozolin (200 mg/kg/day) demasculinized aggressive play behavior in male rats at 35 days of age, indicating that it altered CNS sexual differentiation in an antiandrogenic manner. Moreover, VZ can exert antiandrogenic effects in fish and mollusks, where this pesticide has been shown to cause a significant reduction of ejaculated sperm cells, smaller testes, and disrupted male courtship behavior in guppies (*Poecilia reticulata*) (9), and reduced penis length and accessory male sex organs in two prosobranch snails species, *Marisa cornuarietis* and *Nucella lapillus* (10). It has recently been demonstrated that embryonic exposure to VZ at the time of gonadal sex determination caused a transgenerational effect on male rat fertility and testis function (11). Adult animals from F1 to F4 generations developed a number of disease states or tissue abnormalities including prostate disease, kidney disease, immune system abnormalities, spermatogenesis abnormalities, breast tumor development, and blood abnormalities including hypercholesterolemia (12). The incidence or prevalence of these transgenerational disease states was high, from 10% for tumors to more than 50% for prostatic lesions in all generations, indicating that transgenerational effects were transmitted through epigenetic alterations (involving apparent permanent DNA methylation) in the male germline (i.e., sperm) (13).

Knowing the metabolic fate of VZ and its primary degradation products M1 and M2 in rat is of considerable interest to better understand the processes involved in the toxicological effects

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33 561 285 002. Fax: +33 561 285 244. E-mail: jcravedi@toulouse.inra.fr.

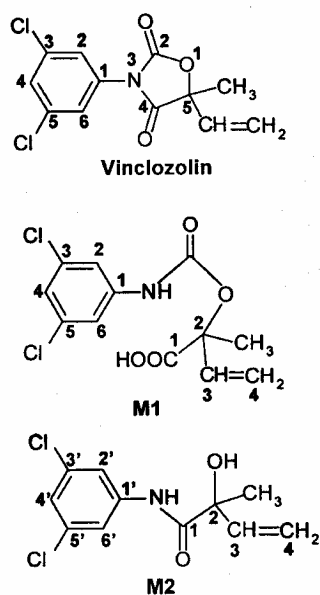


Figure 1. Structures of vinclozolin, M1, and M2.

of this molecule. Since the sequential metabolic steps in precision-cut liver slices are similar to those occurring *in vivo* (14) and because the retention of heterogeneous cell population and liver architecture is close to the physiological situation *in vivo* (15), we used this *in vitro* model to study the metabolism of VZ in Wistar rats. Our investigations also include kinetic data. The *in vivo* metabolic profile of VZ was also examined in the urine of rats for comparison with the biotransformation pattern obtained *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. [Ring-U- ^{14}C]-VZ was purchased from IZOTOP (Budapest, Hungary). Its specific activity was 71.17 MBq/mmol and its radiopurity $\geq 99\%$, as controlled by radio-HPLC. Unlabeled VZ was extracted from Ronilan (BASF France, Levallois-Perret) as described by Molina-Molina (16). Briefly, VZ was extracted with dichloromethane, and then the extract was evaporated to dryness, dissolved in methanol, and recrystallized. Solid vinclozolin was then ground to powder, and its purity was checked by melting point measurement on a Büchi 510 apparatus (108 °C corresponding to the value given in the literature) and was analyzed by HPLC coupled to a diode array detector (Spectra, Thermo Electron, Courtaboeuf, France). Its chemical purity was found to be greater than 97%. [^{14}C]-7-Ethoxycoumarin (7-EC) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK). 7-EC, standard 3,5-dichloroaniline PESTANAL, Krebs-Henseleit buffer, and Dubelco's modified eagle medium (DMEM) were from Sigma-Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France).

Standard dihydroxylated M1, M2, and VZ on the vinyl group were chemically produced by catalytic amounts of osmium tetroxide with *N*-methylmorpholine *N*-oxide. The purified glycols were then analyzed by mass spectrometry, and their retention times were controlled by UV detection at 260 nm for comparison with metabolites.

All chemicals, solvents, and reagents for the preparation of buffers and HPLC eluents were of the highest grade commercially available from Merck (Nogent-sur-Marne, France). Ultrapure water from Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) was used for *in vitro* preparations and HPLC mobile phases.

Animals. Male Wistar rats weighing about 250 g were purchased from Iffa Credo (L'Arbresle, France). Upon arrival at the animal facility, animals were allowed at least 1 week of acclimation prior to experimentation. Animals were given free access to laboratory diet (UAR 210; Villemoisson sur Orge, France) and tap water.

Liver Slice Preparation and Incubation. In each experiment, the animals were killed by cervical dislocation, followed by immediate

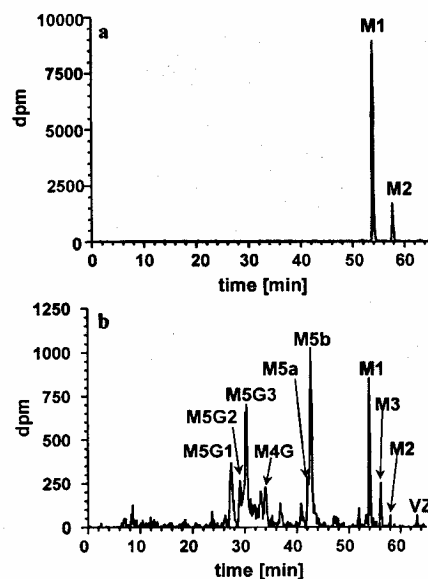


Figure 2. Typical radio-HPLC profile of [^{14}C]-vinclozolin metabolites present in rat liver slice culture medium (DMEM). Incubation and HPLC conditions were as described in the Materials and Methods section. Substrate final concentration was 10 μM . (a) incubation without liver slices (6 h); (b) incubation with liver slices (6 h).

exsanguination. Rat livers were perfused with 40 mL of ice-cold (4 °C) oxygenated Krebs-Henseleit buffer to remove blood. Liver cores were obtained using a stainless steel tube and drill press and immediately placed in ice-cold buffer. A Krumdieck tissue slicer (Alabama Research and Development Corp., Munford, AL) was used to produce precision-cut slices of 8 mm diameter and 0.2 mm thickness (17). An equilibration period of 45 min allowed for the sloughing of damaged cells and for recovery of Ca^{2+} and K^{+} homeostasis in the slices. At the end of incubations, the mean wet weight of slices was 20 mg, containing about 2 mg of protein. Slices were incubated in 12-well plastic tissue culture plates (18) using DMEM medium. The incubation volume was 1 mL. Plates were maintained at 37 °C in a rotary shaker, set at 90 rpm and saturated with a 95% O_2 /5% CO_2 atmosphere. For each experiment, incubations were performed in triplicate using liver slices from three different rats. VZ was introduced dissolved into 2 μL of DMSO. In a first experiment, 6 incubation times (1, 2, 3, 4, 5, and 6 h) with one concentration (10 μM) of labeled VZ (3150 Bq/incubation) were tested. In a second experiment, 5 concentrations (5, 10, 50, 100, and 250 μM) of labeled VZ (3150 Bq/incubation) were incubated for 4 h. Blank samples were carried out by incubating 10 μM radiolabeled VZ (3150 Bq/incubation) in DMEM without rat liver slices in the conditions described above for 1 to 6 h. In each case, at the end of incubation, media samples were immediately harvested and stored at -20 °C until analysis.

Liver Slice Viability. 7-Ethoxycoumarin (7-EC) was used as a probe substrate for oxidative and conjugative metabolism, to assess the drug-metabolizing capacity of the rat liver slices. Control incubations were performed in triplicate using ^{14}C -labeled 7-EC 25 μM during 4 h for the rat liver slices.

In Vivo Metabolic Studies. Three male rats were individually housed in metabolic cages. Animals were individually fed by gavage with 1 mg/kg [^{14}C]-VZ dissolved in DMSO and adjusted with unlabeled VZ to obtain a final activity of 0.481 MBq [^{14}C]-VZ/kg b.w. The final concentration of VZ in DMSO was 1 mg/mL. Urine was collected for 24 h and stored at -20 °C until analysis.

Analytical Procedure. All samples were individually thawed immediately before analysis. The radioactivity of each incubation medium was measured from aliquots (50 μL) by liquid scintillation counting in a Packard Tricarb 4430 counter with Ultima Gold (Packard Instruments Co., Downers Grove, IL) as the scintillation cocktail.

Aliquots (100 μL) of media samples from liver slice incubation or from rat urine were centrifuged for 5 min at 8600g, and the supernatant

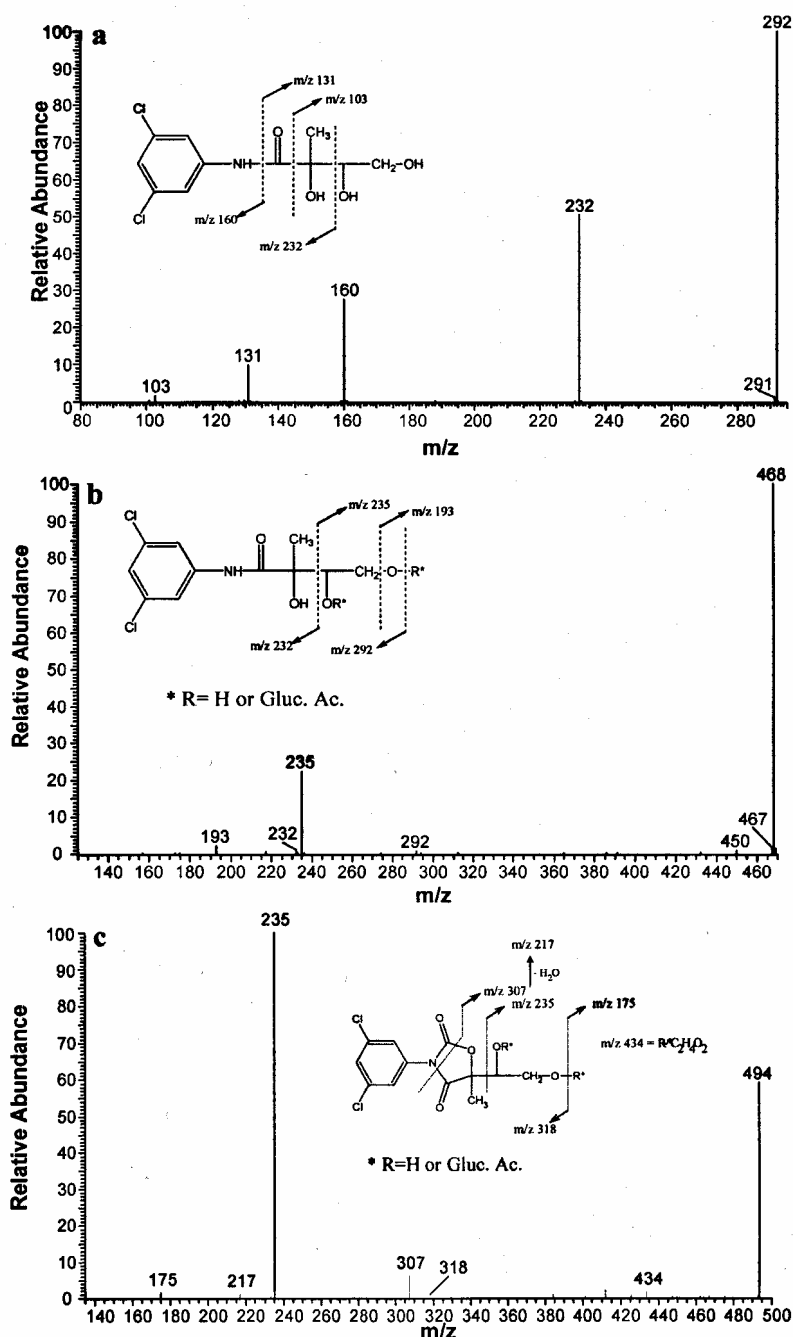


Figure 3. ESI-MS/MS mass spectra of M5 (a), M5 glucuronides (b), and M4 glucuronide (c).

was diluted with 400 μL of the corresponding HPLC system mobile phase A. HPLC coupled to online radioactivity detection (Flo-One A-500 instrument with Flo-scint II as scintillation cocktail, Packard Instrument Co.) was used for metabolite profiling. HPLC separations were performed on a Kromasil C18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μm) coupled to a Nucleodur C8 column (250 \times 4.6 mm, 5 μm). The C18 column was protected by a Kromasil C18 guard precolumn (18 \times 4.6 mm, 5 μm). Collection of radioactive peaks for MS analysis was carried out with a Gilson Model 202 fraction collector (Gilson, Villiers-Le-Bel, France). Briefly, 5 fractions per minute were obtained. For each of the main peaks, only the fraction in the middle of the peak was purified for further analysis.

The mobile phases consisted of ammonium acetate buffer (20 mM, pH 3.5) and acetonitrile 80:20 v/v in A and 30:70 v/v in B. The flow rate was 0.7 mL, and the temperature was 35 $^{\circ}\text{C}$. The gradient used was 0–41 min linear gradient from 0% to 40% B, 41 to 44 min linear

gradient from 40% to 90% B, 44 to 49 min linear gradient from 90% to 100% B, 49 to 66 min linear gradient from 100% B, and 66 to 81 min linear gradient from 100% B to 100% A. Metabolites were quantified by integrating the area under the radioactivity detected peaks.

Biotransformation of [3- ^{14}C]-7-EC to radiolabeled 7-hydroxycoumarin, 7-hydroxycoumarin sulfate, and 7-hydroxycoumarin glucuronide was analyzed by radio-HPLC as previously described (19).

Metabolite Identification. Analyses were carried out on a quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan LCQ, Thermo Finnigan, Les Ulis, France) fitted with an electrospray ionization source operating in the negative ion mode. Samples (typically 0.3–1 ng/ μL in methanol–water (50–50, v/v)) were directly introduced into the ionization source via a syringe pump operating at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The heated capillary was maintained at 200 $^{\circ}\text{C}$. Typical operating parameters for production and transmission of electrospray produced ions into the ion trap analyzer were needle voltage 4.8–5.3 kV, nebulizing gas flow rate 40 arb-units,

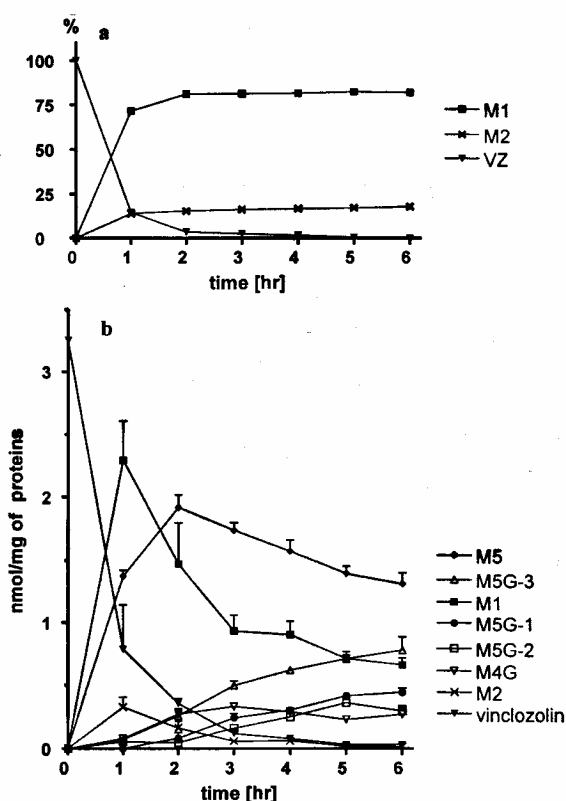


Figure 4. Time course study of the hydrolysis/biotransformation of vinclozolin. (a) Spontaneous hydrolysis of vinclozolin in DMEM at 37 °C. (b) Metabolism of vinclozolin in precision-cut rat liver slices. The concentration of vinclozolin in the incubation medium (DMEM) was 10 μ M. The values are the means of three rats, and the error bars correspond to SD.

transfer capillary voltage -30 to $+10$ V, and tube lens offset -35 to $+10$ V. Other parameters for MS/MS experiments were as follows: isolation width 1 amu and excitation time 30 ms. Excitation voltage was adjusted for each compound in order to get maximum structural information for the compound of interest (typically 0.8 – 1.2 V_{p-p}). All analyses were achieved under automatic gain control conditions using helium as damping as well as collision gas for MS/MS experiments.

Data Analysis. Data analysis was conducted using an unpaired Student's *t*-test using Instat (Graph Pad software). Differences were considered significant if $P < 0.05$. K_m and V_{max} values were determined by nonlinear regression analysis as indicated by Loft and Poulsen (20).

RESULTS

Metabolism of Vinclozolin in Rat Liver Slices. After incubation of radiolabeled VZ with the precision-cut liver slices, about 80% of the initial radioactivity was found in the incubation media for all the concentrations tested. No further analysis was undertaken on the radiolabeled material remaining in the slices.

The qualitative and quantitative results obtained with incubation of 7-EC with rat liver slices were in accordance with those reported previously (21) with more than 50% of 7-EC metabolized in 4 h into 7-hydroxycoumarin, 7-hydroxycoumarin-glucuronide, and 7-hydroxycoumarin-sulfate, indicating a good metabolic capacity of the rat liver slices used.

Identification of Metabolites. The radio-HPLC analysis of the media control incubation revealed that about 85% of VZ was hydrolyzed after only 1 h in DMEM at 37 °C, giving two breakdown products; after 6 h, the parent compound was totally hydrolyzed (Figure 2). These products were identified by ESI-

MS/MS and by comparison with data from the literature (1, 22). The major one ($R_T = 53.8$ min) gave an $[M - H]^-$ ion at m/z 302 and characteristic fragment ions at m/z 258, 175, and 115, corresponding to M1. The NI-ESI-MS spectrum of the second one ($R_T = 58$ min) displayed an $[M - H]^-$ ion at m/z 258 whose MS/MS analysis gave a fragment ion at m/z 160 diagnostic of M2. No other degradation products were observed.

Biotransformation of VZ by rat liver slices was extensive (Figure 2). The radio-HPLC profiles obtained in our experimental conditions were qualitatively similar whatever the concentration tested or the duration of incubation. Collection of the radioactive peaks was carried out prior to MS analysis of metabolites. The identification of metabolites was performed only on 100 μ M incubations.

Peaks M5a and M5b ($R_T = 42.6$ and 43 min) were incompletely separated and gave the same $[M - H]^-$ ion at m/z 292 accompanied by the isotopic contribution of the ^{37}Cl atoms giving an ion at m/z 294. After isolation and fragmentation of the m/z 292 precursor ion into the ion trap device, the MS/MS spectrum presented in Figure 3a was obtained. Diagnostic fragment ions were observed at m/z 103, 131, 160, and 232. The complementary fragment ions at m/z 160 and 131 correspond to the cleavage of the amide bond of M5 with negative charge retention being possible on both sides of the molecule. α -Cleavages of the tertiary alcohol explain the occurrence of the fragment ions at m/z 103 and 232, respectively. On the basis of these data, peaks M5a and M5b could be identified as two different forms (likely diastereoisomers) of 3',5'-dichloro-2,3,4-trihydroxy-2-methylbutyranilide (M5). In order to confirm this identification, a chemical hydroxylation of M2 was carried out using osmium tetroxide. The resulting compound displayed a R_T of 42.6 min. when injected in the same HPLC system. The corresponding MS and MS/MS spectra were super imposable with those obtained for M5a.

The negative ESI mass spectrum of peaks M5G1, M5G2 and M5G3 ($R_T = 27.6$, 29.2 and 30.3 min respectively) gave an intense signal at m/z 468 with the characteristic isotopic pattern of a doubly chlorinated molecule (i.e., m/z 470 present at ca. 65% intensity relative to m/z 468). The MS/MS spectrum of the m/z 468 precursor ion of the first peak is presented in Figure 3b. It displays characteristic fragment ions at m/z 193, 232, 235, and 292, which could be attributed to the fragmentation pattern presented in Figure 3b. These characteristic fragment ions allowed us to identify M5G1 as a glucuronic acid conjugate of M5. The m/z 235 fragment ion allowed us to rule out the glucuronidation on the tertiary alcohol group of M5. However, on the basis of the structural information available on the MS/MS spectrum, we were not able to determine the position of glucuronidation, which may concern either the primary or the secondary hydroxyl function of M5. The MS/MS spectra obtained from the m/z 468 ion of M5G2 and M5G3 were identical to that of M5G1. Thus, these peaks also corresponded to M5 glucuronides. The presence of several peaks for M5 glucuronides can be attributed to (i) the two possible positions of glucuronidation evidenced by MS/MS analysis and (ii) the occurrence of diastereoisomeric forms of M5 glucuronide, which may be separated by reversed phase HPLC.

The isotopic pattern of a chlorinated metabolite was located at m/z 494/496 on the NI-ESI mass spectrum of peak M4G ($R_T = 34$ min). For getting structural information, the m/z 494 ion was selected and submitted to resonant excitation in an MS/MS experiment (Figure 3c). The main resulting fragment ions were produced at m/z 235 and 307. A weak signal was also observed at m/z 175, suggesting the occurrence of a glucuronic

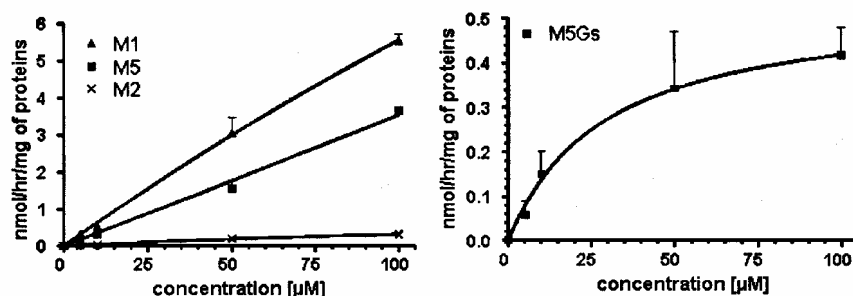


Figure 5. Michaelis–Menten plots of vinclozolin biotransformation in precision-cut rat liver slices. Slices were incubated for 4 h with various concentrations of vinclozolin. The values are the means of three rats, and the error bars correspond to SD. (Left) Formation of M1, M2, and M5. (Right) Formation of M5 glucuronides (total glucuronides of M5 were measured for calculations).

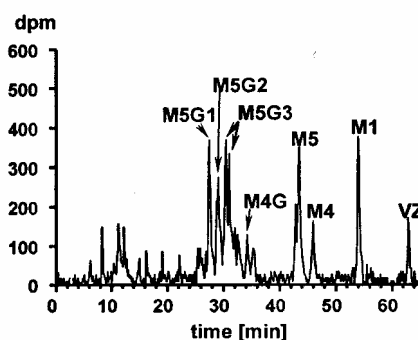


Figure 6. Zero to 24 h urinary radio-HPLC profile from rats force-fed a single dose of [¹⁴C]-vinclozolin (1 mg/kg bw).

acid conjugate. The *m/z* 235 fragment ion could reasonably present the same structure as that indicated for M5 glucuronide (see Figure 3). The formation of the *m/z* 307 ion can result in the cleavage of the five-membered heterocycle considering that no metabolic ring opening occurred on VZ in this case. Thus, this peak was identified as the glucuronic acid conjugate of 3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-(1,2-dihydroxyethyl)-1,3-oxazolidine-2,4-dione (M4).

M3 coeluted with standard 3,5-dichloroaniline ($R_T = 56.2$ min) monitored by UV detection at 212 nm.

Kinetics of VZ Hydrolysis and Metabolism in Rat Liver Slices. The hydrolysis time course of VZ in DMEM at 37 °C is shown in Figure 4a. VZ is almost totally hydrolyzed in 2 h, giving M1 (about 80%) and M2 (about 20%).

The kinetics of formation of [¹⁴C]-VZ metabolites by rat liver slices is shown in Figure 4b. The amount of VZ in incubation media rapidly decreased and represented about 15% of total radioactivity after 1 h, about 6% after 2 h, and less than 2% after 4 h. The amounts of M1 and M2 reached the maximum values after about 1 h, accounting for more than 34% of total radioactivity for M1 and 4% for M2, whereas for M5, the maximum values were reached after about 2 h, corresponding to about 36% of the total radioactivity. After reaching the maximum values, a steady decrease of the concentrations of these three metabolites was observed, M1 accounting for 12% of the total radioactivity at 6 h of incubation, M5 still representing more than 21% at the same sampling time, whereas only traces of M2 were detected. After 2 h, M5 was the major metabolite at all time points. M5-glucuronides (M5G1, M5G2, and M5G3) increased after about 1 h to represent 33% of the total radioactivity after 6 h. M4G increased to represent about 6% of the total radioactivity after 3 h of incubation. 3,5-Dichloroaniline represented between 2 and 3% of the total radioactivity present in incubation media at all time points (data not shown).

Metabolite formation over the concentration range is shown in Figure 5. Because of an incomplete solubilization of VZ at 250 μ M, the results corresponding to this concentration were not represented. M1 and M5 formations were linear up to 100 μ M in precision-cut liver slices (Figure 5, left). M2 appeared to be produced under saturation kinetics with apparent $V_{max} = 1.22 \pm 0.92$ nmol/h/mg of protein. However, M1 and M2 are produced by nonenzymatic hydrolysis of VZ; thus, the saturation-look of M2 production is due to its biotransformation into M5 and M5 glucuronides, while its production is limited by the VZ hydrolysis into M1. M5 conjugation to glucuronic acid over the concentration range is represented in Figure 5, right. Since separation of the M5G1, M5G2, and M5G3 peaks did not allow a precise quantification of these metabolites, the kinetic data were calculated by using the sum of the glucuronide conjugates produced from M5 (M5Gs) at each concentration. Total M5Gs were produced under saturation kinetics with apparent $V_{max} = 0.54 \pm 0.14$ nmol/h/mg of protein and $K_m = 29.14 \pm 20.76$ μ M.

Identification of Urinary Metabolites. An average of 24% of the administered radioactivity was found in 0–24 h urine samples. The radio-HPLC profile corresponding to pooled urine samples of male rat urine 24 h after being force fed is shown in Figure 6. The major metabolites were identified by ESI/MS-MS as M5G1, M5G2, M5G3, M4G, M5, and M1. Several additional peaks corresponding to polar compounds were detected at elution times between 8 and 14 min. Probably because of an incomplete separation of several minor metabolites, we failed to identify these compounds. Another additional peak was detected at $R_T = 46$ min. Its analysis by negative ESI-MS gave a signal corresponding to the $[M - H]^-$ ion of two dichlorinated species at *m/z* 318/320 and *m/z* 336/338. By MS/MS analysis, the *m/z* 318 ion yielded main characteristic fragment ions at *m/z* 160, 258, and 274. The first one corresponded to the deprotonated form of dichloroaniline, whereas the *m/z* 258 and 274 fragment ions resulted in the elimination of HO-CH=CH-OH and CO₂, respectively, from the *m/z* 318 $[M - H]^-$ precursor ion. These data supported the identification of this peak as 3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-(1,2-dihydroxyethyl)-1,3-oxazolidine-2,4-dione (M4). This was also confirmed by LC and MS/MS analysis of the glycol resulting from the chemical hydroxylation of VZ by osmium tetroxyde, which gave both a R_T of 46 min and the same fragment ions as M4 after MS/MS analysis of the *m/z* 318 precursor ion. Besides, the MS/MS spectrum of the *m/z* 336 ion displayed a unique fragment ion at *m/z* 149. The chemical hydroxylation of M1 by osmium tetroxyde gave a compound with a R_T of 46 min, also displaying an $[M - H]^-$ isotopic cluster at *m/z* 336/338. The MS/MS analysis of the *m/z* 336 ion also yielded a unique fragment ion at *m/z* 149, corresponding to the

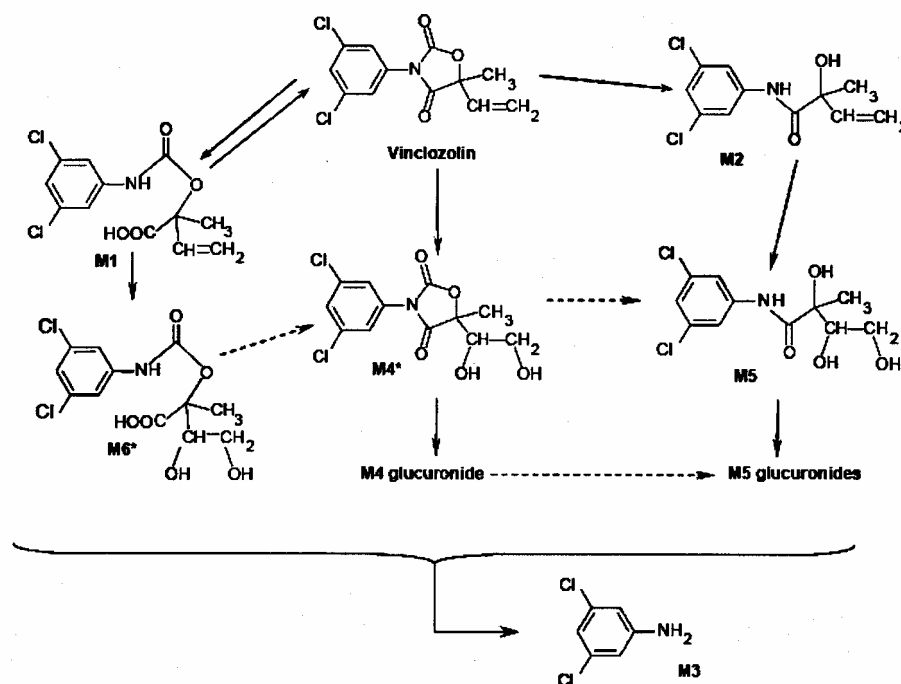


Figure 7. Proposed metabolic pathways of the *in vitro* (precision-cut rat liver slices) and *in vivo* biotransformation of vinclozolin. (*) Only present in rat urine.

cleavage of the ester function of this compound with charge retention on the nonaromatic part of the molecule. On the basis of the comparison of both retention time and MS/MS spectra, this metabolite was identified as 2-[[[(3,5-dichlorophenyl)-carbamoyl]oxy]-2-methyl-3,4-dihydroxy-butanoic acid (M6). From 24 h after the force-feeding, M5 and its conjugates to glucuronic acid were the major metabolites present in urine with M1.

DISCUSSION

The present study characterizing VZ metabolites produced *in vitro* in liver slices and *in vivo* provides evidence that VZ and corresponding breakdown products are efficiently biotransformed by rats.

Spontaneous hydrolysis of VZ occurred in the incubation medium without slices. This result was expected since the hydrolysis of VZ in various aqueous buffers was described by Szeto et al. (1). These authors demonstrated that the reaction was base-catalyzed and that the rate of hydrolysis was proportional to pH. At 35 °C and pH 7.0, 10% of VZ (40 μ M) hydrolyzed after 1 h to yield M1 (8.5%) and M2 (1.5%), whereas at pH 8.0, 47% of VZ was converted to M1 (39%) and M2 (8%) after 1 h. In our experimental conditions (incubations in DMEM without slices) and after the same period of time, M1 and M2 accounted for 72 and 13% of total radioactivity, respectively, suggesting that the conversion of VZ to M1 and M2 could also be partly due to DMEM catalysis of the reaction. M3 could not be observed because the incubation times were too short (1).

Although the chemical conversion of VZ to M1 is known to be reversible, the formation of VZ from M1 by recyclization only occurs at a significant extent at acidic pH (1). Taking into consideration that our incubations were undertaken at pH 7.4, it was likely that only very minute amounts of M1, if any, could be converted back to VZ. When incubations were performed with liver slices, the concentration of M1 increased steadily to

a maximum after 1 h and decreased gradually thereafter. We observed that a dihydroxylated metabolite of M1 (M6) can be produced. However, no phase II metabolites originating from M1 were identified, and the amount of M6 produced could not explain the decrease in M1 amount. This result could be explained by the recyclization of M6 to give M4, which can undergo hydrolysis to give M5 (data not shown). It is also possible that M6 undergoes further biotransformation into unidentified metabolites. Moreover, the rapid biotransformation of M2 could result in a concomitant hydrolysis of VZ to M2, favoring the subsequent conversion of M1 to VZ. At the same time, M2 is always present in very small amounts because it is readily metabolized, giving M5 and M5 glucuronides. After 6 h, VZ and M2 were present only in trace amounts, while glucuronides of M5 and M4 represented about 33% of the total radioactivity.

The major metabolic pathways of VZ are summarized in Figure 7. The same metabolites involving phase I and phase II enzymes are characterized from rat urine and from rat liver slices. The first step is the hydrolytic opening of the oxazolidinone ring, involving nonenzymatic cleavage of the 2-, 3-, or 3,4-nitrogen-carbon bonds, to give M2 and M1 compounds, respectively. Cleavage of the 2,3-nitrogen-carbon bond is followed by decarboxylation and is not reversible, in contrast to the cleavage of the 3,4-nitrogen-carbon bond (1). The enzymatic phase-I step includes the dihydroxylation of the vinyl group, presumably via an epoxyde intermediate, resulting in metabolite M4 from VZ, metabolite M5 from M2, and M6 from M1. Phase-II pathways include extensive conjugation to glucuronic acid of the dihydroxylated M4 and M5 compounds, giving three glucuronides. These pathways are in agreement with those reported previously in unpublished reports (23). M5 has also been reported as a fungal metabolite of VZ (24). M5 can be obtained also from M4 by hydrolytic cleavage of the 2,3-nitrogen-carbon bond. Moreover, the same hydrolysis could happen with M4 conjugates, giving M5 conjugates,

explaining that the major metabolites identified in rat liver slice incubation media are M5 and M5 conjugates. On the basis of the R_T of standard 3,5-dichloroaniline, M3 seemed to be present only in precision-cut rat liver slice incubation media. M3 is a well described end product of VZ degradation (1, 25) but was not detected in rat urine, probably because 3,5-dichloroaniline undergoes further biotransformation, such as hydroxylation and conjugation to glucuronic acid (26).

In vitro and *in vivo*, the major metabolites identified are M1 (hydrolysis product), M5 (dihydroxylated metabolite from M2), and M5 glucurono-conjugates, and to a lesser extent M4 and its glucuronoconjugate. VZ antiandrogenic activity is described to be mainly due to M2 and M1 since they compete with [17 α -methyl]-methyltrienolone (R1881) for the androgen receptor with a K_i of 9.7 and 92 μ M, respectively, that is about 100- and 10-fold more effective than VZ itself (3).

Data on the fate of VZ in humans are also scarce. The presence of VZ residues in human serum and urine was investigated recently (27–31). In some cases, only VZ was determined, whereas in others, the sum VZ + metabolites was estimated, on the basis of the quantification of 3,5-dichloroaniline, determined after basic or acidic hydrolysis of the samples. No data on the metabolic pathways of VZ in humans were identified.

This is the first published study on the metabolic fate of VZ in rats *in vivo* and *in vitro*, including identification of the major metabolites and kinetics of biotransformation. It demonstrates that M1 and M2, which are mainly responsible of the antiandrogenic effects attributable to VZ, are not the end products of the biotransformation of VZ in rats. VZ and M2 are quickly biotransformed by dihydroxylation of the vinyl group and by further conjugation to glucuronic acid. The activity of these metabolites toward the androgen receptor remains to be definitively established.

ABBREVIATIONS USED

AR, androgen receptor; CNS, central nervous system; DMEM, Dubelcco's modified eagle medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; 7-EC, 7-ethoxycoumarin; ESI, electrospray ionization; HPLC, high-performance liquid chromatography; LC-MS, combined high-performance liquid chromatography/mass spectrometry; MS, mass spectrometry; R_T , retention time; UV, ultraviolet; VZ, vinclozolin.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Florence Blas y Estrada and Raymond Gazel for animal care.

LITERATURE CITED

- (1) Szeto, S. Y.; Burlinson, N. E.; Rahe, J. E.; Oloffs, P. C. Kinetics of hydrolysis of the dicarboximide fungicide vinclozolin. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 523–529.
- (2) Kelce, W.; Monosson, R.; Gamcsik, E.; Laws, M. P.; Gray, S. C.; L. E. Jr. Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1994**, *126*, 276–85.
- (3) Kelce, W. R.; Lambright, C. R.; Gray, L. E., Jr.; Roberts, K. P. Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, *142*, 192–200.
- (4) Gray, L. E., Jr.; Ostby, J. S.; Kelce, W. R. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1994**, *129*, 46–52.
- (5) Shono, T.; Suita, S.; Kai, H.; Yamaguchi, Y. The effect of a prenatal androgen disruptor, vinclozolin, on gubernacular migration and testicular descent in rats. *J. Pediatr. Surg.* **2004**, *39*, 213–6.
- (6) Shono, T.; Suita, S.; Kai, H.; Yamaguchi, Y. Short-time exposure to vinclozolin *in utero* induces testicular maldescent associate with a spinal nucleus alteration of the genitofemoral nerve in rats. *J. Pediatr. Surg.* **2004**, *39*, 217–9, discussion 217–9.
- (7) Kang, I. H.; Kim, H. S.; Shin, J. H.; Kim, T. S.; Moon, H. J.; Kim, I. Y.; Choi, K. S.; Kil, K. S.; Park, Y. I.; Dong, M. S.; Han, S. Y. Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p,p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology* **2004**, *199*, 145–59.
- (8) Hotchkiss, A. K.; Ostby, J. S.; Vandenberg, J. G.; Gray, L. E., Jr. An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiol. Behav.* **2003**, *79*, 151–6.
- (9) Baatrup, E.; Junge, M. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 1063–70.
- (10) Tillmann, M.; Schulte-Oehlmann, U.; Duft, M.; Markert, B.; Oehlmann, J. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails *Mollusca: Gastropoda*) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* **2001**, *10*, 373–88.
- (11) Anway, M. D.; Cupp, A. S.; Uzumcu, M.; Skinner, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* **2005**, *308*, 1466–9.
- (12) Anway, M. D.; Leathers, C.; Skinner, M. K. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* **2006**, *147*, 5515–23.
- (13) Chang, H. S.; Anway, M. D.; Rekow, S. S.; Skinner, M. K. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology* **2006**, *147*, 5524–41.
- (14) Parrish, A. R.; Gandolfi, A. J.; Brendel, K. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci.* **1995**, *57*, 1887–901.
- (15) Ekins, S.; Williams, J. A.; Murray, G. I.; Burke, M. D.; Marchant, N. C.; Engeset, J.; Hawksworth, G. M. Xenobiotic metabolism in rat, dog, and human precision-cut liver slices, freshly isolated hepatocytes, and vitrified precision-cut liver slices. *Drug. Metab. Dispos.* **1996**, *24*, 990–5.
- (16) Molina-Molina, J. M.; Hillenweck, A.; Jouanin, I.; Zalko, D.; Cravedi, J. P.; Fernandez, M. F.; Pillon, A.; Nicolas, J. C.; Olea, N.; Balaguer, P. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *216*, 44–54.
- (17) Krumdieck, C. L.; dos Santos, J. E.; Ho, K. J. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal. Biochem.* **1980**, *104*, 118–23.
- (18) Dogterom, P. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug. Metab. Dispos.* **1993**, *21*, 699–704.
- (19) Zalko, D.; Perdu-Durand, E.; Debrauwer, L.; Bec-Ferte, M. P.; Tulliez, J. Comparative metabolism of clenbuterol by rat and bovine liver microsomes and slices. *Drug. Metab. Dispos.* **1998**, *26*, 28–35.
- (20) Loft, S.; Poulsen, H. E. Metabolism of metronidazole and antipyrine in isolated rat hepatocytes. Influence of sex and enzyme induction and inhibition. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 1125–36.
- (21) Ekins, S.; Murray, G. I.; Burke, M. D.; Williams, J. A.; Marchant, N. C.; Hawksworth, G. M. Quantitative differences in phase I and II metabolism between rat precision-cut liver slices and isolated hepatocytes. *Drug. Metab. Dispos.* **1995**, *23*, 1274–9.
- (22) Dhananjayan, M. R.; Erhardt, P. W.; Corbitt, C. Simultaneous determination of vinclozolin and detection of its degradation products in mouse plasma, serum and urine, and from rabbit bile, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1115*, 8–18.

- (23) Watson, W. Vinclozolin Pesticide Residues in Food: 1995 Evaluations. Part II: Toxicological & Environmental. IPCS INCHEM, 1995. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr18.htm>.
- (24) Pothuluri, J. V.; Freeman, J. P.; Heinze, T. M.; Beger, R. D.; Cerniglia, C. E. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6138–6148.
- (25) Cabras, P.; Diana, P.; Meloni, M.; Pirisi, F. M.; Pirisi, R. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of pesticides. VII. Analysis of vinclozolin, iprodione, procymidone, dichlozolate and their degradation product 3,5-dichloroaniline on white must and wine extracts. *J. Chromatogr.* **1983**, *256*, 176–81.
- (26) Valentovic, M. A.; Lo, H. H.; Brown, P. I.; Rankin, G. O. 3,5-Dichloroaniline toxicity in Fischer 344 rats pretreated with inhibitors and inducers of cytochrome P450. *Toxicol. Lett.* **1995**, *78*, 207–14.
- (27) Carlucci, G.; Pasquale, D. D.; Ruggieri, F.; Mazzeo, P. Determination and validation of a simple high-performance liquid chromatographic method for simultaneous assay of iprodione and vinclozolin in human urine. *J. Chromatogr., B* **2005**, *828*, 108–12.
- (28) Lindh, C. H.; Littorin, M.; Amilon, A.; Jonsson, B. A. Analysis of 3,5-dichloroaniline as a biomarker of vinclozolin and iprodione in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 536–42.
- (29) Moreno Frias, M.; Garrido Frenich, A.; Martinez Vidal, J. L.; Mateu Sanchez, M.; Olea, F.; Olea, N. Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B* **2001**, *760*, 1–15.
- (30) Turci, R.; Barisano, A.; Balducci, C.; Colosio, C.; Minoia, C. Determination of dichloroanilines in human urine by gas chromatography/mass spectrometry: validation protocol and establishment of Reference values in a population group living in central Italy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2621–5.
- (31) Wittke, K.; Hajimiragha, H.; Dunemann, L.; Begerow, J. Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure. *J. Chromatogr., B* **2001**, *755*, 215–28.

Received for review September 20, 2007. Revised manuscript received April 14, 2008. Accepted April 15, 2008. This study has been partly supported by the European Union network CASCADE (FOOD-CT-2003-506319).

JF0728045

Expérimentation complémentaire : profils métaboliques urinaires de la vinchlozoline, chez la rate en gestation

Les résultats présentés dans la publication 2 montrent que les principaux métabolites produits *in vivo* chez le rat Wistar mâle sont identiques à ceux identifiés après incubation de la vinchlozoline avec les tranches de foie de rat. Ces expérimentations ont montré qu'ils sont essentiellement issus de la biotransformation de M2, qui demeure un métabolite très minoritaire à la fois *in vitro* et *in vivo*, et dans une moindre mesure de la vinchlozoline. En outre, la formation rapide de ces métabolites à partir de M2 provoque une diminution relativement rapide de M1 *in vitro*.

Comme M1 et M2 sont les deux produits de dégradation qui présentent la plus forte activité antiandrogénique, il nous est apparu important d'étudier les profils urinaires de rates en gestation auxquelles nous avons administré par gavage de la vinchlozoline au moment de la période de différenciation sexuelle des fœtus, afin de déterminer à quels métabolites les fœtus étaient les plus exposés.

Les rates Wistar pesant environ 250 g ont été achetées chez Iffa Credo (L'arbresle, France). A leur arrivée à l'animalerie, les animaux ont subi une semaine d'acclimatation avant toute expérimentation, avec un accès libre à la nourriture (UAR 210; Villemoisson sur Orge, France) et à l'eau de boisson. Trois rates ont été mises individuellement dans des cages à métabolisme. Elles ont été gavées aux 12^{ème}, 14^{ème}, 16^{ème} et 18^{ème} jours de gestation avec 30mg/kg [¹⁴C]-vinclozolin dissoute dans du DMSO et ajustée avec de la vinclozolin froide pour obtenir une activité finale de 0.481 MBq [¹⁴C]-VZ/kg p.c. Les urines ont été collectées toutes les 24 hr pendant 7 jours, et stockées à -20°C jusqu'à analyse. Seules les urines de 24 hr après le premier gavage et celles de 24 hr après le dernier gavage ont été analysées.

Les métabolites sont identiques à ceux de l'expérimentation précédente présents dans les urines des rates en gestation (fig.2). Les profils radio-CLHP des urines montrent que la quantité de M2 est inférieure aux limites de détection à chaque prélèvement, tandis que M1, M5 et ses glucuroconjugués sont les métabolites majeurs dès 24 hr après le premier gavage. M4 et M4G voient également leur proportion croître avec la répétition des gavages.

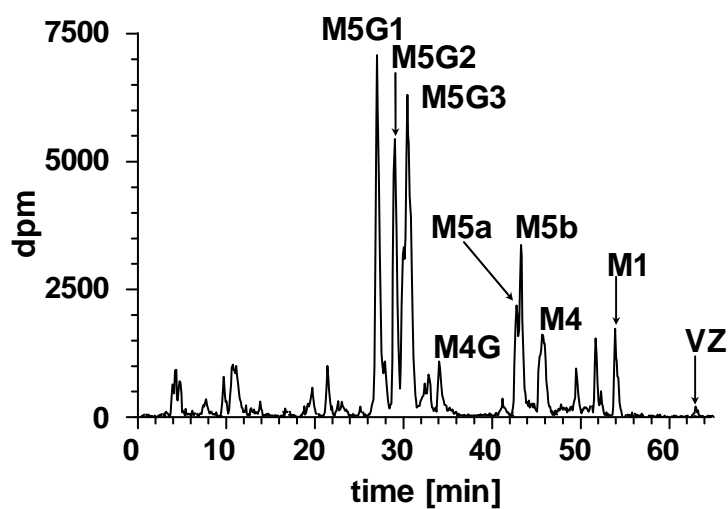
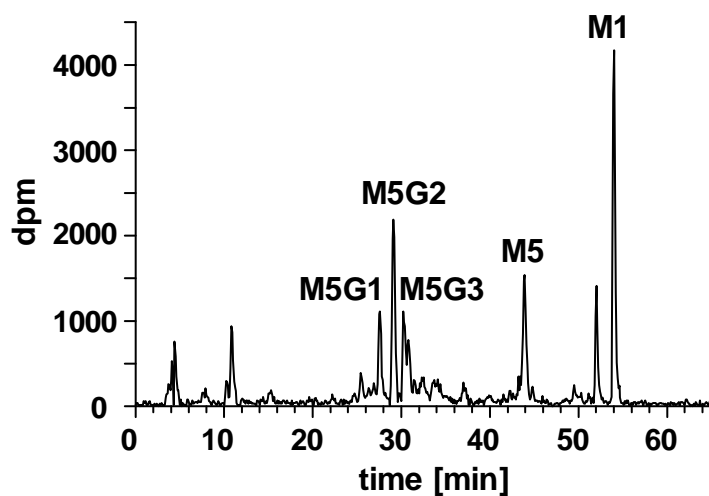


Fig.2 : profil radio-CLHP typique obtenu à partir d'urines de rates en gestation exposées par gavage toutes les 48 hr à 30 mg/kg de [^{14}C]-vinchlozoline dissoute dans du DMSO et ajustée de la vinchlozoline froide (activité finale de 0.481 MBq [^{14}C]-VZ/kg p.c.) :

haut : 24 hr après le premier gavage (J1).

Bas : 24 hr après le troisième gavage (J7).

2 Discussion

L'incubation de la génistéine avec les microsomes des deux espèces a mené à la formation de trois métabolites hydroxylés, que nous avons identifiés par ESI-MS-MS et RMN comme étant la 6-hydroxygénistéine, la 8-hydroxygénistéine et la 3'-hydroxygénistéine ou orobol. Les trois métabolites sont produits par les microsomes de chaque espèce et de chaque sexe. Quantitativement, l'orobol est le métabolite hydroxylé majoritaire chez le rat, tandis que chez l'Homme, l'orobol et la 8-hydroxygénistéine sont tous deux majoritaires et produits en quantités similaires chez l'homme et la femme. Ces deux métabolites sont d'ailleurs produits à un taux plus important chez l'Homme que chez le rat.

Cinq métabolites conjugués ont été produits par les hépatocytes cryoconservés de foie de rat et d'Homme : la génistéine 4'-O-sulfate, 7-O-glucuronoconjuguée, la génistéine conjuguée à l'acide glucuronique en position 4' ou 7, et la génistéine conjuguée au sulfate en position 4' ou 7. Que ce soit chez le rat ou chez l'Homme, le métabolite majoritairement produit est issu de la conjugaison en position 7 de la génistéine à l'acide glucuronique et représente plus de 50% de la radioactivité totale après 24 hr d'incubation. Sa vitesse de production est similaire chez l'homme et le rat. Avec les hépatocytes cryoconservés de rat, le métabolite ayant le second taux de production le plus important est le diconjugué 4'-O-sulfate, 7-O-glucuronide. Il représente environ 25% de la radioactivité totale en fin d'incubation alors que chez l'Homme il est inférieur à 10%. Aucun métabolite hydroxylé n'a été détecté pour les deux espèces.

Ces expérimentations ont montré que la génistéine est métabolisée *in vitro* autant par les microsomes de foie de rat que d'Homme et par les hépatocytes cryoconservés des deux espèces. Pour un même système *in vitro*, les métabolites formés sont identiques entre les espèces. Les cinétiques calculées montrent que l'hydroxylation de la génistéine se fait préférentiellement sur le cycle B en position 3' chez les deux espèces, mais également sur le cycle A en position 8 chez l'Homme. D'après la littérature, ces métabolites hydroxylés ne sont pas toujours tous détectés dans les échantillons d'urines humaines, et lorsqu'ils le sont, ils sont présents sous formes conjuguées au sulfate ou à l'acide glucuronique et représentent moins de 10 % de l'ensemble des isoflavones urinaires (Heinonen et al., 2003, Kulling et al., 2001). Ces observations indiquent que les réactions de phase II sont prédominantes dans les voies de biotransformation de la génistéine, ce qui a été confirmé par nos résultats obtenus par l'utilisation des hépatocytes cryoconservés de rat et d'Homme avec lesquels nous n'avons pas détecté de métabolites hydroxylés, malgré l'expression des enzymes de phase I. Cette absence

pourrait être également due aux propriétés inhibitrices de la génistéine envers certaines enzymes de phase I telles que les CYP1A1, 1A2 et 1B1, décrites par Moon et al. (2006). Chez les deux espèces, le métabolite produit le plus rapidement est la génistéine 7-O-glucuroconjuguée qui a d'ailleurs été décrite comme étant le métabolite majeur présent dans le sang et dans l'urine humaine (Clarke et al., 2002, Doerge et al., 2000).

Nous avons ainsi montré avec ces expérimentations que les voies de biotransformation de la génistéine dans les microsomes ou les hépatocytes cryopréservés étaient identiques entre le rat et l'Homme, les seules différences concernant les cinétiques de production de certains métabolites.

Les métabolites majeurs de la vinchlozoline, présents dans les milieux d'incubation des tranches de foie et dans les urines des rats mâles et femelles en gestation exposés à la vinchlozoline par gavage ont été identifiés par NI-ESI-MS. Ces métabolites sont la 3-(3,5-dichlorophenyl)-5-méthyl-5-(1,2-dihydroxyethyl)-1,3-oxazolidine-2,4-dione (M4, uniquement dans les urines) et ses glucuroconjugués (M4G), le 3',5'-dichloro-2,3,4-trihydroxy-2-méthylbutyranilide (M5) et ses glucuroconjugués (M5G). Nous avons également identifié la 3,5-dichloroaniline dans les milieux d'incubation des tranches de foie, d'après son temps de rétention comparé à celui de la 3,5-dichloroaniline standard. *In vitro* dans les tranches de foie de rat comme *in vivo* dans l'urine de rat mâle ou femelle en gestation, les métabolites majoritaires sont les M5G, M5, M4G, M4 et M1.

Ces expérimentations ont démontré que la vinchlozoline est métabolisée de façon efficace chez le rat Wistar. L'hydrolyse spontanée et rapide de la vinchlozoline dans le DMEM seul, à 37°C, via un clivage non-enzymatique des liaisons carbone-azote en position 2,3- (M2, minoritaire) ou 3,4- (M1 majoritaire) de l'hétérocycle était attendue. Nous avons déduit des observations faites *in vitro* comme *in vivo* que la métabolisation de la vinchlozoline chez le rat Wistar demandait obligatoirement une étape enzymatique de phase I provoquant la dihydroxylation du groupement vinyle, probablement via la formation d'un époxyde intermédiaire, permettant l'obtention des métabolites M4 depuis la vinchlozoline et M5 depuis M2 lesquels peuvent ensuite être conjugués rapidement à l'acide glucuronique sur l'une ou l'autre des fonctions alcool formées. De la même façon que la vinchlozoline s'hydrolyse en M2, M4 et son glucuroconjugué peuvent s'hydrolyser pour donner M5 et l'un de ses glucuroconjugués, rendant ces métabolites d'autant plus majoritaires.

Les profils radio-CLHP des urines de rates en gestation donnent une indication concernant l'identité des métabolites de la vinchlozoline auxquels les fœtus sont susceptibles

d'être exposés. La quantité de M2 présent dans les urines était inférieure aux limites de détection. Cette observation a été également faite avec les urines de rats mâles Wistar. Les données cinétiques obtenues à l'aide des tranches de foie de rat indiquent que M2 semble être un métabolite mineur *in vitro* comme *in vivo*, alors qu'il est le produit de dégradation de la vinchlozoline dont l'activité antiandrogénique est la plus forte (Kelce et al., 1994). Au contraire, nous avons observé que les quantités de M1 présent *in vitro* comme *in vivo* pouvaient être bien plus importantes. Nos données confirment donc que l'activité antiandrogénique de la vinchlozoline pourrait dépendre avant tout de la production de M1 comme l'avait suggéré Kelce et al. (1994) qui ont observé que les concentrations sériques de M1 chez la rate en gestation après un traitement de 100 mg/kg p.c./j pouvaient égaler ou dépasser la K_i calculé pour l'inhibition du récepteur aux androgènes par M1 *in vitro*.

Les profils métaboliques de la vinchlozoline après incubation avec les tranches de foie sont peu différent des profils obtenus avec l'urine de rats mâles ou femelles. Malgré la quantité moindre de métabolites plus polaires, les métabolites majoritaires sont les même *in vitro* et *in vivo*. L'analyse de milieux d'incubation de la génistéine en présence de tranches de foie de rats mâles a montré que les métabolites principaux produits n'étaient pas différents de ceux détectés *in vivo* chez le rat ou chez l'homme (Coldham et Sauer, 2000, Clarke et al., 2002, Doerge et al., 2000, Shelnut et al., 2002). Nous avons donc choisi ce système comme référence en matière de biotransformation afin de pouvoir lui comparer les cellules HepG2, MCF7 et HC11.

Chapitre 2 :

**Caractérisation des capacités métaboliques de trois
lignées cellulaires utilisées dans l'étude des
propriétés des PE *in vitro*.**

1 Introduction

L'étude des propriétés des PE a imposé le développement de différents tests *in vitro* dans le but d'étendre et d'accélérer le screening des substances auxquelles l'Homme peut être exposé. Ces tests utilisant des lignées cellulaires variées incluent en particulier les tests de prolifération cellulaire et d'expression de gènes rapporteurs. L'un des défauts principaux reconnu des lignées cellulaires utilisées est qu'elles ont des capacités métaboliques réduites, ce qui complique l'extrapolation des résultats observés à la situation *in vivo*. Pourtant, peu d'études s'intéressent aux capacités métaboliques des cellules dans les conditions de réalisation des tests et à leur influence sur l'activité des perturbateurs endocriniens testés. Elles sont pourtant susceptibles de sous-évaluer ou au contraire de surévaluer l'activité réelle des molécules testées. Afin d'explorer cette problématique, nous avons choisi trois lignées cellulaires en accord avec deux laboratoires partenaires au sein du réseau CASCADE : le laboratoire de recherche médicale de l'Université de Grenade, et le Département de Biosciences et Nutrition du Karolinska Institutet de Stockholm. Ces lignées cellulaires sont les MCF7 (cellules tumorales de glande mammaire humaine), les HepG2 (carcinome de foie humain) et les cellules HC11 (cellules épithéliales non transformées de glande mammaire de souris).

Nous avons utilisé les tranches de foie de rat comme modèle *in vitro* de référence pour les études de biotransformation.

**Article 3 : BIOTRANSFORMATION OF GENISTEIN AND BISPHENOL A IN CELL
LINES USED FOR SCREENING ENDOCRINE DISRUPTORS**

BIOTRANSFORMATION OF GENISTEIN AND BISPHENOL A IN CELL LINES USED FOR SCREENING ENDOCRINE DISRUPTORS

J. Bursztyka³, E. Perdu³, K. Pettersson¹, I. Pongratz¹, M. Fernández-Cabrera², N. Olea², L. Debrauwer³, D. Zalko³ and J.P. Cravedi^{3,*}

¹Karolinska Institutet, Department for Biosciences and Nutrition, Novum, SE-141 57 Huddinge, Sweden

²University of Granada, Laboratory of Medical Investigation, School of Medicine, Hospital Clinico, 18071 Granada, Spain

³INRA, UMR 1089 Xénobiotiques, BP3 31931 Toulouse Cedex 9, France

* To whom correspondence should be addressed. Mailing address: INRA, UMR 1089 Xénobiotiques, BP3, 31931 Toulouse CEDEX 9, France. Phone: +33 561 285 002. fax: +33 561 285 244. E-mail: jcravedi@toulouse.inra.fr.

Key words: endocrine disruptors, genistein, bisphenol A, cell lines, HepG2, MCF7, HC11, metabolism, biotransformation.

Abbreviation used

ATP, adenosine triphosphate, BPA, bisphenol A, CYP, cytochrome P450, DNA, deoxyribonucleic acid, DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium, 7-EC, 7-ethoxycoumarin, 7-HC, 7-hydroxycoumarin, 7HCS, 7-hydroxycoumarin sulfate, 7-HCG, 7-hydroxycoumarin glucuronide, EDs, endocrine disruptors, EGF, epithelial growth factor, ER, estrogen receptor, ESI-MS/MS, electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry, FBS, fetal bovine serum, FIDs, free induction decays, HPLC, high performance liquid chromatography, LC-MS, Liquid chromatography – Mass spectrometry, NADP, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NMR, nuclear magnetic resonance, RPMI, Roswell Park Memorial Institute medium, R_T , retention time, SPE, solid phase extraction, Tris, hydroxymethylaminomethane, UDP, uridine-5'-diphosphate.

ABSTRACT

In vitro assays provide the opportunity for generating alerts for chemicals which interact with hormone receptors and are also valuable tools for mechanistic research. However, the limited capabilities of *in vitro* models to metabolically activate or inactivate xenobiotics may lead to misinterpretation of the *in vitro* data if such information is not taken into account. The aim of this study was to investigate the metabolic capabilities of human HepG2, human MCF7 and mouse HC11 cell lines used for testing endocrine disruptor (ED) toward radiolabelled bisphenol A and genistein, two estrogenic compounds for which metabolic pathways *in vivo* as *in vitro* are well known. Incubations were performed during 12 to 48 h with 250.10^3 cells in 12 wells plates and 5 to 25 μM of substrates. The kinetics of formation of the metabolites were studied. Rat liver slices were used as reference for comparison with the metabolic capabilities of the cell lines. HC11 cells did not show any biotransformation capability while the major biotransformation pathways in HepG2 and MCF7 cells were conjugation to sulfate and to a lesser extent to glucuronic acid. No phase I metabolism occurred, even in rat liver slices. These results suggest that HC11 cells should be a valuable cellular system to study the intrinsic estrogenic activity of the tested compound, while HepG2 and MCF7 cells can help to take into account part of the metabolic fate of the tested compound that occur *in vivo*. However, since phase I enzymes are poorly or not at all expressed in these systems, their use in endocrine disruptor testing may result in false negative for compounds for which bioactivation is a prerequisite.

INTRODUCTION:

Scientific evidence is accumulating that humans, domestic animals, and wildlife species display adverse health consequences due to exposure to environmental chemicals that interact with the endocrine system. Taking into account the number of natural and man-made chemical substances, which should be evaluated for their endocrine disrupting potential and the alarming health and environmental consequences involved, fast and reliable approaches are needed. In this context, *in vitro* assays represent an attractive method for testing endocrine disruptors (EDs) both from an ethical and cost-based point of view. As reviewed by Charles (2004), Holmes et al. (2001) and Reel et al. (1996), several *in vitro* models have been used for screening, among which transactivation (or reporter gene) assays are widely utilized systems. The general principle is that ligand-bound nuclear hormone receptors alter their conformation, dimerize and bind specific response element sequences on DNA, and initiate transcription of a downstream gene which codes for a protein whose activity, usually enzymatic, can be measured easily and accurately after treatment of the cell culture with different compounds including xenobiotic agents.

In vitro assays not only provide the opportunity for generating alerts for chemicals which interact with hormone receptors but are also valuable tools for mechanistic research and in some instances for establishing experimental designs for animal studies (Gelbke et al., 2004). However, results obtained from *in vitro* studies in general are often not directly applicable to the *in vivo* situation. The limited capabilities of *in vitro* models to metabolically activate or inactivate xenobiotics may lead to misinterpretation of the *in vitro* data if such information is not taken into account.

One of the most used cell lines to screen EDs is the human breast cancer MCF7 cell line (Soto and Sonnenschein, 1985, Soto et al., 1995). MCF7 is an immortalized human breast adenocarcinoma cell line that endogenously expresses predominantly ER α but also some ER β (Brooks and Thompson, 2005, Chen et al., 2004, Chen et al., 2003, Constantinou et al., 1998b, Murata et al., 2004, Nakagawa and Suzuki, 2002, Rivas et al., 2002). The MCF7 cell proliferation assay of estrogenic activity measures whether and to what extent a substance induces cell proliferation via ER mediated pathways in MCF7 cells. Another cell line used to test ED is the human HepG2 hepatoma cell line which are naturally devoid of estrogen receptors, but subclones stably expressing ER α and ER β are available (Solakidi et al., 2005). HepG2 cell line is the most frequently used and best characterized human hepatoma cell line and it expresses a variety of liver specific metabolic enzymes and transporters with varying

activities between different passages and sources of the cells (Brandon et al., 2006, Hewitt and Hewitt, 2004, Wilkening and Bader, 2003). Mouse HC11 mammary gland cell line endogenously expresses both ER α and ER β (Faulds et al., 2004). The involvement of both nuclear receptors in the proliferation and the differentiation of HC11 cells has been demonstrated (Helguero et al., 2005) and makes this cell line potentially interesting for testing estrogenic compounds in an *in vitro* system of murine origin.

In this study we perform a detailed study of the biotransformation properties of cell-lines commonly used for in-vitro testing purposes. We used radiolabeled genistein and bisphenol A (BPA), two EDs exhibiting estrogenic properties, to study the biotransformation capabilities of these cell lines. Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) an isoflavone mainly present in soya and soy products binds more strongly to ER β than ER α (Kuiper et al., 1997). Properties of this phytoestrogen have been assayed in MCF7 cells (Biau et al., 2007, Breinholt and Larsen, 1998, Gutendorf and Westendorf, 2001, Leffers et al., 2001, Maggiolini et al., 2001, Matsumura et al., 2005) and in HepG2 cells (Chodon et al., 2007, Kim et al., 2004, Loukovaara et al., 1995). Bisphenol A (BPA) [2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane] is used in industry as a monomer for the synthesis of polycarbonate plastics and epoxy resins that are employed to manufacture various materials that come in contact with human food, such as plastic bottles, food containers and coatings of food and beverage cans. BPA is able to interact with human ER α and ER β (Hiroi et al., 1999, Kuiper et al., 1998, Kurosawa et al., 2002). BPA endocrine disrupting properties have been assayed in MCF7 cells (Biau et al., 2007, Buterin et al., 2006, Gutendorf and Westendorf, 2001, Leffers et al., 2001, Olea et al., 1996, Vivacqua et al., 2003) and in HepG2 cells (Gould et al., 1998, Safe et al., 2002, Yoon et al., 2001).

Since the sequential metabolic steps in precision-cut liver slices are similar to those occurring *in vivo* (Parrish et al., 1995) and because the retention of heterogeneous cell population and liver architecture is close to the physiological situation *in vivo* (Ekins et al., 1996), precision cut liver slices are considered as the most suitable *in vitro* metabolism model. We used this *in vitro* model to compare the biotransformation capabilities of HepG2, MCF7 and HC11 cell lines toward genistein and BPA. Our study includes kinetic data of metabolite formation for both molecules in each cell line and in precision-cut rat liver slices.

MATERIALS AND METHODS:

CHEMICALS

[4-¹⁴C] genistein was purchased from Isotopchim (Ganagobie-Peyruis, France); the specific activity was 592 MBq/mmol and the radiopurity $\geq 99\%$, as controlled by radio-HPLC. [³H]-BPA, with a specific activity of 185 GBq/mmol, was purchased from Moravek Biochemicals (Mercury Lane, Brea, CA). Its radiopurity was verified by radio-HPLC and was greater than 99.9%. Unlabeled genistein and BPA were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

[3-¹⁴C]-7-Ethoxycoumarin (7-EC) was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK). Aryl sulfatase and β -glucuronidase, insulin and EGF were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Williams' medium E, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, gentamicine, non-essential amino acids and Na-Pyruvate were obtained from Invitrogen (Rockville, USA), penicillin/streptomycin solution from Bio-Whittaker (CAMBREX Company, Walkersville, USA). All chemicals, solvents, and reagents for the preparation of buffers and HPLC eluents were in the highest grade commercially available from Merck (Nogent-sur-Marne, France). Ultrapure water from Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) was used for *in vitro* preparations and HPLC mobile phases.

CELL INCUBATION

For the three cell lines, HepG2, MCF7 and HC11, $250 \cdot 10^3$ cells per well were grown at 37°C in 95% air and 5% CO₂ in 12 wells plates and 1 mL of medium per well. For MCF7 cells, medium was made of DMEM supplemented with 10% FBS and 1% L-Glutamine. For HepG2 cells, medium was made of MEM supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 1% non-essential amino acids and 1% Na-pyruvate. For HC11 cells, medium was RPMI supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, 0.5% gentamicin, 5 mg/L insulin and 10 μ g/L EGF. After 24hr, the medium was replaced by a medium containing [³H]-BPA (9250 Bq/incubation) or [¹⁴C]-genistein (2420 Bq/incubation).

In a first experiment, three incubation times (12, 24 and 48 h) with one concentration (5 μ M) of each compound were performed in triplicate for each type of cell line. In a second experiment, 5 concentrations (5, 10, 15, 20 & 25 μ M) of each compound were incubated in triplicate for 24 h with each type of cell line. Blank samples were carried out by incubating 5 μ M radiolabeled BPA (9250 Bq/incubation) or 5 μ M genistein (2420 Bq/incubation) in the different media without cells in the conditions described above for 12, 24 and 48 h.

At the end of the incubations, the media were removed and stored at -20°C until analysis. The cells were recovered using for each well 750 µL of 50 mM Tris buffer (pH 7.8) containing 10 mM EDTA and 150 mM NaCl and counted with a Malassez cell.

RAT LIVER SLICES PREPARATION AND INCUBATION

Male Wistar rats weighing about 250 g were purchased from Iffa Credo (L'arbrès, France). Upon arrival at the animal facility, animals were allowed at least 1 week of acclimation prior to experimentation. Animals were given free access to lab diet (UAR 210; Villemoisson sur Orge, France) and tap water. In each experiment, the animals were killed by cervical dislocation, followed by immediate exsanguination. Rat livers were perfused with 40 mL of ice-cold (4°C) oxygenated Krebs–Henseleit buffer to remove blood. Liver cores were obtained using a stainless steel tube and drill press. A Krumdieck tissue slicer (Alabama Research and Development Corp., Munford, AL) was used to produce precision-cut slices of 8 mm diameter and 0.2 mm thickness (Krumdieck et al., 1980). An equilibration period of 45 min allowed for the sloughing of damaged cells and for recovery of Ca²⁺ and K⁺ homeostasis in the slices. The mean wet weight of slices was 20 mg, containing about 2 mg of protein. Slices were incubated in 12-well plastic tissue culture plates (Dogterom, 1993) using DMEM medium. The incubation volume was 1 mL. Plates were maintained at 37°C in a rotary shaker, set at 90 rpm and saturated with a 95% O₂/5% CO₂ atmosphere. For each experiment, incubations were performed using liver slices from three rats. In a first experiment, 6 incubation times (1 to 6 hr) with one concentration (100 µM) of each compound were performed. In a second experiment, 4 concentrations (10, 50, 100 & 200 µM) of each compound were incubated in triplicate for 4 h.

CELL AND RAT LIVER SLICES VIABILITY

7-EC was used as a probe substrate for oxidative and conjugative metabolism, to assess the drug-metabolizing capacity of the cell lines and the rat liver slices. Control incubations were performed in triplicate using ¹⁴C-labeled 7-EC 5 µM during 24 h for each cell line, and 25 µM during 4 h for the rat liver slices. Biotransformation of 7-EC to 7-hydroxycoumarin (7-HC), 7-hydroxycoumarin sulfate (7-HCS) and 7-hydroxycoumarin glucuronide (7-HCG) was analyzed by radio-HPLC.

MEDIA SAMPLE PROCESSING

Aliquots (100 μ L) of media samples were mixed with methanol (1:4, v/v), stirred and stored at 0°C for 2 hours. They were then centrifuged for 5 min at 8600 g to remove the proteins. The supernatant was evaporated to dryness under a nitrogen stream before radio-HPLC analysis and was re-diluted in 100 μ L of the corresponding HPLC system mobile phase A.

ANALYTICAL PROCEDURE

The radioactivity of each incubation medium was measured from aliquots (50 μ L) by liquid scintillation counting in a Packard Tricarb 4430 counter with Ultima Gold (Packard Instruments Co., Meriden, CT) as the scintillation cocktail. HPLC coupled to online radioactivity detection (HP 1100 coupled to Flo-One A500 detector, with Flo-scint II as scintillation cocktail, Packard Instruments Co., Meriden, CT) was used for metabolite profiling.

To analyze metabolism products of BPA, the HPLC system consisted in a Zorbax C18 column (250x4 mm, 5 μ m) coupled to a Kromasil C18 guard precolumn (18x4.6 mm, 5 μ m). Mobile phases consisted of ammonium acetate buffer (20 mM, pH 3.5) and acetonitrile 95:5 v/v in A and 10:90 v/v in B, respectively. Flow rate was 1 mL/min at 35°C. The gradient used was 0-4 min 100% A; 4-6 min linear gradient from 100% A to A:B 85:15 v/v; 6-16 min A:B 85:15 v/v; 16-18 min linear gradient from 15% B to 25% B; 18-28 min A:B 75:25 v/v; 28-30 min linear gradient from 25% B to 30% B; 30-37 min A:B 70:30 v/v; 37-39 min linear gradient from 30% B to 70% B; 39-45 min A:B 30:70 v/v.

The HPLC system used to analyze metabolism products of genistein consisted in a Ultrabase C18 column coupled to a Kromasil C18 guard precolumn (18x4.6 mm, 5 μ m). Mobile phases consisted of ammonium acetate buffer (20 mM, pH 3.5) and acetonitrile 90:10 v/v in A and 10:90 v/v in B, respectively. Flow rate was 1 mL/min at 30°C. The gradient used was 0-5 min 100% A; 5-30 linear gradient from 100% A to 100% B; 30-35 min linear gradient from 100% B to 100% A.

Incubations of cells and slices with [¹⁴C]-7-EC were studied by radio-HPLC as previously described (Zalko et al., 1998).

Metabolites were identified by comparison of radio-HPLC R_T with those of authentic standards before and after enzymatic hydrolysis. When necessary, LC-MS/MS was used for

structure confirmation. Metabolites were quantified by integrating the area under the radioactivity detected peaks.

IDENTIFICATION OF METABOLITES

- Enzymatic hydrolysis:

Bacterial aryl-sulfatase (*Aerobacter aerogenes*, type VI, Sigma) and bovine liver β -glucuronidase (Type B-1, Sigma) were used to assess the formation of corresponding conjugates. One UI of β -glucuronidase in 800 μ L 0.2 M sodium acetate buffer adjusted to pH 5 was added to 200 μ L cell medium. Aryl-sulfatase (0.8 UI in 800 μ L of 0.01 M Tris buffer adjusted to pH 7.1) was added to 200 μ L cell medium. After 2 h at 37°C under gentle shaking, hydrolysis assays were stopped by addition of methanol (1:4, v/v). The supernatant was evaporated to dryness under a nitrogen stream and recovered in 100 μ L of the corresponding HPLC system mobile phase A before analysis.

- Structure characterization:

To isolate the metabolites before identification, the HPLC system was connected to a Gilson Model 202 fraction collector (Gilson France, Villiers-le-Bel, France).

Identification of the genistein isolated metabolites was achieved by ^1H NMR and mass spectrometry using electrospray (ESI) ionization. ESI-MS/MS experiments were carried out on a Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer (ThermoFisher, Les Ulis, France) equipped with the Finnigan electrospray ionization source. Negative ionization modes were used. The sample solutions (typically 5 ng/ μ l in 50:50 methanol/water) were infused at 3 μ l/min into the electrospray interface. Typical potentials applied to the ESI source were as follows: needle (5000 V), heated transfer capillary (5-20 V) and tube lens (15-30 V). All spectra were acquired under automatic gain control conditions. Helium was used for improving the trapping efficiency, and as the collision gas for MS/MS experiments. ^1H NMR spectra were obtained at 300 K on a Bruker Avance DRX-600 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 600.13 MHz and equipped with a 5 mm H, C, N inverse triple resonance TXI cryoprobe attached to a cryoplatfrom (the preamplifier cooling unit).

One-dimensional spectra were acquired using a standard pulse sequence for ^1H NMR. 16 free induction decays (FIDs) were collected with a spectral width of 12 ppm into 64 K data points. An exponential function equivalent to a line-broadening of 0.3 Hz was applied prior to Fourier transformation.

Identification of the BPA isolated metabolites were carried out on a quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan LCQ, Thermo Fisher, Les Ulis, France) fitted with an electrospray ionisation source operating in the negative mode. Samples (typically 1ng/μl in MeOH-H₂O (50-50, v/v)) were introduced into the ionisation source at a flow rate of 8 μl/min. Typical operating parameters used for ion production were as follows : ESI needle (-5000 V), heated transfer capillary (-5 V) and tube lens (+15 V). All other parameters for MS/MS and MSⁿ experiments (isolation width, excitation voltage, excitation time) were adjusted in order to get maximum structural information for the compound of interest. All analyses were achieved under automatic gain control conditions using helium as damping as well as collision gas for MS/MS experiments.

SYNTHESIS OF STANDARD METABOLITES

Glucuronide conjugates

Genistein and BPA glucuronidation were performed by incubating 2 mg rat liver microsomal protein with [¹⁴C] genistein (200 μM, 3.3 KBq) or [H³] BPA (200 μM, 4.5 KBq) and UDP glucuronic acid (2.5 mM) in 1 mL 0.5 M Tris buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂ and 0.05% Triton. After 2hr under agitation at 37°C, incubations were stopped by addition of 3 volumes of methanol, and centrifuged for 10 min at 8000g. The supernatant was collected and stored at -20°C until analysis. Identification of genistein conjugates was as described by Bursztyka et al. (2007). Briefly, two genistein metabolites were produced and analyzed by mass spectrometry and ¹H NMR and identified as genistein 7-O-glucuronide (R_T = 13.9 min) and genistein 4'-O-glucuronide (R_T = 15.3 min). One metabolite of BPA was identified by mass spectrometry. [M-H]⁻ ion was detected at *m/z* 403. In MS² experiments, fragmentation of this quasi-molecular ion led to the pair of complementary fragment ions at *m/z* 277 (corresponding to deprotonated BPA) and *m/z* 175, characteristic of a glucuronide moiety. This metabolite was identified as BPA-glucuronide (R_T = 25.2 min).

Sulfo- conjugates

Rat cytosols (2 mg of liver cytosolic protein) or guinea pig cytosols (1 mg of liver cytosolic protein) were preincubated under agitation for 30 min at 37°C with 50 mM Tris buffer (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP and 2 mM sodium sulfate in a final volume of 1 mL. Then, [¹⁴C]-genistein (200 μM, 6 kBq) or [H³] BPA (200 μM, 4.5 KBq) were added to

rat or guinea pig cytosols respectively. Incubations were carried out under agitation for 2h at 37°C. Incubations were stored at -20°C until analysis. The two genistein products obtained were identified by negative ESI-MS and ¹H NMR as genistein 7-O-4'-O-disulfate ($R_T = 16.6$ minutes) and genistein 7-O-sulfate ($R_T = 18.2$ minutes) (Bursztyka et al., 2007). One metabolite of BPA was identified by mass spectrometry. This metabolite gave a [M-H]⁻ quasi-molecular ion at m/z 243. Decomposition of this ion (in MS2 experiment) led to a fragment ion at m/z 227 corresponding to deprotonated BPA, indicating a loss of SO₃ from a sulfate group. This metabolite was identified as a sulfate conjugate of BPA ($R_T = 33.5$ min).

Genistein 4'-O-sulfate 7-O-glucuronide

This metabolite was recently isolated from the bile of rats dosed by gavage with [¹⁴C]-genistein (Bursztyka et al., 2007). It was identified by negative ESI-MS and ¹H NMR spectroscopy. [M-H]⁻ ion of this metabolite was observed at m/z 525, corresponding to a doubly conjugated form of genistein by both sulfation and glucuronidation. This was confirmed by the MS/MS spectrum of the m/z 525 precursor ion which displayed characteristic fragment ions at m/z 349 (corresponding to the loss of the glucuronic acid moiety) and m/z 269 (i.e. genistein aglycon after consecutive elimination of both glucuronide and SO₃ groups). NMR analysis also confirmed that this product was genistein 4'-O-sulfate 7-O-β-D-glucuronide.

RESULTS:

VIABILITY OF CELL LINES AND LIVER SLICES:

Assays with 7-ECn confirmed the metabolic capabilities of HepG2 and MCF7 cell lines. No metabolism occurred when 7-EC was incubated with HC11 cells, whereas 7-EC was hydrodeethylated into 7-hydroxycoumarin and then conjugated to a sulfate when incubated with HepG2 or MCF7 cells. However, 7-HC represented less than 3% of the total radioactivity present in incubation media after 24h, while 7-hydroxycoumarin sulfate represented about 7%, indicating a weak activity of the phase I enzymes. No 7-HCG has been detected.

The qualitative and quantitative results obtained with incubations of 7-EC with rat liver slices were in accordance with those reported previously in rats (Ekins et al., 1995) with

more than 50% of 7-EC metabolized in 4h into 7-HC, 7-HCG and 7-HCS indicating a good metabolic capacity of rat the liver slices used.

METABOLITES OF BPA AND GENISTEIN PRODUCED BY HepG2, MCF7 and HC11 CELL LINES

Radio-HPLC analysis of the media from blank incubations (without cells) did not reveal any degradation of BPA or genistein which could affect the quantification of the metabolites (data not shown). A total absence of metabolites was observed when both compounds were incubated with HC11 cells, whatever the concentration or the duration of the incubation (fig.1) suggesting that these cell lack the ability to biotransform BPA or Genistein.

After incubation of genistein with HepG2 cells, two metabolites ($R_T = 13.9$ and 18.2 min) were produced, whereas only one metabolite ($R_T = 18.2$ min) was found with MCF7 cells (fig.2). No MS or NMR analysis could be undertaken due to the low amounts of metabolites produced by the cell lines. However, the peak with a R_T of 13.9 min shifted to the R_T of genistein after incubation with β -glucuronidase, whereas aryl-sulfatase also produced the parent compound when incubated with the metabolite having a R_T of 18.2 min. Moreover, the first metabolite co-eluted with the standard genistein 7-O-glucuronide and the second metabolite with standard genistein 7-O-sulfate. These results indicate that HepG2 cell lines are able to produce genistein 7-O-glucuronide and genistein 7-O-sulfate from genistein, whereas only genistein 7-O-sulfate was found in the case of MCF7 cell lines.

After incubations of BPA with HepG2 or MCF7 cells, two metabolites were produced ($R_T = 25.2$ and 33.5 min) (fig.2). Incubations of these metabolites with β -glucuronidase and aryl-sulfatase and subsequent analysis by radio-HPLC suggested that the first eluted peak corresponded to the glucuronide conjugate of BPA whereas the second peak corresponded to the sulfoconjugate. The first metabolite co-eluted with the standard BPA-monoglucuronide, whereas the second one co-eluted with the standard BPA-monosulfate, confirming that the metabolite with a R_T of 25.2 minutes was the BPA-glucuronide and the metabolite with a R_T of 33.5 min was the BPA-sulfate. These results demonstrate marked differences in the ability of the tested cell-lines to biotransform genistein and BPA. Interestingly while both MCF-7 and HepG2 display a marked ability for biotransformation HC11 cells are totally devoid of bio-transformation activity.

METABOLITES OF BPA AND GENISTEIN PRODUCED BY PRECISION-CUT RAT LIVER SLICES

The profiles presented above demonstrate marked differences between cells in their ability to transform compounds. We decided to assess and compare this bio-transformation ability to a more in-vivo situation using rat-liver slices. We generated rat liver slices as described and incubated them with BPA or genistein. After incubation of 10 μ M genistein with rat liver slices for 4 h, 3 metabolites have been produced with R_T of 11.8, 13.9 and 19.1 minutes (fig.3). The second peak shifted to the R_T of the parent compound after incubation with β -glucuronidase and co-eluted with the genistein 7-O-glucuronide standard. The first peak ($R_T = 11.8$ min) shifted to 19.1 min after incubation with β -glucuronidase, but no modification of its R_T occurred after incubation with aryl-sulfatase. However, it co-eluted with genistein 4'-O-sulfate 7-O-glucuronide standard and this structure was confirmed by LC-MS/MS analysis. The lack of efficiency of aryl-sulfatase could be due to the steric hindrance of the di-conjugated genistein, precluding the action of the enzyme. The third peak ($R_T = 19.1$ min) shifted to the R_T of genistein after incubation with aryl sulfatase. Then three metabolites of genistein produced with precision-cut rat liver slices were identified as genistein 4'-O-sulfate 7-O-glucuronide ($R_T = 11.8$ min), genistein 7-O-glucuronide ($R_T = 13.9$ min) and genistein 4'-O-sulfate ($R_T = 19.1$ min).

Incubation of BPA with precision-cut rat liver slices resulted in the formation of two metabolites. The major one had the same R_T as BPA-glucuronide and shifted to the R_T of BPA after incubation with β -glucuronidase. Moreover, it co-eluted with BPA glucuronide standard. The second peak shifted to the R_T of BPA-glucuronide (25.2 min) after incubation with aryl-sulfatase or to the R_T of BPA-sulfate (33.5 min) after incubation with β -glucuronidase. The negative ESI-MS analysis of this metabolite gave a weak peak at m/z 483, corresponding to BPA conjugated to both sulfate and glucuronic acid moieties. The m/z 483 precursor ion was selected into the ion trap device and submitted to resonant excitation in an MS/MS experiment. The m/z 483 ion mainly decomposed into a m/z 307 fragment ion, corresponding to the loss of the glucuronic acid moiety ($307 = 483 - 176$). By selecting and fragmenting the m/z 307 product ion in a subsequent MS³ experiment, the m/z 227 fragment ion was obtained as the unique product ion, thus confirming that a SO₃ group was eliminated from the m/z 307 ion. Based on these data, this metabolite ($R_T = 27.2$ min) was identified as BPA conjugated to sulfate and glucuronic acid.

KINETIC DATA:

The time courses of formation of [³H]-BPA or [¹⁴C]-genistein conjugates by cell lines are shown in fig.4. HepG2 and MCF7 cells were able to metabolize both compounds over 48 h and sulfoconjugates were the major metabolites produced except when BPA was incubated with MCF7 cells. More than 50% of genistein was conjugated after 12 h and more than 99% after 48 h of incubation with HepG2 cells, mainly with sulfate and to a lesser extent with glucuronic acid. Conjugation occurred to a lesser extent in MCF7 cell lines since between 5 and 7% of genistein was conjugated to sulfate after 12 h and less than 48% after 48 h incubation. With this cell line, the only metabolite produced was genistein 7-O-sulfate, even after an incubation period of 48 h. After 48 h incubation with HepG2 cells, all BPA was conjugated, BPA-sulfate representing between 80.5% and 83.8% of the radioactivity present in the medium and BPA-glucuronide accounting for less than 19 %. By contrast, the major metabolite of BPA produced by MCF7 cells was BPA-glucuronide, this metabolite amounting to approximately 17% of the radioactivity present in the medium after 48 h, whereas only traces of BPA-sulfate was formed.

After incubation with rat liver slices, BPA (100 μM) and genistein (100 μM) were mostly conjugated to glucuronic acid (fig.5). BPA-glucuronide represented 81 to 84% of the total radioactivity after 3 h, whereas BPA-glucuronosulfate represented 4 to 10% of the total radioactivity. Genistein 7-O-glucuronide was the major metabolite produced by rat liver slices. It represented more than 10% of the total radioactivity after 1 h of incubation, and 32 to 42% after 4 h. Genistein 4'-O-sulfate represented between 3 and 4% of the total radioactivity while genistein 4'-O-sulfate, 7-O-glucuronide accounted for approximately 2% after 4 h incubations.

The formation rates of genistein and BPA metabolites in cell lines and in rat liver slices are shown in fig.6. Conjugation of BPA to sulfate was linear up to 25 μM in both cell lines. BPA glucuronide formation and BPA sulfoglucuronide formation by rat liver slices were linear up to 200μM. The production rate of BPA sulfoglucuronide was 0.74 ± 0.39 nmol/mg of protein/hr in rat liver slices at the highest concentration incubated (data not shown), which is about 33 fold less than BPA glucuronide formation (24.9 ± 1.96 nmol/mg of protein/hr). BPA conjugation to glucuronic acid in MCF7 and HepG2 cell lines demonstrated saturation kinetics. Apparent V_{max} of BPA conjugation to glucuronic acid was about 5 fold

higher in HepG2 than in MCF7 cells (table 1). Genistein conjugation reactions demonstrated saturation kinetics. In MCF7 cells, apparent V_{\max} for 7-O-Sulfate genistein production was reached from the lowest concentration incubated (Apparent $V_{\max} = 0.048 \pm 0.007$ nmol h⁻¹ per million of cells). Based on apparent V_{\max} calculation, conjugates of both compounds to glucuronic acid and to sulfate were produced at a much higher rate in HepG2 cells than in MCF7 cells (table 1).

DISCUSSION:

Very limited information is available about the intrinsic metabolising potential of cell systems traditionally used to detect EDs. OECD has recommended to obtain this information as quickly as possible since it is of critical importance for the interpretation of *in vitro* testing (OECD, 2006). Indeed, depending on the cell-line and on the tested compound, false positive data results can be due to a lack of detoxification or false negative data can be due to a lack of bioactivation (Gray et al., 2002).

Biotransformation studies of genistein and BPA using rat liver slices showed that for both molecules, conjugation with glucuronic acid is the main detoxification pathway. Although the results obtained with 7-EC as a reference substrate indicate that phase I enzymes are active in this system, no hydroxylation of genistein or BPA occurred, regardless of the substrate concentration or of the duration of the incubations. This is in agreement with the results obtained by Coldham et al. (1999), and Pfeiffer and Metzler (2004) using rat liver slices. Similarly, neither the hydroxylation of BPA nor that of genistein were observed when these molecules were incubated with HepG2 or MCF7 despite the fact that these cell lines were shown to be able to metabolize 7-EC. In fact, CYP1A1 and CYP1B1, the isoforms predominantly involved in the production of hydroxylated genistein (Roberts-Kirchhoff et al., 1999), are not expressed in MCF7 cells without prior induction with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Spink et al., 1998). Likewise, expression and activity of phase I enzymes are extremely low even in HepG2 cell line (Westerink and Schoonen, 2007a, Wilkening and Bader, 2003). The use of radiolabelled compounds, which allow a very good sensibility for minor metabolites detection, confirm that none of the necessary cytochromes involved in BPA or genistein biotransformation is expressed at a sufficient level to produce detectable hydroxylated metabolites.

HepG2 and MCF7 cells express the glucuronosyl- and sulfo-transferase activities involved in the metabolism of both molecules. In contrast, HC11 cells did not show any

biotransformation capability. The higher sulfation rate we observed for both compounds using HepG2 cell line, compared to the glucuronidation rate, is in good agreement with already published data (Hewitt and Hewitt, 2004, Loukovaara et al., 1995, Westerink and Schoonen, 2007b). In our experimental conditions, the conjugation of genistein to glucuronic acid did not occur in MCF7 cell lines, genistein 7-O-sulfate being the only metabolite produced. Spink et al. (2000) also showed that MCF-7 cells were able to conjugate 2-methoxy-estradiol with sulfuric acid, whereas no glucuro-conjugation of this steroid with glucuronic acid was observed. However, the expression of some UGT2B (UGT2B15, 2B17 & 2B10) has been demonstrated in this cell line (Harrington et al., 2006), explaining the formation of BPA glucuronide. Sulfo- and glucurono-conjugations are generally considered as detoxification pathways. Kinjo et al. (2004) demonstrated that sulfo- and/or glucurono-conjugates of genistein lose most of the estrogenic activity of genistein and Snyder et al. (2000) and Matthews et al. (2001) demonstrated that BPA-glucuronide produces no activation of ER α or ER β , while BPA sulfate shows no estrogenicity up to 1 mM (Shimizu et al., 2002).

The absence of metabolism in HC11 cells could give rise to false positive data (due to lack of detoxification) or negative data (lack of activation when biotransformation is an absolute prerequisite to endocrine disrupting effects). In the case of BPA and genistein for which metabolism is mainly considered as a detoxification process, it can be predicted that the endocrine disrupting activity obtained with HC11 cells would be overestimated compared to other cell lines able to conduct phase II metabolism. In contrast, the results obtained with HepG2, and to a lesser extent by MCF7 cell lines could be underestimated, due to the efficiency of conjugation processes in these systems.

A major point regarding *in vitro* testing of EDs with respect to the metabolic competence of these systems is that we need to ascertain that the *in vitro* system has a metabolising capacity that is representative for the *in vivo* situation (OECD, 2006). Our results indicate that this ideal situation cannot be reached by MCF7 and HepG2 cell lines since important qualitative and quantitative differences are observed in the metabolic pattern of genistein and BPA in these systems as compared to *in vivo* results (Coldham et al., 1999, Fang et al., 2002, Zalko et al., 2003). *In vitro* systems capable to mimic *in vivo* metabolism are scarce and for some EDs, even efficient models such as precision-cut liver slices produce only a small number of the metabolites described *in vivo*. This is the case for BPA and genistein for which neither the investigated cell lines nor the liver slices were able to form phase I metabolites.

Several authors tried to implement systems used for testing EDs by using S9 fractions in combination with the assay. For example, the estrogenic activities of methoxychlor and trans-stilbene can be enhanced using a recombinant reporter-gene assay in stably transfected MCF7 and HeLa cells in the presence of the rat liver S9 mix (Sumida et al., 2001). There is also evidence for the activation of some of 13 bisphenol A-related chemicals by S9 in a yeast hybrid assay (Hashimoto et al., 2001). Yoshihara et al. (2001, 2004) used a yeast hybrid assay and a mammalian cell system (the MCF-7 cell line) to demonstrate that liver S9 fractions of several animal species, including human, were able to enhance the estrogenicity of BPA, through a metabolite identified as 4-methyl-2,4-bis(*p*-hydroxyphenyl)pent-1-ene. These authors showed that the activating effects of S9 were due to CYP activity although neither cytosol nor microsomes alone were able to activate the chemical. However, analysis of data obtained with exogenous metabolising systems needs to be done with caution. Some estrogenic compounds like 4-*tert*-octylphenol, 4-nonylphenol and 17 β -estradiol are inactivated when metabolising systems are added and the use of S9 fractions in combination with an assay for endocrine disruption testing may have a number of shortcomings like the production of active compounds that does not exist or that are produced in lower rates *in vivo* (Yoshihara et al., 2001).

To conclude, the interpretation of the results obtained with MCF7 and HepG2 cell lines in ED testing should take into account the metabolic capabilities of these systems. False negative results could be avoided for compounds necessitating a bioactivation step, but also false positive, or at least underestimation of the observed activity, when xenobiotics are directly conjugated by phase II enzymes without prior phase I reaction, like BPA and genistein. It may be worthwhile to identify substances that are EDs *per se*, without any prerequisite bioactivation. In that case, the use of HC11 cells could be appropriate and will identify EDs which do not need prerequisite bioactivation. By comparison, the concomitant use of cell lines expressing metabolizing enzymes such as HepG2 would provide information on compounds undergoing a detoxification process and, in a limited extent, for bioactivated EDs.

ACKNOWLEDGMENTS

This study has been partly supported by the European Union network CASCADE (FOOD-CT-2003-506319). We thank Laurence Gamet-Payrastre for preliminary experiments on

MCF7 cells, Cécile Canlet for ¹H NMR analysis, and Florence Blas y Estrada and Raymond Gazel for animal care.

References

- Biau, S., Bayle, S., de Santa Barbara, P. and Roig, B., 2007. The chick embryo: an animal model for detection of the effects of hormonal compounds. *Anal Bioanal Chem* 387 (4) 1397-403.
- Brandon, E. F., Bosch, T. M., Deenen, M. J., Levink, R., van der Wal, E., van Meerveld, J. B., Bijl, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. and Meijerman, I., 2006. Validation of *in vitro* cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 211 (1) 1-10.
- Breinholt, V. and Larsen, J. C., 1998. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chem Res Toxicol* 11 (6) 622-9.
- Brooks, J. D. and Thompson, L. U., 2005. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94 (5) 461-7.
- Bursztyka, J., Perdu, E., Tulliez, J., Debrauwer, L., Delous, G., Canlet, C., De Sousa, G., Rahmani, R., Benfenati, E. and Cravedi, J. P., 2007. Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes. *Food Chem Toxicol* doi: 10.1016/j.fct.2007.10.023
- Buterin, T., Koch, C. and Naegeli, H., 2006. Convergent transcriptional profiles induced by endogenous estrogen and distinct xenoestrogens in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 27 (8) 1567-78.
- Charles, G.D., 2004. *In vitro* models in endocrine disruptor screening. *ILAR J.* 45 (4) 494-501.
- Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C. and Yager, J. D., 2004. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (6) E1011-22.
- Chen, W. F., Huang, M. H., Tzang, C. H., Yang, M. and Wong, M. S., 2003. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta* 1638 (2) 187-96.
- Chodon, D., Ramamurty, N. and Sakthisekaran, D., 2007. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line. *Toxicol In vitro* 21 (5) 887-91.
- Coldham, N. G., Howells, L. C., Santi, A., Montesissa, C., Langlais, C., King, L. J., Macpherson, D. D. and Sauer, M. J., 1999. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70 (4-6) 169-84.
- Constantinou, A. I., Krygier, A. E. and Mehta, R. R., 1998. Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice. *Am J Clin Nutr* 68 (6 Suppl) 1426S-1430S.
- Dogterom, P., 1993. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab Dispos* 21 (4) 699-704.

- Ekins, S., Murray, G. I., Burke, M. D., Williams, J. A., Marchant, N. C. and Hawksworth, G. M., 1995. Quantitative differences in phase I and II metabolism between rat precision-cut liver slices and isolated hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 23 (11) 1274-9.
- Ekins, S., Williams, J. A., Murray, G. I., Burke, M. D., Marchant, N. C., Engeset, J. and Hawksworth, G. M., 1996. Xenobiotic metabolism in rat, dog, and human precision-cut liver slices, freshly isolated hepatocytes, and vitrified precision-cut liver slices. *Drug Metab Dispos* 24 (9) 990-5.
- Fang, N., Yu, S. and Badger, T. M., 2002. Characterization of isoflavones and their conjugates in female rat urine using LC/MS/MS. *J Agric Food Chem* 50 (9) 2700-7.
- Faulds, M. H., Olsen, H., Helguero, L. A., Gustafsson, J. A. and Haldosen, L. A., 2004. Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 18 (2) 412-21.
- Gelbke, H. P., Kayser, M. and Poole, A., 2004. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 205 (1-2) 17-25.
- Gould, J. C., Leonard, L. S., Maness, S. C., Wagner, B. L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D. P. and Gaido, K. W., 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 142 (1-2) 203-14.
- Gutendorf, B. and Westendorf, J., 2001. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166 (1-2) 79-89.
- Harrington, W. R., Sengupta, S. and Katzenellenbogen, B. S., 2006. Estrogen regulation of the glucuronidation enzyme UGT2B15 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Endocrinology* 147 (8) 3843-50.
- Hashimoto, Y., Moriguchi, Y., Oshima, H., Kawaguchi, M., Miyazaki, K. and Nakamura, M., 2001. Measurement of estrogenic activity of chemicals for the development of new dental polymers. *Toxicol In vitro* 15 (4-5) 421-5.
- Helguero, L. A., Faulds, M. H., Gustafsson, J. A. and Haldosen, L. A., 2005. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24 (44) 6605-16.
- Hewitt, N. J. and Hewitt, P., 2004. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* 34 (3) 243-56.
- Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y. and Taketani, Y., 1999. Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr J* 46 (6) 773-8.
- Holmes, P., Humfrey C., Scullion M., 2001. Appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals. OECD Environmental Health and Safety publications. Series on Testing and Assessment no.21, Paris. ENV/JM/MONO(2002)8 (<http://www.oecd.org/dataoecd/47/21/2074124.pdf>).
- Kim, S., Shin, H. J., Kim, S. Y., Kim, J. H., Lee, Y. S., Kim, D. H. and Lee, M. O., 2004. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol* 220 (1-2) 51-8.
- Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., Aomori, T., Nagao, T., Okabe, H., Nohara, T. and Masamune, Y., 2004. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull* 27 (2) 185-8.
- Krumdieck, C. L., dos Santos, J. E. and Ho, K. J., 1980. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem* 104 (1) 118-23.

- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138 (3) 863-70.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. and Gustafsson, J. A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139 (10) 4252-63.
- Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M. and Taketani, Y., 2002. The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr J* 49 (4) 465-71.
- Leffers, H., Naesby, M., Vendelbo, B., Skakkebaek, N. E. and Jorgensen, M., 2001. Oestrogenic potencies of Zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disruptors. *Hum Reprod* 16 (5) 1037-45.
- Loukovaara, M., Carson, M., Palotie, A. and Adlercreutz, H., 1995. Regulation of sex hormone-binding globulin production by isoflavonoids and patterns of isoflavonoid conjugation in HepG2 cell cultures. *Steroids* 60 (9) 656-61.
- Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Marsico, S., Panno, M. L., Cenni, B., Picard, D. and Ando, S., 2001. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 60 (3) 595-602.
- Matsumura, A., Ghosh, A., Pope, G. S. and Darbre, P. D., 2005. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94 (5) 431-43.
- Matthews, J. B., Twomey, K. and Zacharewski, T. R., 2001. *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chemical Research in Toxicology* 14 (2) 149-157.
- Murata, M., Midorikawa, K., Koh, M., Umezawa, K. and Kawanishi, S., 2004. Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry* 43 (9) 2569-77.
- Nakagawa, Y. and Suzuki, T., 2002. Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 139 115-128.
- OECD. The use of metabolising systems for *in vitro* testing of endocrine disruptors (www.oecd.org), 2006.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M. and Sonnenschein, C., 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives* 104 (3) 298-305.
- Parrish, A. R., Gandolfi, A. J. and Brendel, K., 1995. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* 57 (21) 1887-901.
- Pfeiffer, E. and Metzler, M., 2004. Effect of bisphenol A on drug metabolising enzymes in rat hepatic microsomes and precision-cut rat liver slices. *Arch Toxicol* 78 (7) 369-77.
- Reel, J. R., Lamb, J. C. and Neal, B. H., 1996. Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundamental and Applied Toxicology* 34 (2) 288-305.
- Rivas, A., Lacroix, M., Olea-Serrano, F., Laios, I., Leclercq, G. and Olea, N., 2002. Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82 (1) 45-53.
- Roberts-Kirchhoff, E. S., Crowley, J. R., Hollenberg, P. F. and Kim, H., 1999. Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s. *Chem Res Toxicol* 12 (7) 610-6.

- Safe, S. H., Pallaroni, L., Yoon, K., Gaido, K., Ross, S. and McDonnell, D., 2002. Problems for risk assessment of endocrine-active estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 6 925-9.
- Shimizu, M., Ohta, K., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Ohno, Y. and Ozawa, S., 2002. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicol In vitro* 16 (5) 549-56.
- Snyder, R. W., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S. C. and Fennell, T. R., 2000. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 168 (3) 225-34.
- Solakidi, S., Psarra, A. M. and Sekeris, C. E., 2005. Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1745 (3) 382-92.
- Soto, A. M. and Sonnenschein, C., 1985. The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J Steroid Biochem* 23 (1) 87-94.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N. and Serrano, F. O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7 113-22.
- Spink, B. C., Katz, B. H., Hussain, M. M., Pang, S., Connor, S. P., Aldous, K. M., Gierthy, J. F. and Spink, D. C., 2000. SULT1A1 catalyzes 2-methoxyestradiol sulfonation in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 21 (11) 1947-57.
- Spink, D. C., Spink, B. C., Cao, J. Q., DePasquale, J. A., Pentecost, B. T., Fasco, M. J., Li, Y. and Sutter, T. R., 1998. Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis* 19 (2) 291-8.
- Sumida, K., Ooe, N., Nagahori, H., Saito, K., Isobe, N., Kaneko, H. and Nakatsuka, I., 2001. An *in vitro* reporter gene assay method incorporating metabolic activation with human and rat S9 or liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 280 (1) 85-91.
- Vivacqua, A., Recchia, A. G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., Di Gioia, M. L., Leggio, A., Bonofiglio, D., Liguori, A. and Maggiolini, M., 2003. The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine* 22 (3) 275-84.
- Westerink, W. M. and Schoonen, W. G., 2007a. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In vitro*
- Westerink, W. M. and Schoonen, W. G., 2007b. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In vitro*
- Wilkening, S. and Bader, A., 2003. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol* 17 (4) 207-13.
- Yoon, K., Pallaroni, L., Stoner, M., Gaido, K. and Safe, S., 2001. Differential activation of wild-type and variant forms of estrogen receptor alpha by synthetic and natural estrogenic compounds using a promoter containing three estrogen-responsive elements. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78 (1) 25-32.
- Yoshihara, S., Makishima, M., Suzuki, N. and Ohta, S., 2001. Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicol Sci* 62 (2) 221-7.
- Yoshihara, S., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K. and Ohta, S., 2004. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol Sci* 78 (1) 50-9.

- Zalko, D., Perdu-Durand, E., Debrauwer, L., Bec-Ferte, M. P. and Tulliez, J., 1998. Comparative metabolism of clenbuterol by rat and bovine liver microsomes and slices. *Drug Metab Dispos* 26 (1) 28-35.
- Zalko, D., Soto, A. M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R. and Cravedi, J. P., 2003. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111 (3) 309-19.

Table 1: Apparent V_{\max} of genistein and BPA biotransformation by HepG2 and MCF7 cell lines and by rat liver slices (nmol/ 10^6 cells/hr and nmol/mg of protein/hr respectively). * = linear kinetic up to the highest concentration incubated.

	V_{\max}		
	MCF7	HepG2	Rat liver slices
7-O-G genistein		0.17±0.01	7.01±1.19
7-O-S genistein	0.048±0.007	1.09±0.22	
4'-O-S genistein			0.64±0.08
BPA-G	0.098±0.021	0.48±0.06	*
BPA-S	*	*	

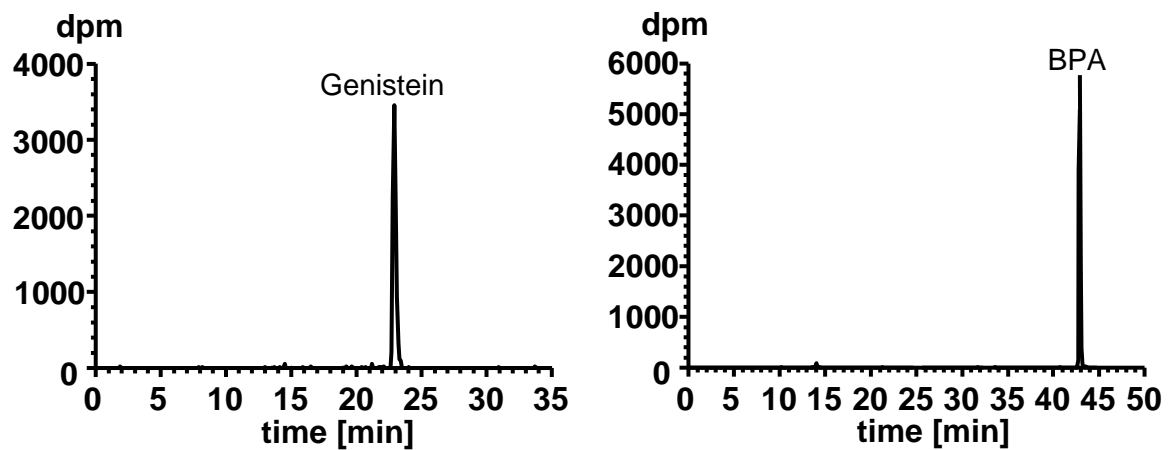


Fig.1: Typical radio-HPLC metabolic profile obtained from incubation of 5 μM [^{14}C]-genistein and 5 μM [^3H]-BPA with mouse HC11 cell line (incubation time 48h).

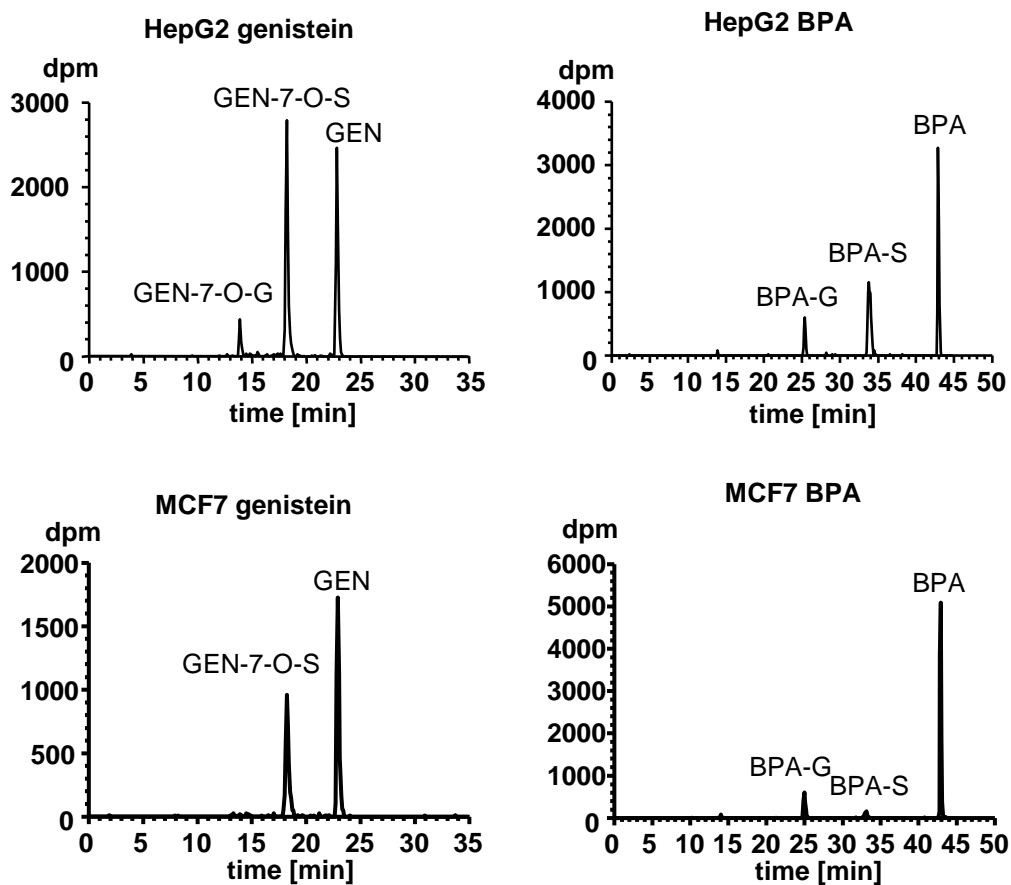


Fig.2: Typical radio-HPLC metabolic profile obtained from incubation of 5 μ M [3 H]-BPA and 5 μ M [14 C]-genistein with human HepG2 hepatoma cell line (incubation time 12h) and human MCF7 cancer cell line (incubation time 48h).

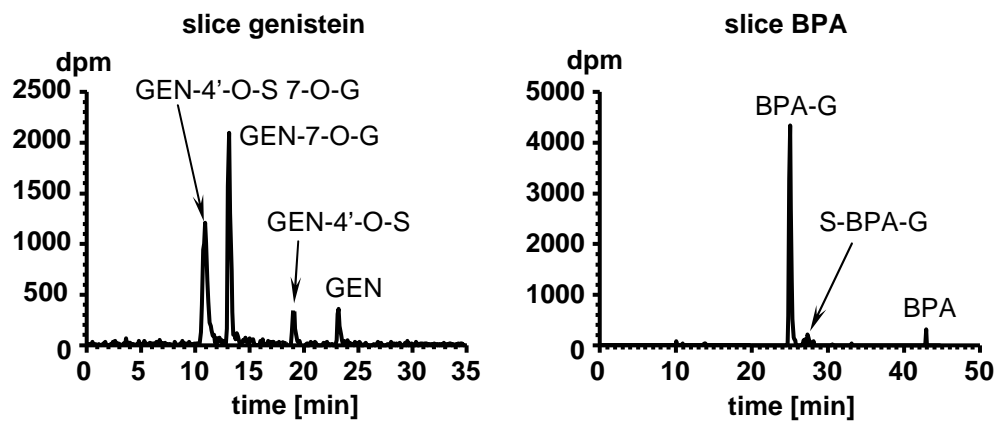


Fig.3: Typical radio-HPLC metabolic profile obtained from incubation of 10 μM [^{14}C]-genistein and 10 μM [^3H]-BPA with rat liver slices (incubation time 4h).

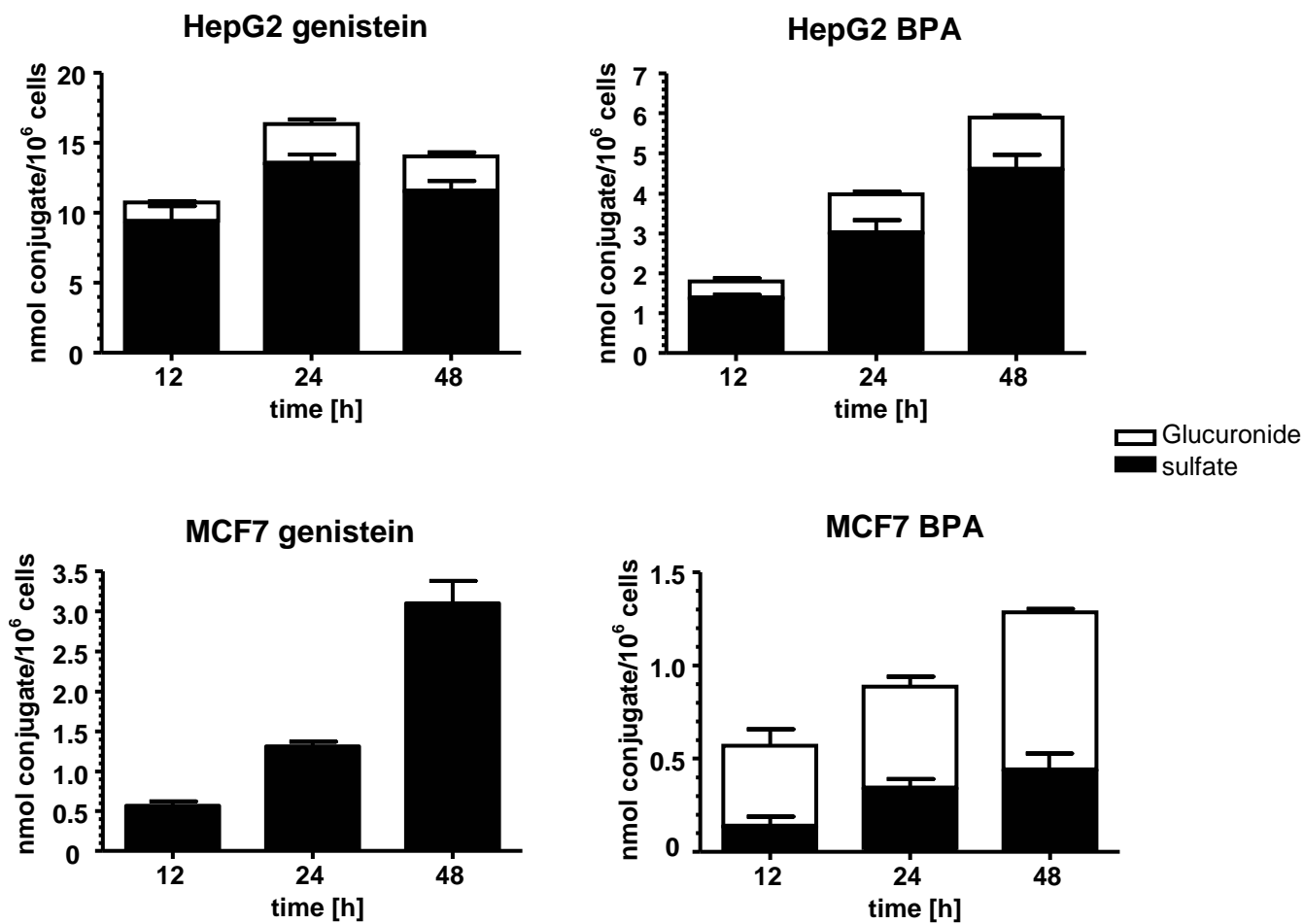


Fig.4: Time course of genistein and BPA conjugation in HepG2 and MCF-7 cell lines (5 μ M [14 C]-genistein or [3 H]-BPA). Data are mean \pm SD from three incubations.

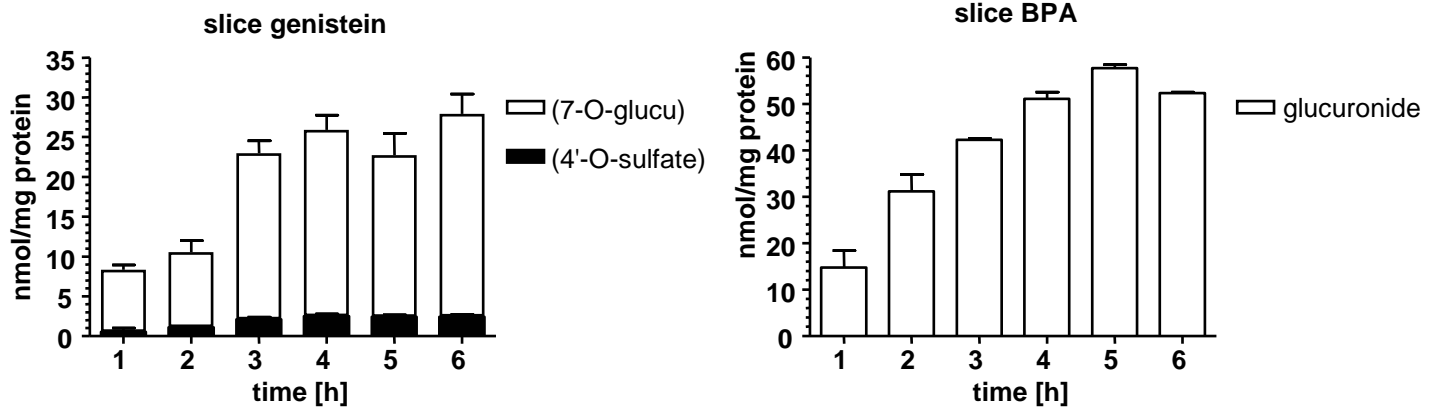


Fig.5: Time course of genistein and BPA conjugation in rat liver slices (100 μ M [14 C]-genistein or [3 H]-BPA). Data are mean \pm SD from three incubations.

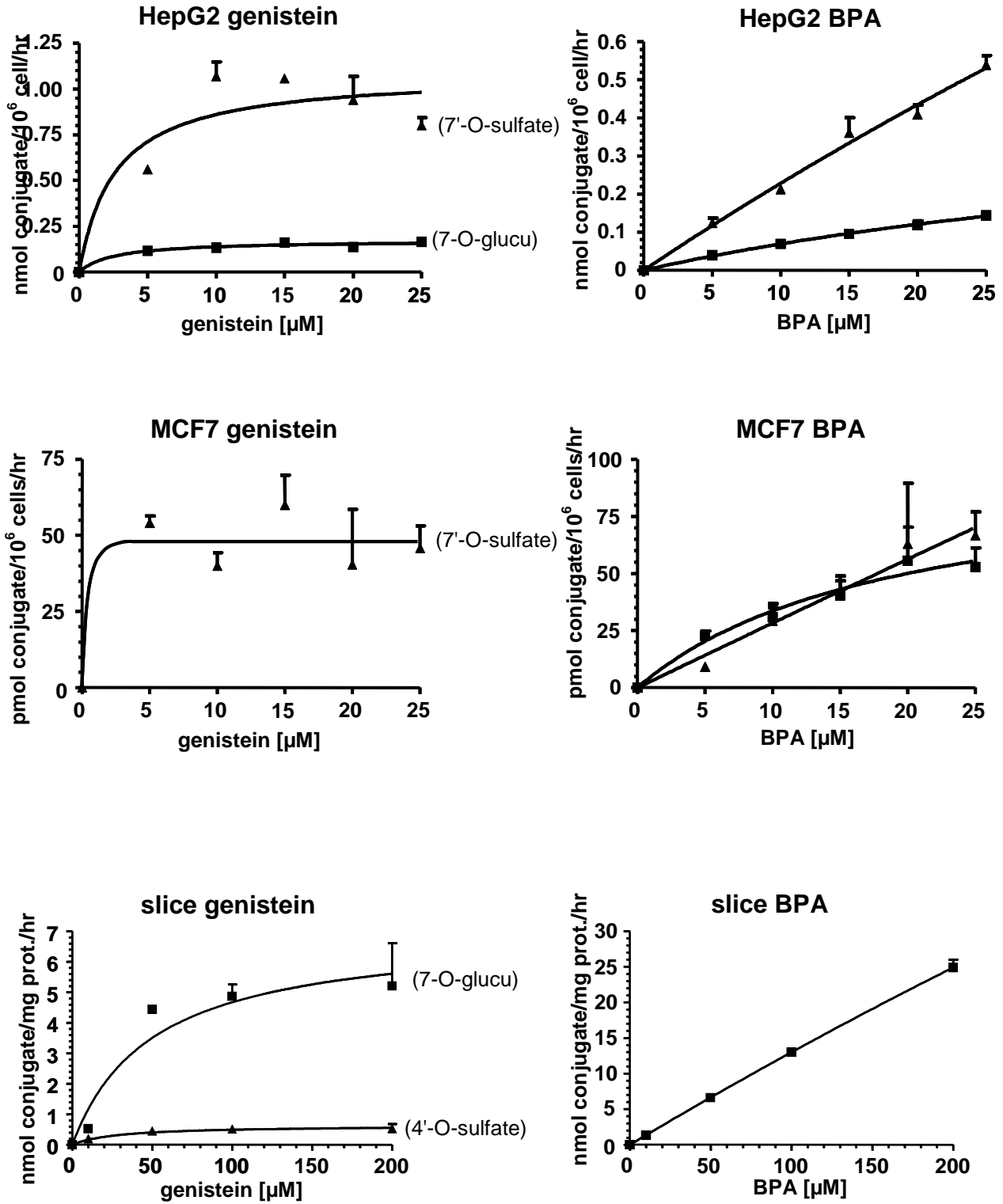


Fig.6: Michaelis-Menten plot of BPA and genistein conjugation to glucuronic acid (squares) and sulfate (triangles) by HepG2 and MCF-7 cell lines, and rat liver slices. Values are mean \pm SD from three incubations.

Expérimentations complémentaires

Capacités métaboliques des lignées cellulaires vis-à-vis de la vinchlozoline

La biotransformation de la vinchlozoline nécessitait obligatoirement une étape d'oxydation du groupement vinyl préalable à toute biotransformation de phase II. Sans cette étape de phase I du métabolisme, les produits de dégradation de la vinchlozoline que sont M1 et M2 ne sont pas inactivés.

Nous avons donc décidé d'étudier le devenir de la vinchlozoline incubée avec les cellules HepG2, MCF7 et HC11.

Le protocole employé est similaire à celui décrit dans l'article 3. Brièvement, les cellules ont été mises en culture à raison de 250.10^3 cellules par puits, dans des plaques de 12 puits, 24 hr avant le début des expérimentations. Après 24 hr, le milieu de culture a été remplacé par du milieu contenant la [^{14}C]-vinchlozoline (3000 Bq/mL). Toutes les incubations ont été réalisées en triplicat. Une première expérience a consisté à incuber 5 μM de vinchlozoline pendant 12, 24 et 48 hr. Une seconde expérience a été réalisée en incubant pendant 24 hr 5, 10, 15, 20 et 25 μM de vinchlozoline. La 7-éthoxycoumarine a été utilisée comme substrat de contrôle afin de déterminer les capacités métaboliques des cellules. Des incubations sans cellules ont été réalisées afin de mesurer l'hydrolyse de la vinchlozoline (5 μM) en M1 et M2 et la stabilité de ces produits de dégradation antiandrogéniques pendant 12, 24 et 48 hr. Les méthodes analytiques sont identiques à celles décrites dans l'article 2.

En l'absence de cellules, la vinchlozoline a été complètement hydrolysée de façon égale en M1 et M2, dès 12 heures d'incubations, quel que soit le milieu de culture considéré. Des pics minoritaires, plus polaires, ont été observés avec des temps de rétention de 43,5 minutes, 46 minutes, 51,2 minutes et 53,1 minutes (fig.1). L'identité de ces composés n'a pu être déterminée. Après incubation en présence de cellules MCF7 ou HC11, les profils radio-CLHP étaient tout à fait identiques, aucune biotransformation ni de phase I ni de phase II n'ayant eu lieu. Néanmoins, après incubation de la vinchlozoline en présence des cellules HepG2, un pic minoritaire supplémentaire a été détecté. Son temps de rétention (56,2 minutes) correspond à celui de la dichloroaniline standard (article 3).

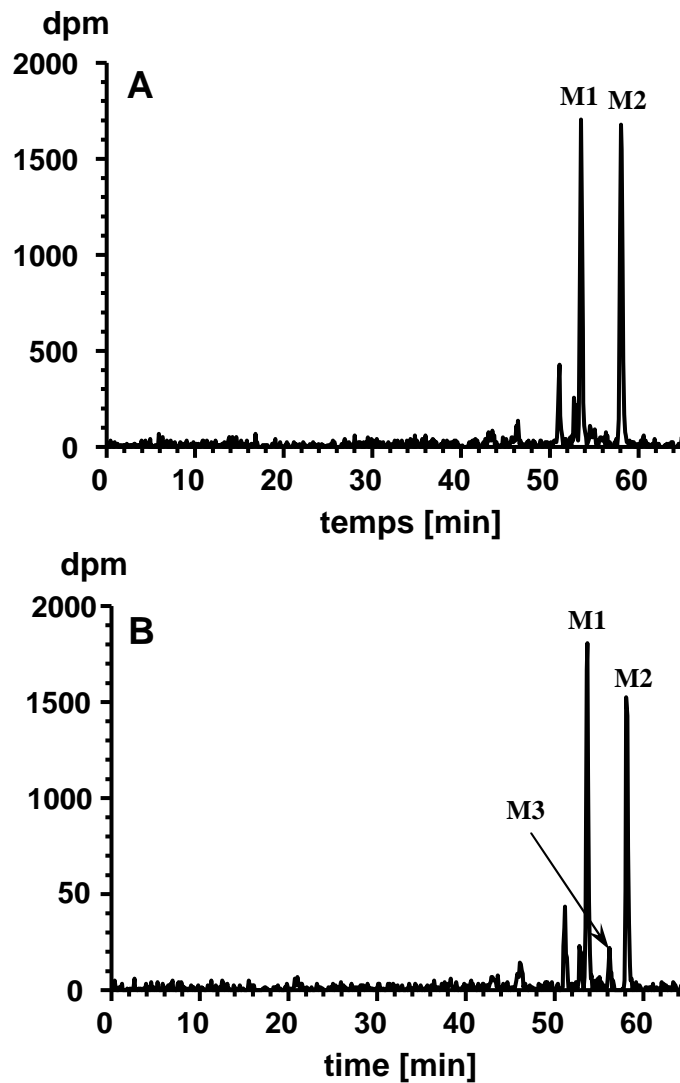


Fig.1 : profils radio-CLHP typiques après 12 hr d'incubation de la vinchlozoline (5μM) dans les milieux de culture des cellules HepG2, MCF7 et HC11 seuls ou en présence de cellules MCF7 ou HC11 (A) et après 12 hr en présence de cellules HepG2 (B).

2 Discussion

Les lignées cellulaires HepG2 et MCF7, comme les tranches de foie, se sont montrées capables de métaboliser la 7-éthoxycoumarine en 7-hydroxycoumarine et en ses conjugués à l'acide sulfurique ou glucuronique indiquant leur aptitude à réaliser certaines étapes de phase I et de phase II du métabolisme. Néanmoins, que ce soit avec les lignées cellulaires ou les tranches de foie, aucun métabolite de phase I du BPA ou de la génistéine n'a été décelé en radio-CLHP, quelle que soit la concentration en substrat ou la durée d'incubation. Les incubations du BPA ou de la génistéine en présence de tranches de foie de rat ont donné des conjugués à l'acide glucuronique majoritaires tandis que les incubations réalisées en présence des cellules HepG2 ou MCF7 ont donné des métabolites majoritairement conjugués à l'acide sulfurique. Au contraire, les cellules HC11 n'ont montré aucune capacité de biotransformation.

Cette absence complète de biotransformation dans les cellules HC11 peut être la source de résultats faussement positifs si la molécule testée est intrinsèquement active, ou au contraire source de résultats faussement négatifs si la molécule testée doit être bioactivée lorsque cette étape est un prérequis indispensable à toute activité perturbatrice endocrinienne. Ainsi pour le BPA et la génistéine, molécules dont le métabolisme est essentiellement considéré comme un processus de détoxification (Kinjo et al., 2004, Matthews et al., 2001, Shimizu et al., 2002, Snyder et al., 2000), il peut être prédit que l'activité perturbatrice endocrinienne observée avec les cellules HC11 serait surestimée comparée à celle observée avec d'autres lignées cellulaires disposant d'un équipement enzymatique permettant la conjugaison de ces substrats. Au contraire, les résultats obtenus avec les cellules HepG2 ou MCF7 peuvent sous-estimer l'activité intrinsèque des molécules testées si celles-ci peuvent être directement prises en charge par les enzymes de phase II exprimées par ces cellules (à l'instar du BPA et la génistéine). Si le composé testé est actif et ne peut être pris en charge par les enzymes de phase II exprimés par les cellules MCF7 et HepG2, l'activité mesurée sera similaire à celle obtenue avec les cellules HC11, et probablement surestimée par rapport à ce qui est observé *in vivo*. Enfin, si la molécule testée doit être activée via une étape de phase I du métabolisme, les cellules HepG2 et MCF7 donneront un résultat faussement négatif, comme les cellules HC11.

CONCLUSION

Un des objectifs de ce travail était de parfaire les connaissances en matière de métabolisme des trois substances retenues dans ce projet. Les données de la littérature, tant *in vivo* qu'*in vitro*, ayant été jugées suffisantes pour le bisphénol A, nos efforts ont principalement porté sur la génistéine et la vinchlozoline. Dans tous les cas, nous avons disposé de molécules radio-marquées.

Concernant la génistéine, nous nous sommes attachés à déterminer les voies de biotransformation de ce phytoestrogène chez l'homme en privilégiant l'utilisation d'hépatocytes et de microsomes de foie. Parallèlement, afin de disposer d'éléments de comparaison avec les rongeurs, le même type d'étude a été effectué chez le rat. Si les résultats obtenus chez l'Homme confirment les voies métaboliques précédemment décrites chez les rongeurs, les analyses quantitatives indiquent que les voies de bio-activation, c'est à dire celles qui conduisent à des métabolites susceptibles d'endommager les macromolécules endogènes en formant des adduits, ou encore capables de réagir avec les récepteurs aux estrogènes, sont davantage exprimés chez l'Homme. Ces données qui ressortent principalement des travaux menés à partir de microsomes hépatiques posent le problème de l'extrapolation de l'animal à l'Homme. Elles indiquent que le risque associé à la consommation de génistéine chez l'Homme pourrait être plus important que celui que laissent supposer ces expérimentations menées chez le rat.

Pour la vinchlozoline, les résultats originaux qui ont été obtenus à la fois *in vivo* et *in vitro* mettent en évidence plusieurs voies métaboliques de ce fongicide. Ils confirment la formation de deux produits d'hydrolyse, M1 et M2, dont les propriétés anti-androgéniques ont été décrites à de nombreuses reprises. Ils démontrent également que le composé majoritairement formé est un dérivé dihydroxylé (M5) dont l'activité biologique reste à déterminer, notamment en matière d'interaction avec les récepteurs nucléaires. En effet, s'il semble que ce métabolite soit peu ou pas impliqué dans le caractère anti-androgénique de la vinchlozoline, son activité vis-à-vis d'autres récepteurs nucléaires pourrait être non négligeable, comme cela a été récemment montré pour M1 et M2 (Molina-Molina et al., 2006). En revanche, M2, connu pour être le plus actif en matière d'anti-androgénicité avec un K_i de 9,7 μM (Kelce et al., 1997), est en fait un métabolite très minoritaire. Il est peu probable qu'il atteigne des concentrations proches de son K_i *in vivo*, du moins chez le rat. M1, bien que moins antiandrogénique avec un K_i de 92 μM , risque davantage d'atteindre des concentrations proches de son K_i et d'entraîner une perturbation endocrinienne.

Enfin, les profils métaboliques réalisés à partir de tranches de foie de rat montrent la formation de dichloroaniline. Ce composé génotoxique est cependant produit en quantité très limitée par rapport aux autres métabolites.

Les études réalisées ont également permis d'établir des comparaisons *in vivo-in vitro*. Parmi les modèles *in vitro* utilisés figurent les microsomes hépatiques, les hépatocyte en culture primaire et les tranches de foie de rat. Ce dernier modèle a été privilégié en raison de sa facilité d'utilisation et de sa représentativité de l'animal entier en matière de métabolisme.

S'agissant de la vinchlozoline, les principaux métabolites observés *in vivo* chez le rat dans nos expérimentations ou d'après la littérature, ont été retrouvés *in vitro* après incubation avec des tranches de foie de rat. Les métabolites majoritaires formés sont issus de l'oxydation de la fonction vinyle de la vinchlozoline ou de son produit de dégradation M2, puis d'une conjugaison à l'acide glucuronique sur les fonctions alcool formées. Dans nos conditions expérimentales, l'ensemble des métabolites ainsi obtenus représente près de 61 % de la radioactivité totale incubée avec les tranches de foie, tandis qu'M1 représente environ 12 % de la radioactivité totale en moyenne. Une situation tout à fait similaire a été observée pour les profils urinaires de rats ayant reçu par gavage une dose unique de ¹⁴C-vinchlozoline.

De même, les principaux métabolites obtenus après incubation du BPA ou de la génistéine en présence des tranches de foie étaient les mêmes que ceux rapportés par la littérature *in vivo* chez le rat ou chez l'Homme. Il s'agit du BPA conjugué à l'acide glucuronique et de la génistéine conjuguée à l'acide glucuronique en position 7 ainsi que la génistéine conjuguée à la fois à l'acide glucuronique en position 7 et à l'acide sulfurique en position 4'. Les métabolites majoritaires de la génistéine étaient également produits par les hépatocytes cryopréservés de rat et ceux d'Homme.

Néanmoins, par rapport aux observations faites *in vivo*, les métabolites issus des étapes de phase I étaient soit absents (BPA ou génistéine) soit moins variés (vinchlozoline), malgré l'expression des enzymes de phase I dont l'activité a été contrôlée par la biotransformation de la 7-éthoxycoumarine en 7-hydroxycoumarine.

Le second objectif de ce travail a été la caractérisation des capacités de biotransformation des lignées cellulaires utilisées dans l'étude des perturbateurs endocriniens. Les lignées cellulaires MCF-7 et HepG2 ont montré une activité des enzymes de phase I bien plus faible encore que celle des tranches de foie, insuffisante pour nous permettre de détecter la production d'éventuels métabolites hydroxylés du BPA ou de la génistéine. Néanmoins, ces

deux lignées cellulaires expriment les enzymes de phase II impliquées dans la conjugaison du BPA et de la génistéine à l'acide sulfurique et dans une moindre mesure à l'acide glucuronique. La vinchlozoline est entièrement dégradée en M1 et M2 dès 12 hr. Ces deux produits antiandrogéniques ne subissent aucune biotransformation ni par les cellules MCF-7, ni par les cellules HepG2, du fait de leur incapacité à procéder à l'étape d'oxydation du groupement vinyl préalable à toute conjugaison ultérieure. Enfin, l'activité enzymatique de phase I ou de phase II des cellules HC11 était nulle quelque soit le substrat employé.

L'absence pratiquement complète de biotransformation par les enzymes de phase I quelque soit la lignée cellulaire utilisée peut entraîner dans certains cas soit une sous estimation, soit au contraire une surestimation de l'activité perturbatrice endocrinienne de la molécule testée. En effet, si la molécule testée doit être bioactivée par une étape de phase I, les lignées cellulaires ne permettront le plus souvent pas de détecter cette activité. Au contraire, si une molécule donnée est active avant toute biotransformation et qu'une étape de phase I est nécessaire avant que toute étape de phase II puisse avoir lieu, l'activité observée ne prendra pas en compte sa potentielle inactivation et sera ainsi surestimée.

Tout métabolisme n'est pas absent des lignées cellulaires telles que les lignées HepG2 et MCF7, où les sulfotransférases et dans une moindre mesure les glucuronotransférases impliquées dans la conjugaison de la génistéine et du BPA étaient exprimées. Ces biotransformations mènent habituellement à des métabolites moins actifs, sinon inactifs, et risquent donc d'induire une sous évaluation de l'activité de la molécule testée si l'étendue de cette inactivation n'est pas prise en compte dans l'analyse des résultats.

Certains tests sont réalisés à l'aide d'un système constitué d'une lignée cellulaire, telles les cellules HepG2, cotransfectée avec les plasmides contenant le gène d'un récepteur nucléaire et un gène rapporteur (Maness et al, 1998, Gaido et al. 2000, Simon et al., 2006, Zhang et al., 2007). Ces cellules HepG2 peuvent ainsi être cotransfectées transitoirement avec l'hAR et les gènes de la luciférase ou de la β -galactosidase, et constituer un système permettant d'évaluer l'activité (anti)androgénique des molécules testées. Le test androgénique consiste à mesurer l'activités luciférase et β -galactosidase en présence de dihydroxytestostérone (molécule androgénique de référence) associée ou non à la molécule testée. Or si les cinétiques de biotransformation de la molécule de référence sont toujours identiques pour une lignée cellulaire et des conditions de culture données, les molécules testées peuvent être différemment métabolisées en fonction de leur structure chimique sans que ces différences d'activation ou d'inactivation soient représentatives de ce qui est observé *in vivo*. En

l'absence de données sur le devenir des molécules testées, les résultats observés sont donc difficilement interprétables, puisqu'ils peuvent aussi bien sous estimer que surestimer l'activité que pourra avoir la molécule *in vivo* en fonction des capacités de la lignée cellulaire à la métaboliser.

Néanmoins, certaines cellules n'expriment pas les enzymes impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques. C'est le cas par exemple des cellules HC11. Ces cellules semblent idéales pour tester l'activité intrinsèque des molécules. Le risque principal lors de l'emploi de ces cellules est d'obtenir un résultat faussement négatif et de ne pas détecter l'activité potentielle d'une molécule qui doit être activée lors de sa biotransformation. Pour résoudre l'insuffisance métabolique des modèles cellulaires couramment utilisés, en particulier concernant les enzymes de phase I, principalement impliquées dans les phénomènes de bioactivation, plusieurs auteurs ont proposé d'inclure à ces tests un système métabolique exogène tel que des fractions S9 de foie de rat (Sumida et al., 2001, Hashimoto et al., 2001), ou encore de singe et d'homme (Yoshihara et al., 2001, 2004). Cependant, ce système présente quelques inconvénients, tels que la production en excès de métabolites normalement minoritaires ou même absents *in vivo*, ou encore l'inactivation de perturbateurs endocriniens reconnus, voire d'hormones endogènes comme le 17 β -estradiol (Yoshihara et al., 2001). Le risque de liaison non spécifique des molécules testées aux protéines de la fraction enzymatique ainsi que la cytotoxicité de ces fractions vis-à-vis des cellules sont également à prendre en compte. Enfin, les résultats obtenus en associant les cellules à l'emploi de fractions S9 sont trop peu reproductibles (OECD, 2006).

D'autres solutions peuvent être envisagées, comme le développement de lignées cellulaires génétiquement modifiées pour exprimer les enzymes impliquées dans les voies de biotransformation des xénobiotiques. Là encore, certains problèmes techniques peuvent apparaître. En particulier, le nombre de CYP pouvant être incorporé dans une lignée cellulaire est limité (OECD, 2006). Il peut également être envisagé d'induire l'expression d'enzymes du métabolisme de façon spécifique avant de réaliser les tests choisis, mais toutes les enzymes ne sont pas inductibles au sein d'une lignée cellulaire comme les HepG2 (Westerink et Schoonen, 2007).

Des systèmes dits *in silico* sont également en cours de développement. Ces systèmes sont des logiciels utilisant les ressources informatiques afin de calculer et prédire, pour une molécule donnée, les métabolites susceptibles d'être formés, les enzymes impliquées dans ces voies métaboliques, et la toxicité liée à ces métabolites ou à leur production (Cronin, 2001). Par exemple, MetabolExpert, développé et commercialisés par CompuDrug Chemistry Ltd

(USA), permet de faire des prédictions qualitatives sur l'identité des métabolites formés et des enzymes impliquées dans ces réactions de biotransformation. Un logiciel complémentaire, HazardExpert, permet de prédire un certain nombre d'effets toxiques, en prenant en compte des facteurs comme l'espèce, la dose, la voie et la durée d'exposition. En associant HazardExpert et MetabolExpert, il est possible d'obtenir des prédictions de la toxicité du composé parent et de ses métabolites potentiels. Dans l'immédiat, l'inconvénient principal de ces systèmes *in silico* est dû à l'absence de prédiction de la toxicité liée à la perturbation endocrinienne. En outre, ces systèmes de prédiction des voies de biotransformation n'ont pour objectif que d'indiquer les métabolites principaux susceptibles d'être observés *in vivo*.

En termes de prolongement et de perspectives de ce travail, plusieurs points méritent d'être mentionnés :

- Les principales voies de biotransformation de la vinchlozoline ont été établies *in vivo* à partir l'urine de rat et *in vitro* à l'aide de tranches de foie de rat, mais certains métabolites minoritaires restent à identifier. Par ailleurs, la pertinence de ces voies pour l'Homme mériterait d'être étudiée en utilisant des systèmes biologiques tels que les microsomes ou les hépatocytes d'origine humaine.
- De manière plus générale, les biotransformations des composés testés pour leur activité de perturbation endocrinienne méritent d'être davantage prises en compte. C'est une étape décisive au développement de méthodes alternatives aux approches *In vivo* mais également une nécessité en matière d'interprétations des données obtenues. Cette prise en compte peut éventuellement se faire à l'aide de systèmes de biotransformation exogènes, tels que S9 ou microsomes, voire la modification génétique des cellules utilisées pour les tests afin de leur permettre d'exprimer les enzymes impliquées dans les voies de biotransformation des perturbateurs endocriniens. Dans tous les cas, ces alternatives nécessitent davantage de mises au point méthodologique et de données expérimentales.
- Les cellules HC11 se révèlent un modèle potentiellement intéressant pour l'étude des molécules estrogéniques. En effet, elles permettent d'évaluer l'activité estrogénique intrinsèque des xénobiotiques, voire de leurs métabolites isolés, ceux-ci ne subissant aucune biotransformation pendant la durée de leur incubation. Leur emploi associé à des études parallèles avec des cellules exprimant certaines enzymes de phase II, telles les cellules MCF7 ou HepG2, permettrait de mesurer l'influence des biotransformation de phase II. Afin de diminuer les risques de fausses interprétations, il demeure essentiel de caractériser l'activité

enzymatique des cellules employées, une même lignée pouvant montrer une variation d'activité marquée entre les souches (Hewitt et Hewitt, 2004).

BIBLIOGRAPHIE

- Adami, H. O., Bergstrom, R., Mohner, M., Zatonski, W., Storm, H., Ekblom, A., Tretli, S., Teppo, L., Ziegler, H., Rahu, M. and et al., 1994. Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* 59 (1) 33-8.
- Adlercreutz, C. H., Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Hockerstedt, K. A., Watanabe, S., Hamalainen, E. K., Markkanen, M. H., Makela, T. H., Wahala, K. T. and Adlercreutz, T., 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr* 125 (3 Suppl) 757S-770S.
- Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R. and Hardy, M. P., 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology* 145 (2) 592-603.
- Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H. and Elbetieha, A. M., 2002. Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Eur J Oral Sci* 110 (2) 163-7.
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E. and Nadal, A., 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function *in vivo* and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 114 (1) 106-12.
- Ansar Ahmed, S., Penhale, W. J. and Talal, N., 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol* 121 (3) 531-51.
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M. and Skinner, M. K., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308 (5727) 1466-9.
- Anway, M. D., Leathers, C. and Skinner, M. K., 2006. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 147 (12) 5515-23.
- Arai, Y., Uehara, M., Sato, Y., Kimira, M., Eboshida, A., Adlercreutz, H. and Watanabe, S., 2000. Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J Epidemiol* 10 (2) 127-35.
- Arnold, S. F., Klotz, D. M., Collins, B. M., Vonier, P. M., Guillette, L. J., Jr. and McLachlan, J. A., 1996. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272 (5267) 1489-92.
- Ashby, J. and Tinwell, H., 1998. Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ Health Perspect* 106 (11) 719-20.
- Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K. J., Walker, M., Fisher, J. S., Morley, M., Millar, M. R., Groome, N. P. and Sharpe, R. M., 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: Evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141 (10) 3898-3907.
- Atkinson, A. and Roy, D., 1995a. *In vitro* conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem Biophys Res Commun* 210 (2) 424-33.
- Atkinson, A. and Roy, D., 1995b. *In vivo* DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen* 26 (1) 60-6.
- Atluru, S. and Atluru, D., 1991. Evidence that genistein, a protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits CD28 monoclonal-antibody-stimulated human T cell proliferation. *Transplantation* 51 (2) 448-50.
- Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F. and Jouannet, P., 1995. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 332 (5) 281-5.

- Awoniyi, C. A., Roberts, D., Veeramachaneni, D. N., Hurst, B. S., Tucker, K. E. and Schlaff, W. D., 1998. Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertil Steril* 70 (3) 440-7.
- Baatrup, E. and Junge, M., 2001. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Environ Health Perspect* 109 (10) 1063-70.
- Balaguer, P., Joyeux, A., Denison, M. S., Vincent, R., Gillesby, B. E. and Zacharewski, T., 1996. Assessing the estrogenic and dioxin-like activities of chemicals and complex mixtures using *in vitro* recombinant receptor-reporter gene assays. *Can J Physiol Pharmacol* 74 (2) 216-22.
- Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J. and Nilsson, S., 1998. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 54 (1) 105-12.
- Barnes, S., Sfakianos, J., Coward, L. and Kirk, M., 1996. Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Adv Exp Med Biol* 401 87-100.
- Baskin, L. S., Himes, K. and Colborn, T., 2001. Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection? *Environ Health Perspect* 109 (11) 1175-83.
- Bayley, M., Junge, M. and Baatrup, E., 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquat Toxicol* 56 (4) 227-39.
- Bayley, M., Larsen, P. F., Baekgaard, H. and Baatrup, E., 2003. The effects of vinclozolin, an anti-androgenic fungicide, on male guppy secondary sex characters and reproductive success. *Biol Reprod* 69 (6) 1951-6.
- Belfroid, A., van Velzen, M., van der Horst, B. and Vethaak, D., 2002. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* 49 (1) 97-103.
- Berger, R. G., Hancock, T. and deCatanzaro, D., 2007. Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reprod Toxicol* 23 (2) 138-44.
- Biau, S., Bayle, S., de Santa Barbara, P. and Roig, B., 2007. The chick embryo: an animal model for detection of the effects of hormonal compounds. *Anal Bioanal Chem* 387 (4) 1397-403.
- Biles, J. E., White, K. D., McNeal, T. P. and Begley, T. H., 1999. Determination of the diglycidyl ether of bisphenol A and its derivatives in canned foods. *J Agric Food Chem* 47 (5) 1965-9.
- Blair, H. C., Jordan, S. E., Peterson, T. G. and Barnes, S., 1996. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 61 (4) 629-37.
- Boos, G. and Stopper, H., 2000. Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicol Lett* 116 (1-2) 7-16.
- Brandon, E. F., Bosch, T. M., Deenen, M. J., Levink, R., van der Wal, E., van Meerveld, J. B., Bijl, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. and Meijerman, I., 2006. Validation of *in vitro* cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 211 (1) 1-10.
- Branham, W. S., Dial, S. L., Moland, C. L., Hass, B. S., Blair, R. M., Fang, H., Shi, L., Tong, W., Perkins, R. G. and Sheehan, D. M., 2002. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *J Nutr* 132 (4) 658-64.

- Brede, C., Fjeldal, P., Skjevraak, I. and Herikstad, H., 2003. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam* 20 (7) 684-9.
- Breinholt, V. and Larsen, J. C., 1998. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chem Res Toxicol* 11 (6) 622-9.
- Breinholt, V. M., Rasmussen, S. E., Brosen, K. and Friedberg, T. H., 2003. *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. *Pharmacol Toxicol* 93 (1) 14-22.
- Brooks, J. D. and Thompson, L. U., 2005. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94 (5) 461-7.
- Brotans, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V. and Olea, N., 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 103 (6) 608-12.
- Bursztyka, J., Perdu, E., Tulliez, J., Debrauwer, L., Delous, G., Canlet, C., De Sousa, G., Rahmani, R., Benfenati, E. and Cravedi, J. P., 2007. Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes. *Food Chem Toxicol* doi: 10.1016/j.fct.2007.10.023
- Busby, M. G., Jeffcoat, A. R., Bloedon, L. T., Koch, M. A., Black, T., Dix, K. J., Heizer, W. D., Thomas, B. F., Hill, J. M., Crowell, J. A. and Zeisel, S. H., 2002. Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr* 75 (1) 126-36.
- Buterin, T., Koch, C. and Naegeli, H., 2006. Convergent transcriptional profiles induced by endogenous estrogen and distinct xenoestrogens in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 27 (8) 1567-78.
- Cabras, P., Diana, P., Meloni, M., Pirisi, F. M. and Pirisi, R., 1983. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of pesticides. VII. Analysis of Vinclozolin, Iprodione, Procymidone, Dichlozolate and their degradation product 3,5-dichloroaniline on white must and wine extracts. *J Chromatogr* 256 (1) 176-81.
- Calafat, A. M., Kuklennyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J. and Needham, L. L., 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113 (4) 391-5.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Skakkabaek, N. E. and Keiding, N., 1993. Decreasing quality of semen. *Bmj* 306 (6875) 461.
- Carlucci, G., Pasquale, D. D., Ruggieri, F. and Mazzeo, P., 2005. Determination and validation of a simple high-performance liquid chromatographic method for simultaneous assay of iprodione and vinclozolin in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 828 (1-2) 108-12.
- Chang, H. C., Churchwell, M. I., Delclos, K. B., Newbold, R. R. and Doerge, D. R., 2000. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 130 (8) 1963-70.
- Chang, H. S., Anway, M. D., Rekow, S. S. and Skinner, M. K., 2006. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology* 147 (12) 5524-41.
- Cheek, A. O., Kow, K., Chen, J. and McLachlan, J. A., 1999. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: Interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. *Environmental Health Perspectives* 107 (4) 273-278.

- Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C. and Yager, J. D., 2004. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (6) E1011-22.
- Chen, W. F., Huang, M. H., Tzang, C. H., Yang, M. and Wong, M. S., 2003. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta* 1638 (2) 187-96.
- Chen, Z., Zheng, W., Custer, L. J., Dai, Q., Shu, X. O., Jin, F. and Franke, A. A., 1999. Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutr Cancer* 33 (1) 82-7.
- Chernoff, N. and Rogers, E. H., 1976. Fetal toxicity of kepone in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 38 (1) 189-94.
- Chodon, D., Ramamurty, N. and Sakthisekaran, D., 2007. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line. *Toxicol In vitro* 21 (5) 887-91.
- Clarke, D. B., Barnes, K. A., Castle, L., Rose, M., Wilson, L. A., Baxter, M. J., Price, K. R. and DuPont, M. S., 2003. Levels of phytoestrogens, inorganic trace-elements, natural toxicants and nitrate in vegetarian duplicate diets. *Food Chemistry* 81 (2) 287-300.
- Clarke, D. B., Lloyd, A. S., Botting, N. P., Oldfield, M. F., Needs, P. W. and Wiseman, H., 2002. Measurement of intact sulfate and glucuronide phytoestrogen conjugates in human urine using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with [¹³C(3)]isoflavone internal standards. *Anal Biochem* 309 (1) 158-72.
- Coldham, N. G., Dave, M., Sivapathasundaram, S., McDonnell, D. P., Connor, C. and Sauer, M. J., 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect* 105 (7) 734-42.
- Coldham, N. G., Howells, L. C., Santi, A., Montesissa, C., Langlais, C., King, L. J., Macpherson, D. D. and Sauer, M. J., 1999. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70 (4-6) 169-84.
- Coldham, N. G. and Sauer, M. J., 2000. Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol* 164 (2) 206-15.
- Constantinou, A. I., Kamath, N. and Murley, J. S., 1998a. Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur J Cancer* 34 (12) 1927-34.
- Constantinou, A. I., Krygier, A. E. and Mehta, R. R., 1998b. Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice. *Am J Clin Nutr* 68 (6 Suppl) 1426S-1430S.
- Cooke, P. S., Heine, P. A., Taylor, J. A. and Lubahn, D. B., 2001. The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 178 (1-2) 147-54.
- Cotroneo, M. S. and Lamartiniere, C. A., 2001. Pharmacologic, but not dietary, genistein supports endometriosis in a rat model. *Toxicol Sci* 61 (1) 68-75.
- Dai, D., Cao, Y., Falls, G., Levi, P. E., Hodgston, E. and Rose, R. L., 2001. Modulation of Mouse P450 Isoforms CYP1A2, CYP2B10, CYP2E1, and CYP3A by the Environmental Chemicals Mirex, 2,2-Bis(*p*-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene, Vinclozolin, and Flutamide. *Pest Biochem Phys* 70 127-141.
- De Boever, P., Demare, W., Vanderperren, E., Cooreman, K., Bossier, P. and Verstraete, W., 2001. Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder. *Environ Health Perspect* 109 (7) 691-7.

- Dearnaley, D. P., Huddart, R. A. and Horwich, A., 2001. Regular review - Managing testicular cancer. *British Medical Journal* 322 (7302) 1583-1588.
- Dehal, S. S. and Kupfer, D., 1999. Cytochrome P-450 3A and 2D6 catalyze ortho hydroxylation of 4-hydroxytamoxifen and 3-hydroxytamoxifen (droloxifene) yielding tamoxifen catechol: involvement of catechols in covalent binding to hepatic proteins. *Drug Metab Dispos* 27 (6) 681-8.
- Della Seta, D., Minder, I., Belloni, V., Aloisi, A. M., Dessi-Fulgheri, F. and Farabollini, F., 2006. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav* 50 (2) 301-7.
- Dhananjeyan, M. R., Erhardt, P. W. and Corbitt, C., 2006. Simultaneous determination of vinclozolin and detection of its degradation products in mouse plasma, serum and urine, and from rabbit bile, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1115 (1-2) 8-18.
- Divi, R. L., Chang, H. C. and Doerge, D. R., 1997. Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem Pharmacol* 54 (10) 1087-96.
- Dodds, E. C., Goldberg, L., Lawson, W. and Roninson, R., 1938. Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature* 141 247-249.
- Dodds, E. C. and Lawson, W., 1936. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137 996.
- Dodge, J. A., Glasebrook, A. L., Magee, D. E., Phillips, D. L., Sato, M., Short, L. L. and Bryant, H. U., 1996. Environmental estrogens: Effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 59 (2) 155-161.
- Doerge, D. R., Chang, H. C., Churchwell, M. I. and Holder, C. L., 2000. Analysis of soy isoflavone conjugation *in vitro* and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 28 (3) 298-307.
- Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Chang, H. C., Newbold, R. R. and Delclos, K. B., 2001. Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary and gavage administration to Sprague Dawley rats. *Reprod Toxicol* 15 (2) 105-10.
- Dogterom, P., 1993. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab Dispos* 21 (4) 699-704.
- Drummond, A. E., Britt, K. L., Dyson, M., Jones, M. E., Kerr, J. B., O'Donnell, L., Simpson, E. R. and Findlay, J. K., 2002. Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 191 (1) 27-33.
- Edwards, T. M., Moore, B. C. and Guillette, L. J., Jr., 2006. Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view. *Int J Androl* 29 (1) 109-21.
- Eertmans, F., Dhooze, W., Stuyvaert, S. and Comhaire, F., 2003. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicol In vitro* 17 (5-6) 515-24.
- Ekins, S., Murray, G. I., Burke, M. D., Williams, J. A., Marchant, N. C. and Hawksworth, G. M., 1995. Quantitative differences in phase I and II metabolism between rat precision-cut liver slices and isolated hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 23 (11) 1274-9.
- Ekins, S., Williams, J. A., Murray, G. I., Burke, M. D., Marchant, N. C., Engeset, J. and Hawksworth, G. M., 1996. Xenobiotic metabolism in rat, dog, and human precision-cut liver slices, freshly isolated hepatocytes, and vitrified precision-cut liver slices. *Drug Metab Dispos* 24 (9) 990-5.
- Elsby, R., Maggs, J. L., Ashby, J. and Park, B. K., 2001. Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol

- A: Implications for extrapolation to humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297 (1) 103-113.
- Fang, N., Yu, S. and Badger, T. M., 2002. Characterization of isoflavones and their conjugates in female rat urine using LC/MS/MS. *J Agric Food Chem* 50 (9) 2700-7.
- Faulds, M. H., Olsen, H., Helguero, L. A., Gustafsson, J. A. and Haldosen, L. A., 2004. Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 18 (2) 412-21.
- Felson, D. T., Zhang, Y., Hannan, M. T., Kiel, D. P., Wilson, P. W. and Anderson, J. J., 1993. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women. *N Engl J Med* 329 (16) 1141-6.
- Fent, G., Hein, W. J., Moendel, M. J. and Kubiak, R., 2003. Fate of 14C-bisphenol A in soils. *Chemosphere* 51 (8) 735-46.
- Franke, A. A., Custer, L. J. and Tanaka, Y., 1998. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am J Clin Nutr* 68 (6 Suppl) 1466S-1473S.
- Franke, A. A., Halm, B. M., Custer, L. J., Tatsumura, Y., and Hebshi, S., 2006. Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy. *AM J Clin Nutr* 84 406-413.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J. and Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research* 36 (6) 1429-1438.
- Gelbke, H. P., Kayser, M. and Poole, A., 2004. OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 205 (1-2) 17-25.
- Good, E. E., Ware, G. W. and Miller, D. F., 1965. Effects of insecticides on reproduction in the laboratory mouse. I. Kepone. *J Econ Entomol* 58 (4) 754-7.
- Gooding, M. P. and LeBlanc, G. A., 2001. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Gen Comp Endocrinol* 122 (2) 172-80.
- Goodson, A., Summerfield, W. and Cooper, I., 2002. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit Contam* 19 (8) 796-802.
- Gould, J. C., Leonard, L. S., Maness, S. C., Wagner, B. L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D. P. and Gaido, K. W., 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 142 (1-2) 203-14.
- Gray, L. E., Jr., Ostby, J., Monosson, E. and Kelce, W. R., 1999. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Ind Health* 15 (1-2) 48-64.
- Gray, L. E., Jr., Ostby, J., Wilson, V., Lambright, C., Bobseine, K., Hartig, P., Hotchkiss, A., Wolf, C., Furr, J., Price, M., Parks, L., Cooper, R. L., Stoker, T. E., Laws, S. C., Degitz, S. J., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, E. A., Tietge, J. E. and Ankley, G. T., 2002. Xenoendocrine disruptors-tiered screening and testing: filling key data gaps. *Toxicology* 181-182 371-82.
- Gray, L. E., Jr., Ostby, J. S. and Kelce, W. R., 1994. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 129 (1) 46-52.
- Green, S., Kumar, V., Krust, A., Walter, P. and Chambon, P., 1986. Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 2 751-8.
- Grossman, C. J., 1984. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr Rev* 5 (3) 435-55.
- Gupta, C., 2000. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* 224 (2) 61-8.
- Gustafsson, J. A., 2003. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 24 (9) 479-85.

- Gustafsson, J. A. and Warner, M., 2000. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74 (5) 245-8.
- Gutendorf, B. and Westendorf, J., 2001. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166 (1-2) 79-89.
- Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M., 1998. Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver. *Archives of Toxicology* 72 (7) 387-394.
- Harper, A., Kerr, D. J., Gescher, A. and Chipman, J. K., 1999. Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation. *Free Radic Res* 31 (2) 149-60.
- Harrington, W. R., Sengupta, S. and Katzenellenbogen, B. S., 2006. Estrogen regulation of the glucuronidation enzyme UGT2B15 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Endocrinology* 147 (8) 3843-50.
- Hashimoto, Y., Moriguchi, Y., Oshima, H., Kawaguchi, M., Miyazaki, K. and Nakamura, M., 2001. Measurement of estrogenic activity of chemicals for the development of new dental polymers. *Toxicol In vitro* 15 (4-5) 421-5.
- Heine, P. A., Taylor, J. A., Iwamoto, G. A., Lubahn, D. B. and Cooke, P. S., 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23) 12729-12734.
- Heinonen, S. M., Hoikkala, A., Wahala, K. and Adlercreutz, H., 2003. Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87 (4-5) 285-99.
- Helguero, L. A., Faulds, M. H., Gustafsson, J. A. and Haldosen, L. A., 2005. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24 (44) 6605-16.
- Hewitt, N. J. and Hewitt, P., 2004. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* 34 (3) 243-56.
- Hilakivi-Clarke, L., Onojafe, I., Raygada, M., Cho, E., Skaar, T., Russo, I. and Clarke, R., 1999. Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. *Br J Cancer* 80 (11) 1682-8.
- Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y. and Taketani, Y., 1999. Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr J* 46 (6) 773-8.
- Ho, S. C., Chan, S. G., Yi, Q., Wong, E. and Leung, P. C., 2001. Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese women. *J Bone Miner Res* 16 (7) 1363-9.
- Ho, S. C., Woo, J. L., Leung, S. S., Sham, A. L., Lam, T. H. and Janus, E. D., 2000. Intake of soy products is associated with better plasma lipid profiles in the Hong Kong Chinese population. *J Nutr* 130 (10) 2590-3.
- Ho, S. M., Tang, W. Y., Belmonte de Frausto, J. and Prins, G. S., 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 66 (11) 5624-32.

- Holder, C. L., Churchwell, M. I. and Doerge, D. R., 1999. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. *J Agric Food Chem* 47 (9) 3764-70.
- Horiuchi, T., Onouchi, T., Takahashi, M., Ito, H. and Orimo, H., 2000. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int* 11 (8) 721-4.
- Hotchkiss, A. K., Ostby, J. S., Vandenberg, J. G. and Gray, L. E., Jr., 2003. An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiol Behav* 79 (2) 151-6.
- Hrelia, P., Fimognari, C., Maffei, F., Vigagni, F., Mesirca, R., Pozzetti, L., Paolini, M. and Forti, G. C., 1996. The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide Vinclozolin. *Mutagenesis* 11 (5) 445-453.
- Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z. and Helferich, W. G., 1998. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 58 (17) 3833-8.
- Hydovitz, J. D., 1960. Occurrence of goiter in an infant on a soy diet. *N Engl J Med* 262 351-3.
- Ike, M., Jin, C. S. and Fujita, M., 2000. Biodegradation of bisphenol A in the aquatic environment. *Water Science and Technology* 42 (7-8) 31-38.
- Ikeda, T., Nishikawa, A., Son, H. Y., Nakamura, H., Miyauchi, M., Imazawa, T., Kimura, S. and Hirose, M., 2001. Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation. *Jpn J Cancer Res* 92 (4) 390-5.
- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T. and Nagahama, Y., 2001. Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129 (2-3) 449-55.
- Imanaka, M., Sasaki, K., Nemoto, S., Ueda, E., Murakami, E., Miyata, D. and Tonogai, Y., 2001. Determination of bisphenol A in foods using GC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42 (2) 71-8.
- Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., MacDonald, E. and Aitken, J., 1996. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Bmj* 312 (7029) 467-71.
- Ishimi, Y., Arai, N., Wang, X., Wu, J., Umegaki, K., Miyaura, C., Takeda, A. and Ikegami, S., 2000. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun* 274 (3) 697-701.
- Jacobs, M. N., Dickins, M. and Lewis, D. F., 2003. Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptorbeta (hERbeta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hERalpha) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) ligand binding domain from the human PPARgamma crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84 (2-3) 117-32.
- Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R. and Graham, N. M., 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 84 (3) 223-43.
- Jaeg, J. P., Perdu, E., Dolo, L., Debrauwer, L., Cravedi, J. P. and Zalko, D., 2004. Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (15) 4935-4942.

- Janosek, J., Hilscherova, K., Blaha, L. and Holoubek, I., 2006. Environmental xenobiotics and nuclear receptors--interactions, effects and *in vitro* assessment. *Toxicol In vitro* 20 (1) 18-37.
- Jensen, T. K., Toppari, J., Keiding, N. and Skakkebaek, N. E., 1995. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clin Chem* 41 (12 Pt 2) 1896-901.
- Ju, Y. H., Allred, C. D., Allred, K. F., Karko, K. L., Doerge, D. R. and Helferich, W. G., 2001. Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *J Nutr* 131 (11) 2957-62.
- Kang, I. H., Kim, H. S., Shin, J. H., Kim, T. S., Moon, H. J., Kim, I. Y., Choi, K. S., Kil, K. S., Park, Y. I., Dong, M. S. and Han, S. Y., 2004. Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p, p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology* 199 (2-3) 145-59.
- Kang, J. H., Katayama, Y. and Kondo, F., 2006. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology* 217 (2-3) 81-90.
- Kang, J. H. and Kondo, F., 2002a. Bisphenol a degradation by bacteria isolated from river water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43 (3) 265-269.
- Kang, J. H. and Kondo, F., 2003. Determination of bisphenol A in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Food Prot* 66 (8) 1439-43.
- Kang, J. H. and Kondo, F., 2002b. Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. *Chemosphere* 49 (5) 493-498.
- Kang, K. S., Che, J. H. and Lee, Y. S., 2002. Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level. *Food Chem Toxicol* 40 (1) 43-51.
- Kaufmann, W. K., 1998. Human topoisomerase II function, tyrosine phosphorylation and cell cycle checkpoints. *Proc Soc Exp Biol Med* 217 (3) 327-34.
- Kawahata, H., Ohta, H., Inoue, M. and Suzuki, A., 2004. Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki Islands, Japan--within coral reefs and adjacent river mouths. *Chemosphere* 55 (11) 1519-27.
- Kawai, K., Nozaki, T., Nishikata, H., Aou, S., Takii, M. and Kubo, C., 2003. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 111 (2) 175-8.
- Kelce, W. R., Lambright, C. R., Gray, L. E., Jr. and Roberts, K. P., 1997. Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: *in vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 142 (1) 192-200.
- Kelce, W. R., Monosson, E., Gamcsik, M. P., Laws, S. C. and Gray, L. E., Jr., 1994. Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 126 (2) 276-85.
- Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kempainen, J. A. and Wilson, E. M., 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375 (6532) 581-5.
- Kevekordes, S., Gebel, T., Pav, K., Edenharder, R. and Dunkelberg, H., 1996. Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in the sister-chromatid exchange test with human lymphocytes *in vitro*. *Toxicology Letters* 89 (1) 35-42.
- Kim, J. and Kwon, C., 2001. Estimated dietary isoflavone intake of Korean population based on National Nutrition Survey. *Nutr Res* 21 (7) 947-953.

- Kim, S., Shin, H. J., Kim, S. Y., Kim, J. H., Lee, Y. S., Kim, D. H. and Lee, M. O., 2004. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol* 220 (1-2) 51-8.
- Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., Aomori, T., Nagao, T., Okabe, H., Nohara, T. and Masamune, Y., 2004. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull* 27 (2) 185-8.
- Kiparissis, Y., Metcalfe, T. L., Balch, G. C. and Metcalfe, C. D., 2003. Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 63 (4) 391-403.
- Klecka, G. M., Gonsior, S. J., West, R. J., Goodwin, P. A. and Markham, D. A., 2001. Biodegradation of bisphenol a in aquatic environments: River die-away. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (12) 2725-2735.
- Klip, H., Verloop, J., van Gool, J. D., Koster, M. E., Burger, C. W. and van Leeuwen, F. E., 2002. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 359 (9312) 1102-7.
- Knaak, J. B. and Sullivan, L. J., 1966. Metabolism of bisphenol A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 8 (2) 175-84.
- Korner, W., Vinggaard, A. M., Terouanne, B., Ma, R., Wieloch, C., Schlumpf, M., Sultan, C. and Soto, A. M., 2004. Interlaboratory comparison of four *in vitro* assays for assessing androgenic and antiandrogenic activity of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 112 (6) 695-702.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. and Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132 (6) 2279-86.
- Krumdieck, C. L., dos Santos, J. E. and Ho, K. J., 1980. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem* 104 (1) 118-23.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138 (3) 863-70.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (12) 5925-30.
- Kuiper, G. G. and Gustafsson, J. A., 1997. The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 410 (1) 87-90.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. and Gustafsson, J. A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139 (10) 4252-63.
- Kulling, S. E., Honig, D. M. and Metzler, M., 2001. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem* 49 (6) 3024-33.
- Kulling, S. E., Honig, D. M., Simat, T. J. and Metzler, M., 2000. Oxidative *in vitro* metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J Agric Food Chem* 48 (10) 4963-72.
- Kulling, S. E., Lehmann, L. and Metzler, M., 2002. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777 (1-2) 211-8.

- Kulling, S. E. and Metzler, M., 1997. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem Toxicol* 35 (6) 605-13.
- Kulling, S. E., Rosenberg, B., Jacobs, E. and Metzler, M., 1999. The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol* 73 (1) 50-4.
- Kurosawa, T., Hiroi, H., Tsutsumi, O., Ishikawa, T., Osuga, Y., Fujiwara, T., Inoue, S., Muramatsu, M., Momoeda, M. and Taketani, Y., 2002. The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr J* 49 (4) 465-71.
- Lamartiniere, C. A., Moore, J., Holland, M. and Barnes, S., 1995. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 208 (1) 120-3.
- Lee, H. J., Chattopadhyay, S., Gong, E. Y., Ahn, R. S. and Lee, K., 2003. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci* 75 (1) 40-6.
- Leffers, H., Naesby, M., Vendelbo, B., Skakkebaek, N. E. and Jorgensen, M., 2001. Oestrogenic potencies of Zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Hum Reprod* 16 (5) 1037-45.
- Liehr, J. G. and Roy, D., 1990. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med* 8 (4) 415-23.
- Lindh, C. H., Littorin, M., Amilon, A. and Jonsson, B. A., 2007. Analysis of 3,5-dichloroaniline as a biomarker of vinclozolin and iprodione in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21 (4) 536-42.
- Ling, W. H. and Jones, P. J., 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 57 (3) 195-206.
- Loft, S. and Poulsen, H. E., 1989. Metabolism of metronidazole and antipyrine in isolated rat hepatocytes. Influence of sex and enzyme induction and inhibition. *Biochem Pharmacol* 38 (7) 1125-36.
- Loukovaara, M., Carson, M., Palotie, A. and Adlercreutz, H., 1995. Regulation of sex hormone-binding globulin production by isoflavonoids and patterns of isoflavonoid conjugation in HepG2 cell cultures. *Steroids* 60 (9) 656-61.
- Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C. and Soto, A. M., 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol* 254-255 179-86.
- Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Marsico, S., Panno, M. L., Cenni, B., Picard, D. and Ando, S., 2001. Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 60 (3) 595-602.
- Markey, C. M., Luque, E. H., Munoz De Toro, M., Sonnenschein, C. and Soto, A. M., 2001. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65 (4) 1215-23.
- Massaad, C., Entezami, F., Massade, L., Benahmed, M., Olivennes, F., Barouki, R. and Hamamah, S., 2002. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 100 (2) 127-37.
- Matsumoto, A., Kunugita, N., Kitagawa, K., Isse, T., Oyama, T., Foureman, G. L., Morita, M. and Kawamoto, T., 2003. Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect* 111 (1) 101-4.
- Matsumura, A., Ghosh, A., Pope, G. S. and Darbre, P. D., 2005. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94 (5) 431-43.

- Matthews, J. B., Twomey, K. and Zacharewski, T. R., 2001. *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chemical Research in Toxicology* 14 (2) 149-157.
- Mazur, W. and Adlercreutz, H., 1998. Naturally occurring oestrogens in food. *Pure and Applied Chemistry* 70 (9) 1759-1776.
- McEwen, B. S., 1999. Clinical review 108: The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (6) 1790-7.
- McLachlan, J. A., Newbold, R. R. and Bullock, B., 1975. Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science* 190 (4218) 991-2.
- McPhaul, M. J. and Young, M., 2001. Complexities of androgen action. *J Am Acad Dermatol* 45 (3 Suppl) S87-94.
- Mei, J., Yeung, S. S. and Kung, A. W., 2001. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (11) 5217-21.
- Mensah-Nyagan, A. G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G. and Vaudry, H., 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51 (1) 63-81.
- Mercadier, C., Vega, D. and Bastide, J., 1998. Chemical and biological transformation of the fungicide vinclozolin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (9) 3817-3822.
- Mitchell, J. A. and Cain, R. B., 1996. Rapid onset of the accelerated degradation of dicarboximide fungicides in a UK soil with a long history of agrochemical exclusion. *Pesticide Science* 48 (1) 1-11.
- Mitchell, J. H., Duthie, S. J. and Collins, A. R., 2000. Effects of phytoestrogens on growth and DNA integrity in human prostate tumor cell lines: PC-3 and LNCaP. *Nutr Cancer* 38 (2) 223-8.
- Miyakoda, H., Tabata, M., Onodera, S. and Takeda, K., 2000. Comparison of conjugative activity, conversion of bisphenol A to bisphenol A glucuronide, in fetal and mature male rat. *Journal of Health Science* 46 (4) 269-274.
- Moersh, G. W., Morrow, D. F. and Neuklis, W. A., 1967. The antifertility activity of isoflavones related to genistein. *J Med Chem* 10 154-158.
- Molina-Molina, J. M., Hillenweck, A., Jouanin, I., Zalko, D., Cravedi, J. P., Fernandez, M. F., Pillon, A., Nicolas, J. C., Olea, N. and Balaguer, P., 2006. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 216 (1) 44-54.
- Monosson, E., Kelce, W. R., Lambright, C., Ostby, J. and Gray, L. E., Jr., 1999. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health* 15 (1-2) 65-79.
- Moon, Y. J., Wang, X. and Morris, M. E., 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In vitro* 20 (2) 187-210.
- Moreno Frias, M., Garrido Frenich, A., Martinez Vidal, J. L., Mateu Sanchez, M., Olea, F. and Olea, N., 2001. Analyses of lindane, vinclozolin, aldrin, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT in human serum using gas chromatography with electron capture detection and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 760 (1) 1-15.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H. and Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (11) 5185-90.
- Mosselman, S., Polman, J. and Dijkema, R., 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392 (1) 49-53.

- Munguia-Lopez, E. M., Gerardo-Lugo, S., Peralta, E., Bolumen, S. and Soto-Valdez, H., 2005. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. *Food Addit Contam* 22 (9) 892-8.
- Munoz-de-Toro, M., Markey, C. M., Wadia, P. R., Luque, E. H., Rubin, B. S., Sonnenschein, C. and Soto, A. M., 2005. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146 (9) 4138-47.
- Murata, M., Midorikawa, K., Koh, M., Umezawa, K. and Kawanishi, S., 2004. Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry* 43 (9) 2569-77.
- Murray, T. J., Maffini, M. V., Ucci, A. A., Sonnenschein, C. and Soto, A. M., 2007. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23 (3) 383-90.
- Nagata, C., Inaba, S., Kawakami, N., Kakizoe, T. and Shimizu, H., 2000. Inverse association of soy product intake with serum androgen and estrogen concentrations in Japanese men. *Nutrition and Cancer-an International Journal* 36 (1) 14-18.
- Nagel, S. C., vom Saal, F. S. and Welshons, W. V., 1999. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an *in vitro* assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69 (1-6) 343-57.
- Nagel, S. C., vom Saal, F. S. and Welshons, W. V., 1998. The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 217 (3) 300-9.
- Nakagawa, Y. and Suzuki, T., 2002. Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 139 115-128.
- Nakagawa, Y. and Suzuki, T., 2001. Metabolism of bisphenol A in isolated rat hepatocytes and oestrogenic activity of a hydroxylated metabolite in MCF-7 human breast cancer cells. *Xenobiotica* 31 (3) 113-23.
- Nakajima, D., Kim, C. S., Oh, T. W., Yang, C. Y., Naka, T., Igawa, S. and Ohta, F., 2001. Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 20 (5) 285-91.
- Newbold, R. R., 2004. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicol Appl Pharmacol* 199 (2) 142-50.
- Newbold, R. R., Banks, E. P., Bullock, B. and Jefferson, W. N., 2001. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* 61 (11) 4325-8.
- Nilsson, S. and Gustafsson, J. A., 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2 (5) 360-6.
- Nilsson, U. and Papantoni, M., 1996. Long-term studies of fungicide concentrations in greenhouses .3. Exposure risks after spraying in greenhouses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (9) 2885-2888.
- Nishizawa, H., Imanishi, S. and Manabe, N., 2005. Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *J Reprod Dev* 51 (5) 593-605.
- Niwa, T., Fujimoto, M., Kishimoto, K., Yabusaki, Y., Ishibashi, F. and Katagiri, M., 2001. Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome p450 and steroidogenic CYP17. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24 (9) 1064-1067.
- Nunez, A. A., Kannan, K., Giesy, J. P., Fang, J. and Clemens, L. G., 2001. Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42 (8) 917-22.

- Nurmi, T., Mazur, W., Heinonen, S., Kokkonen, J. and Adlercreutz, H., 2002. Isoflavone content of the soy based supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (1) 1-11.
- Ochi, T., 1999. Induction of multiple microtubule-organizing centers, multipolar spindles and multipolar division in cultured V79 cells exposed to diethylstilbestrol, estradiol-17beta and bisphenol A. *Mutat Res* 431 (1) 105-21.
- Odum, J., Tinwell, H., Jones, K., Van Miller, J. P., Joiner, R. L., Tobin, G., Kawasaki, H., Deghenghi, R. and Ashby, J., 2001. Effect of rodent diets on the sexual development of the rat. *Toxicol Sci* 61 (1) 115-27.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M. and Sonnenschein, C., 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives* 104 (3) 298-305.
- Omi, N., Aoi, S., Murata, K. and Ezawa, I., 1994. Evaluation of the effect of soybean milk and soybean milk peptide on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 40 (2) 201-11.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J. and Scanlan, T. S., 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277 (5331) 1508-10.
- Pang, S., Cao, J. Q., Katz, B. H., Hayes, C. L., Sutter, T. R. and Spink, D. C., 1999. Inductive and inhibitory effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls on estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Biochem Pharmacol* 58 (1) 29-38.
- Parrish, A. R., Gandolfi, A. J. and Brendel, K., 1995. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* 57 (21) 1887-901.
- Patisaul, H. B., Dindo, M., Whitten, P. L. and Young, L. J., 2001. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha- and beta-dependant gene expression in the brain. *Endocrinology* 142 2946-2952.
- Paulozzi, L. J., Erickson, J. D. and Jackson, R. J., 1997. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics* 100 (5) 831-4.
- Pfeiffer, E. and Metzler, M., 2004. Effect of bisphenol A on drug metabolising enzymes in rat hepatic microsomes and precision-cut rat liver slices. *Arch Toxicol* 78 (7) 369-77.
- Pfeiffer, E., Rosenberg, B., Deuschel, S. and Metzler, M., 1997. Interference with microtubules and induction of micronuclei *in vitro* by various bisphenols. *Mutat Res* 390 (1-2) 21-31.
- Polkowski, K. and Mazurek, A. P., 2000. Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data. *Acta Pol Pharm* 57 (2) 135-55.
- Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Heinze, T. M., Beger, R. D. and Cerniglia, C. E., 2000. Biotransformation of vinclozolin by the fungus *Cunninghamella elegans*. *J Agric Food Chem* 48 (12) 6138-48.
- Pritchett, J. J., Kuester, R. K. and Sipes, I. G., 2002. Metabolism of bisphenol A in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metabolism and Disposition* 30 (11) 1180-1185.
- Pulgar, R., Olea-Serrano, M. F., Novillo-Fertrell, A., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Navajas, J. M. and Olea, N., 2000. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from Bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environmental Health Perspectives* 108 (1) 21-27.
- Ramos, J. G., Varayoud, J., Kass, L., Rodriguez, H., Costabel, L., Munoz-De-Toro, M. and Luque, E. H., 2003. Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 144 (7) 3206-15.

- Reel, J. R., Lamb, J. C. and Neal, B. H., 1996. Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundamental and Applied Toxicology* 34 (2) 288-305.
- Reuber, M. D., 1978. Carcinogenicity of kepone. *J Toxicol Environ Health* 4 (5-6) 895-911.
- Richter, C. A., Birnbaum, L. S., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Talsness, C. E., Vandenberg, J. G., Walser-Kuntz, D. R. and Vom Saal, F. S., 2007. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*
- Ridges, L., Sunderland, R., Moerman, K., Meyer, B., Astheimer, L. and Howe, P., 2001. Cholesterol lowering benefits of soy and linseed enriched foods. *Asia Pac J Clin Nutr* 10 (3) 204-11.
- Rivas, A., Lacroix, M., Olea-Serrano, F., Laios, I., Leclercq, G. and Olea, N., 2002. Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82 (1) 45-53.
- Roberts-Kirchhoff, E. S., Crowley, J. R., Hollenberg, P. F. and Kim, H., 1999. Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s. *Chem Res Toxicol* 12 (7) 610-6.
- Rubin, B. S., Lenkowski, J. R., Schaeberle, C. M., Vandenberg, L. N., Ronsheim, P. M. and Soto, A. M., 2006. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147 (8) 3681-91.
- Rubin, B. S., Murray, M. K., Damassa, D. A., King, J. C. and Soto, A. M., 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109 (7) 675-80.
- Rudel, R. A., Brody, J. G., Spengler, J. D., Vallarino, J., Geno, P. W., Sun, G. and Yau, A., 2001. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J Air Waste Manag Assoc* 51 (4) 499-513.
- Safe, S. and Krishnan, V., 1995. Chlorinated hydrocarbons: estrogens and antiestrogens. *Toxicol Lett* 82-83 731-6.
- Safe, S. H., Pallaroni, L., Yoon, K., Gaido, K., Ross, S. and McDonnell, D., 2002. Problems for risk assessment of endocrine-active estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 6 925-9.
- Saji, S., Jensen, E. V., Nilsson, S., Rylander, T., Warner, M. and Gustafsson, J. A., 2000. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (1) 337-42.
- Sakaue, M., Ohsako, S., Ishimura, R., Kurosawa, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., Aoki, Y., Yonemoto, J. and Tohyama, C., 2001. Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *Journal of Occupational Health* 43 (4) 185-190.
- Santell, R. C., Kieu, N. and Helferich, W. G., 2000. Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. *J Nutr* 130 (7) 1665-9.
- Sawai, C., Anderson, K. and Walser-Kuntz, D., 2003. Effect of bisphenol A on murine immune function: modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB X NZW F1 mice. *Environ Health Perspect* 111 (16) 1883-7.
- Schick, B., Moza, P. N., Hustert, K. and Kettrup, A., 1999. Photochemistry of vinclozolin in water and methanol-water solution. *Pestic. Sci.* 55 1116-1122.
- Setchell, K. D., 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68 (6 Suppl) 1333S-1346S.
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S. and Heubi, J. E., 2002. Evidence for lack of absorption of soy

- isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 76 (2) 447-53.
- Setchell, K. D., Faughnan, M. S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N. M., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Desai, P., Oldfield, M. F., Botting, N. P. and Cassidy, A., 2003. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 77 (2) 411-9.
- Setchell, K. D. R., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirschner, A. S., Cassidy, A. and Heubi, J. E., 2001. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition* 131 1362s-1375s.
- Setchell, K. D. R., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. N. and Heubi, J. E., 1998. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *American Journal of Clinical Nutrition* 68 (6) 1453s-1461s.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M. and Barnes, S., 1997. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr* 127 (7) 1260-8.
- Shelnutt, S. R., Cimino, C. O., Wiggins, P. A., Ronis, M. J. and Badger, T. M., 2002. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr* 76 (3) 588-94.
- Shimizu, M., Ohta, K., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Ohno, Y. and Ozawa, S., 2002. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicol In vitro* 16 (5) 549-56.
- Shono, T., Suita, S., Kai, H. and Yamaguchi, Y., 2004a. The effect of a prenatal androgen disruptor, vinclozolin, on gubernacular migration and testicular descent in rats. *J Pediatr Surg* 39 (2) 213-6.
- Shono, T., Suita, S., Kai, H. and Yamaguchi, Y., 2004b. Short-time exposure to vinclozolin in utero induces testicular maldescent associated with a spinal nucleus alteration of the genitofemoral nerve in rats. *J Pediatr Surg* 39 (2) 217-9; discussion 217-9.
- Simons, L. A., von Konigsmark, M., Simons, J. and Celermajer, D. S., 2000. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *Am J Cardiol* 85 (11) 1297-301.
- Singer, P. L., 1949. Occupational oligospermia. *J AM Med Assoc* 140 1249.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E. and Main, K. M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16 (5) 972-8.
- Snyder, R. W., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S. C. and Fennell, T. R., 2000. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 168 (3) 225-34.
- Sohoni, P. and Sumpter, J. P., 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158 (3) 327-39.
- Solakidi, S., Psarra, A. M. and Sekeris, C. E., 2005. Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1745 (3) 382-92.
- Somekawa, Y., Chiguchi, M., Ishibashi, T. and Aso, T., 2001. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol* 97 (1) 109-15.
- Song, T. T., Hendrich, S. and Murphy, P. A., 1999. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J Agric Food Chem* 47 (4) 1607-10.
- Sonnenschein, C. and Soto, A. M., 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65 (1-6) 143-50.

- Soto, A. M. and Sonnenschein, C., 1985. The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J Steroid Biochem* 23 (1) 87-94.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N. and Serrano, F. O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7 113-22.
- Spink, B. C., Katz, B. H., Hussain, M. M., Pang, S., Connor, S. P., Aldous, K. M., Gierthy, J. F. and Spink, D. C., 2000. SULT1A1 catalyzes 2-methoxyestradiol sulfonation in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 21 (11) 1947-57.
- Spink, D. C., Spink, B. C., Cao, J. Q., DePasquale, J. A., Pentecost, B. T., Fasco, M. J., Li, Y. and Sutter, T. R., 1998. Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis* 19 (2) 291-8.
- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T. and Harris, L. R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36 (10) 2149-2173.
- Steimer, T., 2003. *Steroid Hormone Metabolism*. Geneva Foundation for Medical Research.
- Sumida, K., Ooe, N., Nagahori, H., Saito, K., Isobe, N., Kaneko, H. and Nakatsuka, I., 2001. An *in vitro* reporter gene assay method incorporating metabolic activation with human and rat S9 or liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 280 (1) 85-91.
- Swan, S. H., Elkin, E. P. and Fenster, L., 1997. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 105 (11) 1228-32.
- Szeto, S. Y., Burlinson, N. E., Rahe, J. E. and Oloffs, P. C., 1989. Kinetics of Hydrolysis of the Dicarboximide Fungicide Vinclozolin. *J Agric Food Chem* 37 523-529.
- Takahashi, O. and Oishi, S., 2001. Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch Toxicol* 75 (1) 42-51.
- Takao, Y., Lee, H. C., Ishibashi, Y., Kohra, S., Tominaga, N. and Arizono, K., 1999. Fast screening method for bisphenol A in environmental water and in food by solid-phase microextraction (SPME). *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 45 (1) P39-P39.
- Taylor, J. R., Selhorst, J. B., Houff, S. A. and Martinez, A. J., 1978. Chlordecone intoxication in man. I. Clinical observations. *Neurology* 28 (7) 626-30.
- Tham, D. M., Gardner, C. D. and Haskell, W. L., 1998. Clinical review 97 - Potential health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (7) 2223-2235.
- Thomson, B. M. and Grounds, P. R., 2005. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. *Food Addit Contam* 22 (1) 65-72.
- Tikkanen, M. J., Wahala, K., Ojala, S., Vihma, V. and Adlercreutz, H., 1998. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (6) 3106-10.
- Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B. and Oehlmann, J., 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10 (6) 373-88.
- Toppari, J., Haavisto, A. M. and Alanen, M., 2002. Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries. *Cad Saude Publica* 18 (2) 413-20.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Hasegawa, K., Takahashi, M., Maizumi, N., Yamaguchi, F. and Barrett, J. C., 1998. Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int J Cancer* 75 (2) 290-4.

- Turci, R., Barisano, A., Balducci, C., Colosio, C. and Minoia, C., 2006. Determination of dichloroanilines in human urine by gas chromatography/mass spectrometry: validation protocol and establishment of Reference Values in a population group living in central Italy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20 (17) 2621-5.
- Uesugi, T., Fukui, Y. and Yamori, Y., 2002. Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four-week study. *J Am Coll Nutr* 21 (2) 97-102.
- Valentovic, M. A., Lo, H. H., Brown, P. I. and Rankin, G. O., 1995. 3,5-Dichloroaniline toxicity in Fischer 344 rats pretreated with inhibitors and inducers of cytochrome P450. *Toxicol Lett* 78 (3) 207-14.
- Vergne, S., Titier, K., Bernard, V., Asselineau, J., Durand, M., Lamothe, V., Potier, M., Perez, P., Demotes-Mainard, J., Chantre, P., Moorec, N., Bennetau-Pelissero, C. and Sauvart, P. Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: Effects of soy-based supplements formulation and equol production. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 1488-1494
- Viereck, V., Grundker, C., Blaschke, S., Siggelkow, H., Emons, G. and Hofbauer, L. C., 2002. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem* 84 (4) 725-35.
- Vivacqua, A., Recchia, A. G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., Di Gioia, M. L., Leggio, A., Bonofiglio, D., Liguori, A. and Maggiolini, M., 2003. The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine* 22 (3) 275-84.
- vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Parmigiani, S. and Welshons, W. V., 1998. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 14 (1-2) 239-60.
- vom Saal, F. S. and Hughes, C., 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 113 (8) 926-933.
- Wang, C. F. and Kurzer, M. S., 1997. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer-an International Journal* 28 (3) 236-247.
- Wang, H. J. and Murphy, P. A., 1994. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (8) 1666-1673.
- Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K. and Adlercreutz, H., 1998. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* 128 (10) 1710-5.
- Weidner, I. S., Moller, H., Jensen, T. K. and Skakkebaek, N. E., 1998. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 106 (12) 793-6.
- Westerink, W. M. and Schoonen, W. G., 2007a. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In vitro*
- Westerink, W. M. and Schoonen, W. G., 2007b. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In vitro*
- Wilkening, S. and Bader, A., 2003. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol* 17 (4) 207-13.

- Wiseman, H., Casey, K., Clarke, D. B., Barnes, K. A. and Bowey, E., 2002. Isoflavone aglycon and glucoconjugate content of high- and low-soy UK foods used in nutritional studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (6) 1404-1410.
- Wiseman, H., O'Reilly, J. D., Adlercreutz, H., Mallet, A. I., Bowey, E. A., Rowland, I. R. and Sanders, T. A., 2000. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 72 (2) 395-400.
- Wittke, K., Hajimiragha, H., Dunemann, L. and Begerow, J., 2001. Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 755 (1-2) 215-28.
- Wong, C., Kelce, W. R., Sar, M. and Wilson, E. M., 1995. Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem* 270 (34) 19998-20003.
- Wu, J., Wang, X. X., Takasaki, M., Ohta, A., Higuchi, M. and Ishimi, Y., 2001. Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 16 (10) 1829-36.
- Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A. and Hendrich, S., 1995. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr* 125 (9) 2307-15.
- Yang, M., Kim, S. Y., Lee, S. M., Chang, S. S., Kawamoto, T., Jang, J. Y. and Ahn, Y. O., 2003. Biological monitoring of bisphenol a in a Korean population. *Arch Environ Contam Toxicol* 44 (4) 546-51.
- Yasuda, T., Mizunuma, S., Kano, Y., Saito, K. and Oshawa, K., 1996. Urinary and biliary metabolites of genistein in rats. *Biol Pharm Bull* 19 (3) 413-7.
- Yoon, K., Pallaroni, L., Stoner, M., Gaido, K. and Safe, S., 2001. Differential activation of wild-type and variant forms of estrogen receptor alpha by synthetic and natural estrogenic compounds using a promoter containing three estrogen-responsive elements. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78 (1) 25-32.
- Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y. and Nakazawa, H., 2001. Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit Contam* 18 (1) 69-75.
- Yoshihara, S., Makishima, M., Suzuki, N. and Ohta, S., 2001. Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicol Sci* 62 (2) 221-7.
- Yoshihara, S., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K. and Ohta, S., 2004. Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol Sci* 78 (1) 50-9.
- Yoshino, S., Yamaki, K., Yanagisawa, R., Takano, H., Hayashi, H. and Mori, Y., 2003. Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice. *Br J Pharmacol* 138 (7) 1271-6.
- Zacharewski, T., 1998. Identification and assessment of endocrine disruptors: Limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. *Environmental Health Perspectives* 106 577-582.
- Zalko, D., Perdu-Durand, E., Debrauwer, L., Bec-Ferte, M. P. and Tulliez, J., 1998. Comparative metabolism of clenbuterol by rat and bovine liver microsomes and slices. *Drug Metab Dispos* 26 (1) 28-35.
- Zalko, D., Soto, A. M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R. and Cravedi, J. P., 2003. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect* 111 (3) 309-19.
- Ziegler, R. G., Hoover, R. N., Pike, M. C., Hildesheim, A., Nomura, A. M., West, D. W., Wu-Williams, A. H., Kolonel, L. N., Horn-Ross, P. L., Rosenthal, J. F. and Hyer, M. B.,

1993. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 85 (22) 1819-27.
- Zoeller, R. T., 2005. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Mol Cell Endocrinol* 242 (1-2) 10-5.