



HAL
open science

Étude in vivo / in vitro de l'effet de la zéaralénone sur l'expression de transporteurs ABC majeurs lors d'une exposition gestationnelle ou néonatale

Farah Koraïchi Koraichi

► **To cite this version:**

Farah Koraïchi Koraichi. Étude in vivo / in vitro de l'effet de la zéaralénone sur l'expression de transporteurs ABC majeurs lors d'une exposition gestationnelle ou néonatale. Toxicologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10314 . tel-01071280

HAL Id: tel-01071280

<https://theses.hal.science/tel-01071280>

Submitted on 3 Oct 2014

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 314-2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE (EDISS)

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 20 décembre 2012

par

Mlle Farah KORAÏCHI

TITRE :

**ETUDE *IN VIVO/IN VITRO* DE L'EFFET DE LA ZEARALENONE SUR L'EXPRESSION
DE TRANSPORTEURS ABC MAJEURS LORS D'UNE EXPOSITION
GESTATIONNELLE OU NEONATALE**

Directeur de thèse: Sylvaine LECOEUR

Co-directeur de thèse: Caroline PROUILLAC

JURY:

Président	Pr Jérôme GUITTON	Professeur, Université Lyon 1
Rapporteur	Dr Anne LESPINE	Directeur de Recherche INRA, Toulouse
Rapporteur	Dr Hamid BOUDRA	Ingénieur de Recherche INRA, Clermont-Ferrand
Examineur	Dr Arnaud COURTOIS	Maître de Conférences, Université Bordeaux II
Examineur	Dr Caroline PROUILLAC	Maître de Conférences, VetagroSup
Examineur	Dr Sylvaine LECOEUR	Directeur de Recherche INRA, Université Lyon 1

N° d'ordre 314-2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE (EDISS)

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 20 décembre 2012

par

Mlle Farah KORAÏCHI

TITRE :

**ETUDE *IN VIVO/IN VITRO* DE L'EFFET DE LA ZEARALENONE SUR L'EXPRESSION
DE TRANSPORTEURS ABC MAJEURS LORS D'UNE EXPOSITION
GESTATIONNELLE OU NEONATALE**

Directeur de thèse: Sylvaine LECOEUR

Co-directeur de thèse: Caroline PROUILLAC

JURY:

Président	Pr Jérôme GUITTON	Professeur Université Lyon 1
Rapporteur	Dr Anne LESPINE	Directeur de Recherche INRA, Toulouse
Rapporteur	Dr Hamid BOUDRA	Ingénieur de Recherche, INRA Clermont-Ferrand
Examineur	Dr Arnaud COURTOIS	Maître de Conférences Université Bordeaux II
Examineur	Dr Caroline PROUILLAC	Maître de Conférences VetagroSup
Examineur	Dr Sylvaine LECOEUR	Directeur de Recherche INRA, Université Lyon 1

A mes parents

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier

L'**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences et Santé (EDISS)** qui m'a permis de réaliser cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres du jury

Monsieur le Professeur Jérôme Guitton, pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Madame Anne LESPINE et **Monsieur Hamid BOUDRA** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, et **Monsieur Arnaud COURTOIS** pour sa participation au jury.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à

Madame Sylvaine LECOEUR et **Mademoiselle Caroline PROUILLAC**, pour leur encadrement de qualité et leurs précieux conseils. Je vous remercie infiniment de m'avoir fait confiance, soutenue et encouragée tout au long de ce travail.

Vous avez tout mon respect et mon affection.

Je tiens à remercier

Monsieur le Professeur Etienne BENOIT et **Monsieur le Professeur Hubert VIDAL** de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires, ainsi que **Monsieur le Professeur Mohamed Benahmed** de m'avoir permis d'effectuer une partie de mes expérimentations au sein de son laboratoire à Nice.

Je remercie également,

Mes parents (Farid et Farida), mon frère Fadel, et mes sœurs Ferial, Fairouz et Faten, pour leur soutien et leurs encouragements malgré la distance. Merci pour votre amour inconditionnel. Cette thèse vous est dédiée.

Jean Baptiste, mon âme sœur, qui m'a soutenue, encouragée et a toujours été là pour moi. Je n'oublie pas ton aide précieuse dans la mise en page de cette thèse. Merci de faire partie de ma vie, je te dédie également cette thèse.

Bernadette, ma maman de substitution, je me demande ce que j'aurai pu faire sans toi! Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi et tous les merveilleux moments qu'on a passé ensemble au bureau et ailleurs, et **Michelle** la plus drôle et la plus poète des personnes que je connaisse, merci de toujours penser à moi. Je chéris tous les bons moments qu'on a passés ensemble

Mes remerciements vont

A Alex et Alice, mes amis que je chéris profondément. Merci pour votre soutien et votre présence et pour les merveilleux moments passés en votre compagnie.

Aux thésards et non thésards du campus vétérinaire de Lyon: **Audrey, Thibaut, Laure, Clément, Julie, Sébastien, Aliénor, Lysiane, Pierre, Loris, Dominique, Benjamin, Abdé** pour votre sympathie et les joyeux moments passés ensemble.

Je remercie

Les thésards et non thésard du C3M à Nice: **Aurélié, Léo, Nadjem, Lilia, Benazir, Lilia, et Basma** pour leur aide précieuse dans ce travail et leur sympathie.

Je remercie également

Les thésards et stagiaires du laboratoire CarMeN: **Pierre (mon ChouChou), Roméo, Alexis, Kevin, Julien, Colin, Joffrey, Ouafa, Cyrielle, Yoan**, pour avoir intégrée «la pièce rapportée» dans leur groupe. Merci d'être aussi sympa et déjantés!

Et **Marie-Agnès** pour sa précieuse aide dans la technique de Western Blotting et sa bonne humeur

Stéphanie, de toujours penser à moi. Tu as toute mon affection.

Je remercie enfin,

L'ensemble du personnel du laboratoire de Toxicologie-Pharmacie du Campus vétérinaire de Lyon, et du Laboratoire CarMeN à Lyon Sud, pour leur présence et leur sympathie.

TITRE: ETUDE *IN VIVO/IN VITRO* DE L'EFFET DE LA ZEARALENONE SUR L'EXPRESSION DE TRANSPORTEURS ABC MAJEURS LORS D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE OU NEONATALE

RESUME

La zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine produite par des *Fusarium* qui contaminent les cultures céréalières. Oestrogéno-mimétique et perturbateur endocrinien, ses effets toxiques concernent l'appareil reproducteur. En amont de l'évaluation du risque lié à une exposition à de faibles doses de ZEN, nous nous sommes intéressés à l'effet de la ZEN sur le niveau d'expression de transporteurs ABC majeurs. Ces pompes d'efflux sont présentes dans les barrières de l'organisme (notamment les barrières testiculaires et placentaires) où elles jouent un rôle dans la protection des tissus contre la toxicité de leurs substrats xénobiotiques. Dans ce travail nous avons d'abord caractérisé le métabolisme et la distribution tissulaire de la ZEN chez le rat, puis avons évalué son effet respectivement à court et long terme sur l'expression des transporteurs ABC après une exposition gestationnelle et néonatale. Nos résultats mettent en évidence des différences de comportement toxicocinétique de la ZEN en fonction du genre et du statut hormonal, et une réelle exposition fœtale et néonatale via la mère. La ZEN module l'expression des transporteurs ABC majeurs *in vivo* (dans les organes maternels, le foie fœtal, le testicule du jeune adulte exposé J1-J5). Les résultats obtenus sur modèles *in vitro* (lignées sertolienne et placentaire) suggèrent que ces modulations sont liées en partie à l'interaction de la ZEN avec les récepteurs aux œstrogènes. Les conséquences d'une modulation de l'expression des transporteurs ABC induite par la ZEN pourraient être dramatiques pour le développement et la santé des individus à l'âge adulte et doivent être évaluées.

TITLE: *IN VIVO/IN VITRO* EFFECT OF ZEARALENONE ON MAJOR ABC TRANSPORTERS AFTER GESTATIONAL OR NEONATAL EXPOSURE.

ABSTRACT

Zearalenone (ZEN) is a mycotoxin produced by *Fusarium* that infect cereal crops. This Estrogen-mimetic and endocrine disruptor affects the reproductive system. Upstream of the risk assessment of exposure to low doses of ZEN, we are interested in the effect of ZEN on the expression level of major ABC transporters. These efflux pumps are present in the barriers of organism (including testicular and placental barriers), where they protect tissues against the toxicity of their xenobiotic substrates. In this work, we first characterized the metabolism and tissue distribution of ZEN in rat and then evaluated respectively its short and long-term effect on ABC transporters expression after gestational and neonatal exposure. Our results highlight differences in the toxicokinetic behavior of ZEN by gender and hormonal status, and fetal and neonatal real exposure via the mother. ZEN modulates the expression of major ABC transporters *in vivo* (in the maternal organs, fetal liver, testis of young adult exposed J1-J5). The results of *in vitro* models (sertoli and placental cell lines) suggest that these variations are partly due to the interaction of ZEN with the estrogen receptors. The consequences of expression modulations of ABC transporters induced by ZEN could be dramatic for the development and health of individuals in adulthood and should be evaluated.

DISCIPLINE: ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

MOTS-CLES: zéaralénone - transporteurs ABC - récepteurs nucléaires - mycotoxine oestrogénique-gestation - néonatalité

Unité INSERM U1060/ INRA 1235/ Université-Lyon1/ INSA-Lyon, Laboratoire de Recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition (CarMeN)

SOMMAIRE

SOMMAIRE	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION GENERALE	13
PARTIE A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
Chapitre 1. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	17
I. Définition	18
II. Les cibles des perturbateurs endocriniens	19
III. Propriétés d'un perturbateur endocrinien	20
III.1. Action aux faibles doses et relation Dose-Réponse non conventionnelle	20
III.2. Fenêtre d'exposition	23
III.3. Période de latence	24
III.4. Effets transgénérationnels et épigénétiques	24
III.5. Effets spécifiques d'espèce et différences de sensibilité liées au sexe.....	26
III.6. Effets des multi-contaminations	27
IV. Mécanismes d'action	28
IV.1. Mécanisme par action directe sur les récepteurs aux hormones	29
IV.1.1. Cas des perturbateurs endocriniens agissant sur les récepteurs aux œstrogènes	31
IV.1.2. Les effets métaboliques des perturbateurs endocriniens	33
IV.2. Modulation du métabolisme des hormones stéroïdiennes	34
IV.3. Modulation des coactivateurs des récepteurs nucléaires.....	36
IV.4. Dégradation des récepteurs nucléaires par l'intervention du protéasome	37
IV.5. Augmentation de la sensibilité aux hormones	38
IV.6. Altération de la méthylation de l'ADN.....	38
V. Réglementation et perturbateurs endocriniens	39
Chapitre 2. LA ZEARALENONE	40
I. Structure chimique et propriétés physicochimiques	41
I.1. Structure chimique.....	41
I.2. Nomenclature	41
I.3. Propriétés physico-chimiques	42
II. Contamination des aliments destinés aux animaux	43
III. Devenir de la zéaralénone dans l'organisme (données sur animaux)	44
III.1. Absorption	44
III.2. Distribution	45
III.3. Métabolisme	45
III.4. Élimination	48
IV. Exposition humaine	49
V. Réglementation	52
VI. Toxicité de la zéaralénone	53
VI.1. Mécanisme d'action de la zéaralénone et de ses dérivés	53
VI.1.1. Activité oestrogénique	53
VI.1.2. Interaction avec le métabolisme des hormones	55
VI.1.3. Effets sur les facteurs de transcription	55
VI.1.4. Stress oxydant et mort cellulaire	56
VI.2. Les différents niveaux de toxicité de la zéaralénone	57
VI.2.1. Toxicité aiguë	57
VI.2.2. Toxicité subaiguë et subchronique	57
VI.2.3. Toxicité chronique et carcinogénicité	58
VI.2.4. Génotoxicité	58
VI.2.5. Immunotoxicité	59
VI.2.6. Toxicité sur la reproduction	60
Chapitre 3. LES TRANSPORTEURS ABC	63

I. Structure	65
II. Localisation et fonctions	66
II.1. ABCB1/MDR1/P-gp	67
II.2. ABCG2/BCRP	69
II.3. ABCCs/MRPs	70
II.3.1. ABCC1/MRP1	70
II.3.2. ABCC2/MRP2	71
II.3.3. ABCC3/MRP3	71
II.3.4. ABCC4/MRP4	72
II.3.5. ABCC5/MRP5	73
III. Mécanisme d'action	74
III.1. Le modèle «ATP Switch»	74
III.2. Le modèle «Constant Contact»	75
IV. Les substrats des transporteurs ABC	76
V. Régulation de l'expression	79
<i>PARTIE B. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</i>	85
<i>PARTIE C. RESULTATS</i>	90
I. ETUDE DE LA DISTRIBUTION DE LA ZEARALENONE <i>IN VIVO</i> CHEZ LE RAT	91
I.1. CONTEXTE DE L'ETUDE	91
I.2. OBJECTIFS.....	91
I.3. RESULTATS: PUBLICATION 1	92
I.4. RESULTATS-DISCUSSION.....	106
I.5. CONCLUSION	106
II. EVALUATION DE L'EFFET DE LA ZEARALENONE SUR L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC MAJEURS	107
II.1. DANS LE CONTEXTE D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE	107
II.1.1. <i>In Vivo</i>	107
II.1.2. <i>In Vitro</i>	121
II.2. DANS LE CONTEXTE D'UNE EXPOSITION NEONATALE CHEZ LE MALE <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i>	135
II.2.1. CONTEXTE DE L'ETUDE.....	135
II.2.2. OBJECTIFS.....	136
II.2.3. RESULTATS: PUBLICATION 4.....	136
II.2.4. RESULTATS-DISCUSSION	167
II.2.5. CONCLUSION.....	168
<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	169
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	172

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP binding Cassette
ABCC1-5	ATP Binding Cassette subfamily C member 1-5
ADN	Acide déoxyribonucléique
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
AP-1	Activator Protein 1
AR	Androgen Receptors
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
BHE	Barrière hématoencéphalique
CAR	Constitutive Androstane Receptor
cAMP	Adénosine Mono Phosphate cyclique
cGMP	Guanosine Mono Phosphate cyclique
CMR	Cancérogène Mutagène Reprotoxique
COX-1	Cyclo-oxygénase 1
CYP450	Cytochromes P450
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DES	Diéthylstilbestrol
DHT	Dihydrotestostérone
DJA	Dose journalière Admissible
E2	17- β Œstradiol
E3	Estriol
EB	Estradiol Benzoate
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	US Environmental Protection Agency
ERE	Estrogen Response Elements
ESR(s)	Estrogen Receptors
ESR1-2	Estrogen receptor α - β
FAO	United Nations Food and Agriculture Organization
GPR30	G protein-coupled receptor 30
GR	Glucocorticoid Receptors
GSH	Glutathion réduit
HSDs	Hydroxy Stéroïdes Déshydrogénases
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LCR	Liquide Céphalo Rachidien
LXR	Liver X Receptor
MAA	Acide méthoxyacétique
miARN	micro interférence Acide Ribonucléique
MDR1a-b	Multidrug Resistance 1a-b
MRPs	Multidrug Resistance related Proteins
NBD	Nucleotide Binding Domain
NOEL	No Observable Effects Level
NOHEL	No Observable Hormonal Effects Level
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OCDE	Organisation pour la Coopération et le Développement Economique
OH-ZEN	Hydroxy-zéaralénone
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
O, p0DDT	o, p0-dichlorodiphenyl tri-chloroéthane
PCB	PolyChloroBiphényles
pDJMT	Dose Journalière Maximale Tolérée provisoire
PE(s)	Perturbateur(s) Endocrinien(s)
PFC	Polyfluoroalkyle
P-gp	P-glycoprotéine
PGR	Progesterone Receptors
PPAR- α , β , γ	Peroxisome Proliferator Activator Receptor α , β , γ
p,p' DDE	1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)éthylène
PXR	Pregnane X Receptor
REACH substances	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances
RN(s)	Récepteur(s) Nucléaire(s)
RXR	Retinoic 9 cis X Receptor
SCF	Scientific Committee on Food
SCOOP	Scientific Cooperation on Questions relating to Food
siRNA	small interference Ribonucleic Acid
Sp1	Protéine stimulatrice 1
SRC	Steroid Receptor Co-activator
SUG1	Suppressor for Gal 1

SULT	Sulfo-Transférases
SXR	Steroid X Receptor
t-DJA	Dose Journalière Admissible temporaire
TMD	Trans Membrane Domain
TR(s)	Thyroid Hormone(s) Receptor(s)
TR β	Thyroid hormone receptor β
α,β -ZAL	α,β -Zéaralanol
ZAN	Zéaralanone
α,β -ZEL	α,β -Zéaralénol
ZEN	Zéaralénone

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1.** PRINCIPAUX SYSTEMES ENDOCRINIENS CIBLES DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.
- FIGURE 2.** CARACTERISTIQUES ET ACTIVITE DES HORMONES.
- FIGURE 3.** EXEMPLES DE COURBES DOSE-REPONSE CONVENTIONNELLES ET NON CONVENTIONNELLES.
- FIGURE 4.** MODELE D'ALTERATION DU PROFIL DE METHYLATION ET LA PROGRAMMATION EPIGENETIQUE CELLULAIRE.
- FIGURE 5.** EFFET MULTI ET TRANSGENERATIONNEL DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.
- FIGURE 6.** VOIE DE SIGNALISATION DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES.
- FIGURE 7.** RELATION DOSE-REPONSE DE L'ŒSTRADIOL.
- FIGURE 8.** MANIFESTATIONS METABOLIQUES DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.
- FIGURE 9.** MODES D'ACTION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS SUR LA TRANSCRIPTION DE GENES CIBLES ET SA REGULATION.
- FIGURE 10.** STRUCTURE DE LA ZEARALENONE.
- FIGURE 11.** RESULTATS DU PROGRAMME DE CONTROLE NATIONAL SUR LA PRESENCE DE LA ZEARALENONE DANS LES CEREALES ET LES ALIMENTS COMPLETS DE DIFFERENTES CATEGORIES DE PORCS EN 2008
- FIGURE 12.** METABOLISME DE LA ZEARALENONE.
- FIGURE 13.** COMPARAISON DES STRUCTURES DE LA ZEARALENONE ET DE L'ESTRONE.
- FIGURE 14.** MECANISME D'ACTION DE LA ZEARALENONE.
- FIGURE 15.** VOIES BIOCHIMIQUES DE SYNTHESE DES HORMONES STEROÏDIENNES A PARTIR DU CHOLESTEROL.
- FIGURE 16.** STRUCTURE DES TRANSPORTEURS ABC.
- FIGURE 17.** LES TRANSPORTEURS ABC DETERMINENT L'ABSORPTION, LA DISTRIBUTION, L'ACCUMULATION CELLULAIRE, ET L'EXCRETION DE LEURS SUBSTRATS.
- FIGURE 18.** EXPRESSION ET FONCTION D'ABCB1 DANS DIFFERENTS TISSUS.
- FIGURE 19.** LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES TRANSPORTEURS ABC DANS LES CELLULES EPITHELIALES POLARISEES RENALES.
- FIGURE 20.** LOCALISATION DES TRANSPORTEURS ABC DANS LE PLACENTA.
- FIGURE 21.** LOCALISATION D'ABCB1 DANS LE TESTICULE.
- FIGURE 22.** DISTRIBUTION TISSULAIRE D'ABCG2
- FIGURE 23.** MODELE D'INTERRELATION ENTRE LES TRANSPORTEURS ABCCS/MRPS ET LE GLUTATHION REDUIT
- FIGURE 24.** LOCALISATION SCHEMATIQUE D'ABCB1 ET D'ABCC1 DANS LA BARRIERE HEMATO-TESTICULAIRE.
- FIGURE 25.** LOCALISATION DES TRANSPORTEURS ABC.
- FIGURE 26.** LE MODELE «ATP SWITCH».
- FIGURE 27.** LE MODELE «CONSTANT CONTACT».
- FIGURE 28.** STRUCTURE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES.
- FIGURE 29.** MECANISME D'ACTION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES.
- FIGURE 30.** REGULATION D'ABCB1 ET ABCC2 VIA PXR.
- FIGURE 31.** INDUCTION D'ABCG2 VIA AHR.
- FIGURE 32.** INDUCTION OU INHIBITION D'ABCG2 DANS LES CELLULES MCF-7 PAR LE 17 B-ŒSTRADIOL.
- FIGURE 33.** INDUCTION D'ABCG2 VIA PGRB.
- FIGURE 34.** HOMOLOGIE DE STRUCTURES DES SITES DE PLACENTATION HEMOCHORIALE ENTRE L'HOMME ET LE RAT.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. EXEMPLES DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS: ORIGINE ET EFFETS

TABLEAU 2. CONTAMINATION DE CEREALES DESTINEES A L'ALIMENTATION DES ANIMAUX DE RENTE EN EUROPE. D'APRES DÖLL ET DÄNICKE (2011).

TABLEAU 3. CONTAMINATION D'ALIMENTS D'ORIGINE VEGETALE PAR LA ZEARALENONE DANS QUELQUES PAYS EUROPEENS.

TABLEAU 4. ESTIMATION JOURNALIERE DE LA CONSOMMATION DE ZEARALENONE EN FRANCE.

TABLEAU 5. LES TENEURS MAXIMALES FIXEES POUR LA ZEARALENONE

TABLEAU 6. EFFET DE LA ZEARALENONE SUR L'APPAREIL REPRODUCTEUR DES TRUIES.

TABLEAU 7. EXEMPLES DE SUBSTRATS XENOBIOTIQUES ET ENDOGENES DES TRANSPORTEURS ABC.

TABLEAU 8. EXEMPLES DE RECEPTEURS NUCLEAIRES ET LEURS LIGANDS.

TABLEAU 9. LES PRINCIPAUX RNS (HORS ESRS) IMPLIQUES DANS LA REGULATION DES TRANSPORTEURS ABC.

TABLEAU 10. ESTROGENO-MODULATION DES TRANSPORTEURS ABC.

INTRODUCTION GENERALE

La Zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine oestrogénique non stéroïdienne, issue du métabolisme secondaire de nombreuses espèces de champignons filamenteux du genre *Fusarium* qui contaminent couramment les cultures de céréales du monde entier.

Ce contaminant de l'alimentation humaine et animale est un perturbateur endocrinien (PE) dont les effets résultent principalement d'une interaction directe avec les récepteurs cytosoliques aux œstrogènes α - et β (ESR1 et ESR2), et d'une interférence dans l'équilibre des stéroïdes actifs dans les tissus riches en récepteurs aux stéroïdes.

Les principaux effets toxiques de la ZEN résultent de son mécanisme d'action et concernent essentiellement le système reproducteur. En amont de l'évaluation du risque pour la santé humaine que représente une exposition à de faibles doses de ZEN via l'alimentation, et en particulier ses effets sur le jeune exposé via sa mère pendant la gestation puis sur le jeune adulte exposé en période néonatale, le travail qui est présenté ici s'intègre dans un projet qui vise à déterminer l'implication à long terme d'une exposition à la ZEN dans les pathologies de l'appareil reproducteur de l'homme et de l'animal, ainsi que ses potentiels effets transgénérationnels. Nous nous sommes intéressés aux effets d'une exposition à la ZEN sur le niveau d'expression de transporteurs membranaires ATP Binding Cassette (ABC) majoritairement impliqués dans l'efflux de molécules endogènes et de xénobiotiques: ABCB1 [ATP Binding Cassette subfamily B member 1, multi drug resistance 1a-b (mdr1-b), P-glycoprotéine (P-gp)], ABCG2 [ATP Binding Cassette subfamily G member 2, Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)], ABCC1 [ATP Binding Cassette subfamily C member 1, Multidrug Resistance related Protein 1(MRP1)], ABCC2 [ATP Binding Cassette subfamily C member 2, Multidrug Resistance related Protein 2 (MRP2)], ABCC3 [ATP Binding Cassette subfamily C member 3, Multidrug Resistance related Protein 3 (MRP3)], ABCC4 [ATP Binding Cassette subfamily C member 4, Multidrug Resistance related Protein 4 (MRP4)], ABCC5 [ATP Binding Cassette subfamily C member 5, Multidrug Resistance related Protein 5 (MRP5)]. Ces transporteurs, présents au niveau des barrières de l'organisme (barrières hémato-encéphalique, intestinale, hépatique, testiculaire, placentaire, mammaire...), auraient un rôle dans la protection de l'adulte et surtout du fœtus, du nouveau né et du jeune avant le sevrage. Une modulation de l'expression de ces transporteurs de xénobiotiques pourrait ainsi influencer l'exposition de l'adulte, du fœtus, et du nouveau né aux divers médicaments et polluants environnementaux.

Les gènes qui codent pour les transporteurs ABC sont hautement régulés. Des études sur la régulation de leur expression montrent l'implication de récepteurs nucléaires (RN).

Parmi ces récepteurs, les récepteurs ESR1 et ESR2 semblent jouer un rôle important dans cette régulation. En effet, la plupart des gènes codant pour les transporteurs ABC de cette étude possèdent des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) au niveau de leurs promoteurs. De plus, un certain nombre d'études montrent que des œstrogènes sont capables de réguler leurs expressions *in vivo* et *in vitro*. La ZEN pourrait donc intervenir dans la régulation des gènes codants pour ces transporteurs et pourrait moduler leur expression.

Ce travail de thèse est organisé en 3 grandes parties. Dans la première partie seront abordées les données bibliographiques sur les perturbateurs endocriniens, la ZEN ainsi que les transporteurs ABC. Ensuite, la deuxième partie sera consacrée aux arguments bibliographiques en faveur de l'hypothèse d'une modulation de l'expression des transporteurs ABC par la ZEN et les objectifs de la thèse. Enfin, nos résultats seront traités dans la dernière partie, elle-même divisée en deux sous parties: la première traitera de la caractérisation de la cinétique et de la distribution de la ZEN *in vivo* en fonction du sexe, de la voie d'administration et de différents stades physiologiques. La deuxième partie des résultats concernera la mise en évidence de la modulation de l'expression des transporteurs ABC par la ZEN *in vitro* et *in vivo* dans deux contextes particuliers d'exposition: la gestation et la période néonatale.

PARTIE A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

**Chapitre 1. LES PERTURBATEURS
ENDOCRINIENS**

Le système endocrinien est un ensemble de glandes et de groupes de cellules spécialisées largement distribuées dans l'organisme. Ces glandes et cellules synthétisent, stockent et libèrent des hormones dans la circulation sanguine. Les hormones (stéroïdes, peptides et amines) ont un impact sur les activités et les fonctions de cellules cibles par le biais de récepteurs spécifiques (Capen and Martin, 1989). La rétroaction négative régule la sécrétion de la plupart des hormones. De plus, les cycles de sécrétion assurent et contrôlent le maintien de l'équilibre physiologique et homéostatique (Haus, 2007).

L'hypothèse selon laquelle un xénobiotique modulerait de façon inappropriée le système endocrinien est émise pour la première fois il y a 20 ans au cours de la conférence de Wingspread (Wisconsin, États unis) (Colborn et al., 1993, Colborn and Clement, 1992, Colborn et al., 1996). À l'issue de cette conférence, les participants publient une déclaration qui est à l'origine des nombreux développements actuels sur les perturbateurs endocriniens (PEs). En 2009, la société américaine d'endocrinologie publie un rapport scientifique (le premier de son histoire) dans lequel elle met en évidence les preuves scientifiques des effets délétères des PEs, et dans lequel le problème de santé publique est évoqué pour la première fois (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

I. Définition

Si le concept de perturbation endocrinienne fait aujourd'hui consensus, il ne fait cependant pas l'objet d'une définition consensuelle.

La première définition est celle de Weybridge, au Royaume-Uni, en 1996. Elle est le résultat d'un colloque organisé par la Commission européenne, l'Organisation pour la Coopération et le Développement Économique (OCDE), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'industrie chimique européenne. Un PE y est défini comme « *une substance étrangère à l'organisme qui produit des effets délétères sur l'organisme ou sa descendance, à la suite d'une modification de la fonction hormonale* ». La définition de l'Agence américaine de protection de l'environnement (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) est sensiblement différente : « *un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme* » (Kavlock et al., 1996).

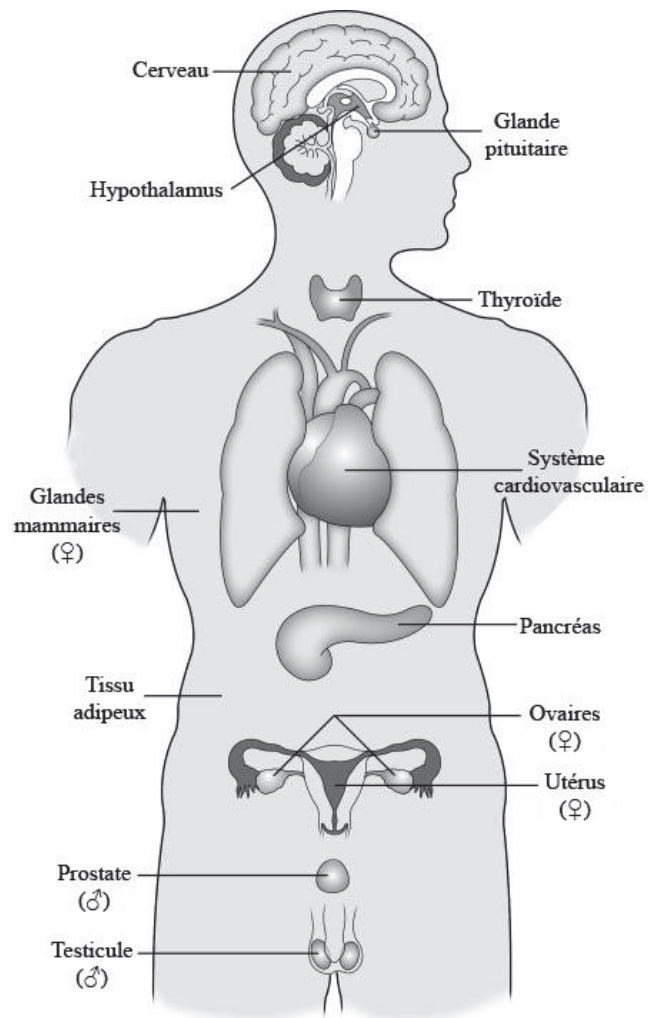


Figure 1. Principaux systèmes endocriniens cibles des perturbateurs endocriniens.
D'après Diamanti-Kandarakis et al. (2009).

En 2002, l'OMS présente une définition encore différente : «*Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants*». Toutefois, les données actuelles montrent que les mécanismes d'action des PEs sont beaucoup plus larges. De ce fait, un perturbateur endocrinien est, d'un point de vue physiologique, «*un composé naturel ou synthétique qui à travers une exposition environnementale altère les systèmes hormonal et homéostatique qui permettent à l'organisme de communiquer et de répondre à son environnement*» (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Le point consensus qui ressort de ces différentes définitions, est celui de la dimension mécanistique de la perturbation endocrinienne. En effet, à la différence d'une substance toxique qui agit directement, un PE va, lui, agir par le jeu complexe du système hormonal (Barbier, 2011). Au vu de toutes ces données nous proposons la définition suivante: «une substance chimique étrangère à l'organisme, d'origine naturelle ou artificielle, qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles; ces substances sont susceptibles de modifier le fonctionnement d'une partie du système endocrinien et d'avoir des conséquences sur le comportement et les fonctions de l'organisme exposé et/ou de sa descendance».

II. Les cibles des perturbateurs endocriniens

Les grandes similarités des récepteurs aux hormones ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse, la libération et la dégradation des hormones endogènes, font qu'il n'existe virtuellement aucun système endocrinien qui soit « immunisé » contre l'action des PEs (Diamanti-Kandarakis et al., 2009, Schug et al., 2011). Ainsi, tous les systèmes physiologiques hormono-sensibles sont des cibles potentielles des PEs: systèmes nerveux, hypothalamo-hypophysaire, thyroïdien, cardio-vasculaire, les glandes mammaires, le tissu adipeux, le pancréas et les organes reproducteurs (Figure 1).

III. Propriétés d'un perturbateur endocrinien

Un certain nombre de notions sont cruciales pour une bonne compréhension des mécanismes d'action et des conséquences d'une exposition à un PE. Dans cette partie seront abordées les principales propriétés d'un PE.

III.1. Action aux faibles doses et relation Dose-Réponse non conventionnelle

Certaines caractéristiques des PEs sont soumises à controverse. En effet, des doses infinitésimales peuvent provoquer des anomalies endocriniennes et en particulier celles de l'appareil reproducteur, surtout si l'exposition a lieu pendant une phase critique du développement (gestation, néonatalité, et adolescence par exemple) (Sheehan et al., 1999). De plus, les faibles doses semblent avoir des effets plus intenses que les fortes doses. Les PEs peuvent également avoir des courbes dose-réponse non conventionnelles, en U ou en U inversé (vom Saal et al., 2007, Welshons et al., 2003, Andrade et al., 2006, Wetherill et al., 2002, Ralph et al., 2003). Ces caractéristiques sont bien connues pour les hormones endogènes et les neurotransmetteurs, mais n'ont commencé à être envisagées pour les PEs que depuis cette dernière décennie. Ces deux caractéristiques (effets aux faibles doses et courbes non monotones) représentent des concepts majeurs dans la perturbation endocrinienne. Elles sont en opposition avec le dogme traditionnel et fondamental en Toxicologie qui stipule que «c'est la dose qui fait le poison». En effet, les effets à faible dose d'un PE ne sont pas prédictibles par les effets à forte dose (Vandenberg et al., 2012).

Les hormones endogènes sont un très bon exemple de molécules répondant à ses deux caractéristiques. En effet, le système endocrinien est particulièrement bien adapté pour répondre aux très faibles concentrations des hormones, ce qui permet à un grand nombre de molécules à activité hormonale de coexister en circulation (Welshons et al., 2003).

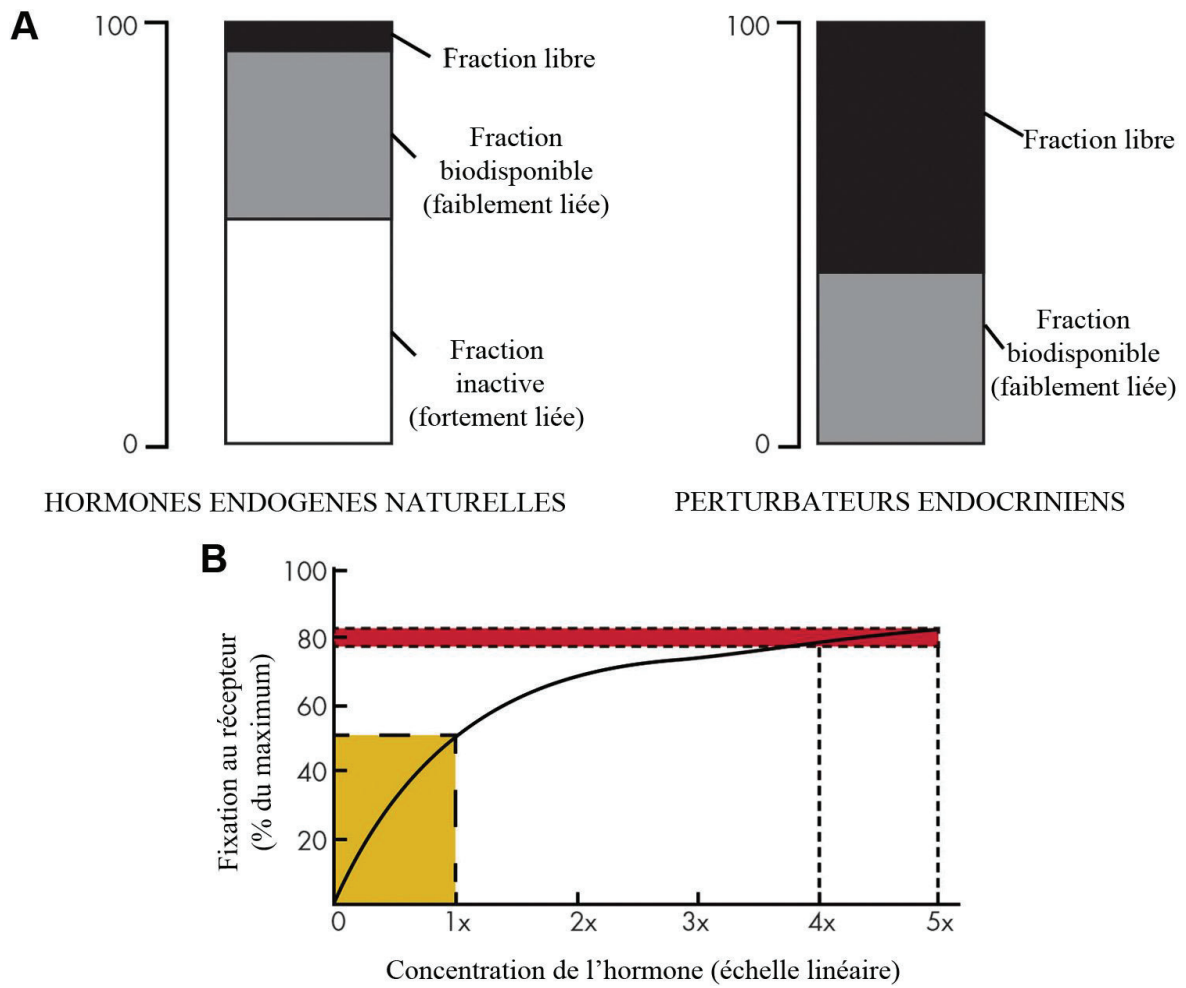


Figure 2. Caractéristiques et activité des hormones. D'après Vandenberg et al. (2012).

La spécificité d'action des hormones physiologiques est liée à plusieurs éléments : la répartition des récepteurs dans l'organisme, l'existence pour un récepteur donné de co-régulateurs différents ou de plusieurs isoformes, la localisation des récepteurs peut être spécifiquement restreinte à un ou quelques types cellulaires ou bien être plus ubiquitaire dans l'organisme (Vandenberg et al., 2012). Dans le cas des récepteurs présents dans différents types cellulaires, la présence de différents co-régulateurs modifie le comportement des gènes cibles (Vandenberg et al., 2012, Kress et al., 2009, Fu et al., 2004, Katzenellenbogen and Katzenellenbogen, 2000, Katzenellenbogen et al., 2000). Enfin, certaines hormones ont plusieurs récepteurs. Les œstrogènes, par exemple, peuvent agir sur deux types de récepteurs (ESR1 et ESR2) dont l'expression relative diffère selon le tissu et entraîne des effets variables sur l'expression des gènes régulés par ces récepteurs (Cheng et al., 2010, Zhao et al., 2008).

Les concentrations physiologiques des hormones endogènes sont extrêmement faibles (10-900 pg/ml pour l'œstradiol et 300–10000 pg/ml pour la testostérone par exemple). Dans le sang, les hormones stéroïdiennes existent sous trois formes: libre, représentant la forme non liée; biodisponible, représentant la fraction liée à des protéines plasmatiques de faible affinité comme l'albumine, et inactive, représentant la forme liée à des protéines de haute affinité (Sex hormone-binding globulin et α -foetoprotéine par exemple) (Figure 2A). Lorsque les taux circulants dans le sang sont corrigés par rapport à la faible fraction des hormones non liée aux protéines plasmatiques, les concentrations libres réellement à l'origine des effets dans les cellules sont encore plus faibles (0.1 à 9 pg / ml pour l'œstradiol par exemple).

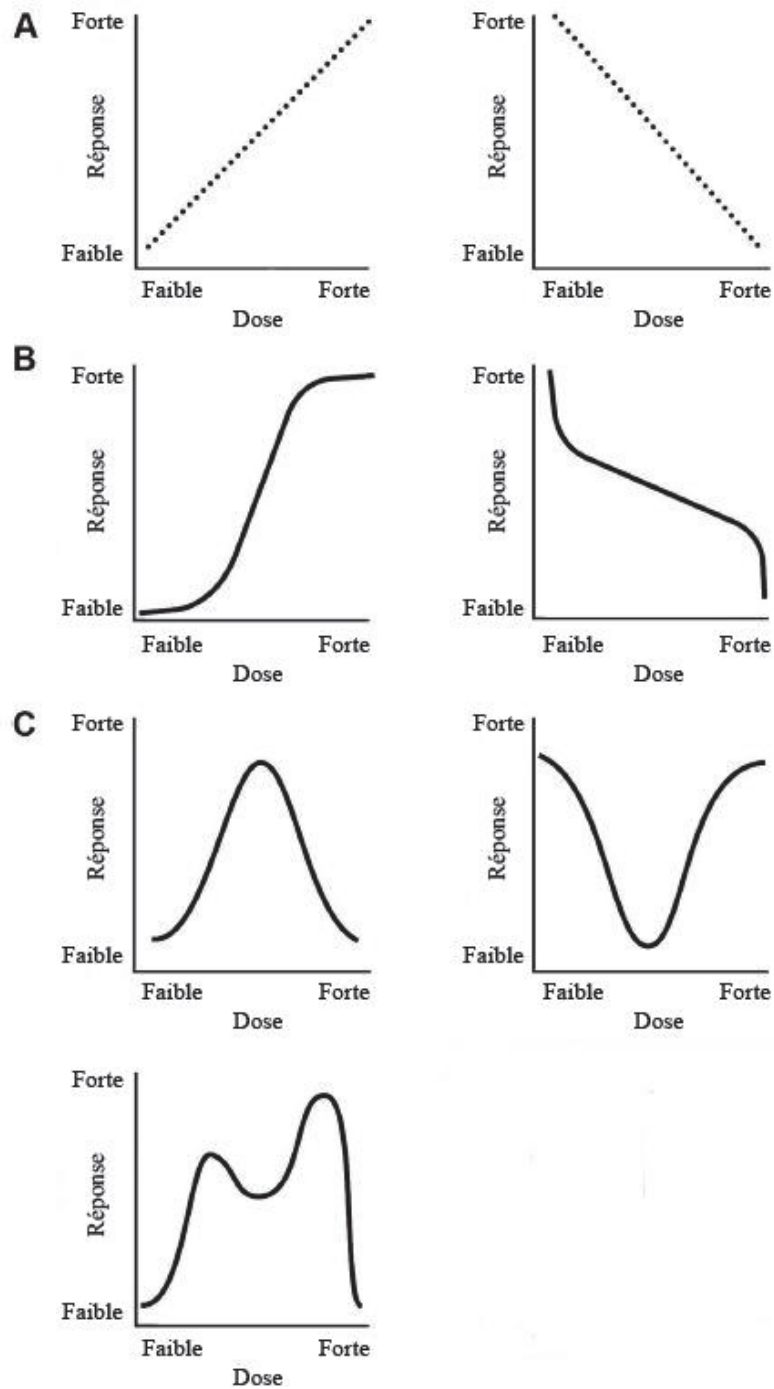


Figure 3. Exemples de courbes dose-réponse conventionnelles et non conventionnelles. A et B: courbes conventionnelles. C: courbes non conventionnelles. D'après Vandenberg et al. (2012)

Il ya plusieurs raisons pour lesquelles les hormones endogènes sont capables d'agir à des concentrations circulantes aussi faibles: 1) les récepteurs spécifiques des hormones ont une affinité suffisamment élevée pour que la liaison d'un nombre réduit de molécules puisse déclencher une réponse, 2) il existe une relation non linéaire entre la concentration de l'hormone et le nombre de récepteurs liés, et 3) il existe une relation non linéaire entre le nombre de récepteurs occupés et l'effet biologique observable. Concernant les points 2) et 3), Welshons et al. (2003) montrent qu'il n'existe pas de relation de linéarité entre l'occupation des récepteurs et la concentration des hormones. En effet, la saturation de la réponse survient en premier et à des concentrations à peine supérieures à la valeur de la constante de dissociation de la cinétique récepteur-ligand (K_d). Ce n'est qu'à des concentrations plus élevées que la saturation des récepteurs est observée. Autrement dit, à faible dose, une multiplication par 10 de la concentration de l'hormone peut aboutir à une multiplication de l'occupation des récepteurs par 9, alors qu'à forte dose, une même augmentation de 10 fois la concentration n'augmente l'occupation des récepteurs que de moins de 1,1 fois (Welshons et al., 2003) (Figure 2B). Ainsi, même des changements très modérés de la concentration hormonale dans la gamme des faibles doses, peuvent produire des changements substantiels dans l'occupation des récepteurs et donc générer des changements importants dans la réponse biologique.

La réponse hormonale physiologique est également caractérisée par des courbes dites non monotones. Dans une réponse monotone, les effets observés peuvent être linéaires (Figure 3A) ou non linéaires (Figure 3B), mais avec une pente de courbe dont le signe ne change pas. Par opposition, une courbe dose-réponse est dite non monotone lorsque la pente de la courbe change de signe dans la gamme des doses évaluées. Classiquement, les courbes dose-réponse non monotones ont une forme en U (avec des maxima de réponse aux doses extrêmes) ou en U inversé (avec des maxima de réponse aux doses intermédiaires) (Figure 3C panel du haut). Certains cas sont plus complexes avec plusieurs points de changement du signe de la pente de la courbe (Figure 3C panel de bas). Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer ce type de réponses (pour revue Vandenberg et al. (2012)). Ils comprennent la cytotoxicité, l'expression spécifique de tissus des récepteurs et des cofacteurs, la sélectivité, la régulation négative, la désensibilisation des récepteurs, la compétition pour les récepteurs et la boucle de rétroaction endocrine négative. Il apparaît clair concernant ces courbes que le fait de connaître l'effet d'une ou de plusieurs doses ne permet pas de prédire les effets susceptibles d'être produits par d'autres doses.

En conclusion, les PE exploitent l'extrême sensibilité du système endocrinien pour produire leurs effets à des doses couramment retrouvées dans l'environnement.

III.2. Fenêtre d'exposition

L'exemple historique de l'importance de la fenêtre d'exposition aux PE est celui du diéthylstilbestrol (DES). Cette molécule œstrogénique non stéroïdienne de synthèse, fut prescrite dans les années 40 pour maintenir la synthèse placentaire des stéroïdes et prévenir les fausses couches et les naissances prématurées (Henley and Korach, 2006). Les malformations et les conséquences délétères sur l'appareil génital apparaissaient chez les enfants des femmes traitées entre la 6^e et la 17^e semaine de grossesse, fenêtre où les organes reproducteurs se forment (Barbier, 2011, Miyagawa et al., 2011).

Les conséquences d'une exposition à un PE à l'âge adulte diffèrent complètement de celles faisant suite à des expositions en période fœtale, néonatale, durant l'enfance, ou la puberté (Gore and Crews, 2009, Barker, 2003, Gore et al., 2011). En effet, l'environnement (maternel et extérieur) d'un organisme en cours de développement interagit avec les gènes de l'individu pour déterminer sa propension à développer une maladie ou un dysfonctionnement apparaissant tardivement à l'âge adulte.

Les organismes en développement comme le fœtus et le nouveau né sont particulièrement sensibles aux PE. De plus les effets de telles expositions se manifestent à des concentrations bien plus faibles que celles provoquant des effets chez l'adulte. Une des raisons de cette plus grande sensibilité, est l'immaturité chez le fœtus et le nouveau né des mécanismes de protection disponibles chez l'adulte (système de réparation de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN), système immunocompétent, enzymes de détoxification, métabolisme hépatique, barrière hémato-encéphalique) (Skinner et al., 2011). L'enfance et l'adolescence sont également considérées comme des périodes critiques du développement puisqu'elles sont caractérisées par une maturation des systèmes endocriniens clés, et sont de ce fait également des périodes de forte susceptibilité aux effets des PE (Silveira et al., 2007, Prins, 2008). C'est pourquoi les scientifiques parlent aujourd'hui de l'origine fœtale (ou, plus largement, développementale) de la maladie adulte (pour revue Schug et al. (2011)).

III.3. Période de latence

L'hypothèse de l'origine fœto-développementale de la maladie chez l'adulte suggère qu'une exposition précoce à des doses faibles d'un PE n'aurait pas d'effet apparent immédiat, mais prédispose plutôt l'organisme au développement latent d'un trouble ou d'une maladie à l'âge adulte (Barker, 2003, Gore et al., 2006). Il existerait donc un décalage entre le moment de l'exposition et le moment d'apparition des effets. En d'autres termes, les conséquences d'une exposition précoce aux PEs peuvent ne pas survenir immédiatement après, mais se manifester à l'âge adulte ou durant la sénescence.

Cette hypothèse est supportée par des études réalisées sur des modèles animaux montrant que les expositions du fœtus à de faibles doses de PEs n'entraînent souvent pas d'effets perceptibles à la naissance, mais sont à l'origine d'infertilité, d'anomalies et de cancers beaucoup plus tard dans la vie. (Welshons et al., 2006). Chez l'homme, le cas du DES illustre bien cette caractéristique. En effet, les filles des femmes ayant pris ce médicament, n'ont pas d'anomalie apparente à la naissance. Ce n'est que plus tard qu'elles développent des anomalies de l'appareil reproducteur et des cancers vaginocervicaux (Newbold, 2004). Les nombreuses études réalisées sur des modèles rongeurs reproduisent et confirment ce type d'effet observé chez l'homme (Newbold et al., 2006, Gore, 2008, Gore et al., 2006, Steinberg et al., 2007, Steinberg et al., 2008).

III.4. Effets transgénérationnels et épigénétiques

Les PEs sont non seulement susceptibles d'affecter la génération exposée, mais également sa descendance directe et les générations suivantes. Des études récentes suggèrent que le mécanisme de transmission peut dans certains cas impliquer la lignée germinale (Anway and Skinner, 2006) et peut être non génomique. Autrement dit, les effets peuvent être transmis non pas suite à une mutation de l'ADN, mais à cause de modifications des facteurs qui régulent l'expression des gènes comme la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones. En effet, un mécanisme général par lequel les expositions prénatale et postnatale pourraient être liées à des changements phénotypiques tard dans la vie est celui de l'altération de marqueurs épigénétiques, qui ont un rôle central dans la détermination de l'expression fonctionnelle de l'information stockée dans le génome (Jirtle and Skinner, 2007).

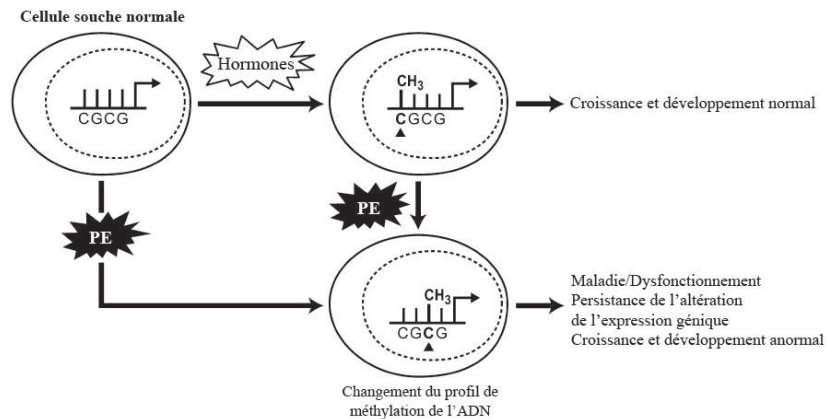


Figure 4. Modèle d'altération du profil de méthylation et la programmation épigénétique cellulaire. Des altérations du statut épigénétique des cellules somatiques peuvent induire des perturbations dans les tissus en développement, alors que des changements dans la programmation épigénétique des cellules souches peuvent induire des effets multi ou transgénérationnels chez la descendance. D'après Schug et al. (2011).

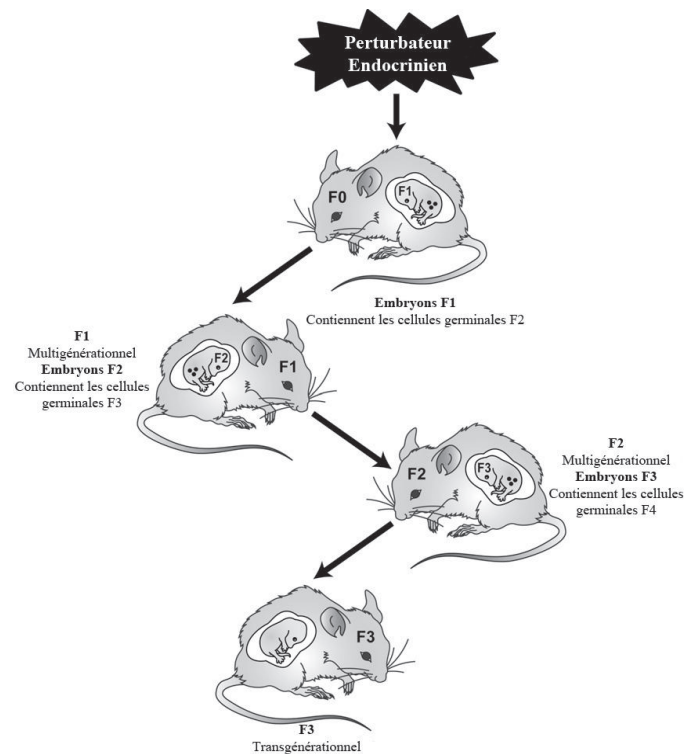


Figure 5. Effet multi et transgénérationnel des perturbateurs endocriniens. Beaucoup de perturbateurs endocriniens provoquent des modifications épigénétiques qui altèrent les cellules somatiques et donc l'état de santé de l'individu exposé (génération F₀). L'exposition d'une femelle gestante à un perturbateur endocrinien peut également provoquer des modifications épigénétiques dans les deux prochaines générations (F₁ et F₂) à travers le fœtus et sa lignée germinale. L'effet d'une telle exposition sur les générations ultérieures (F₃ et au-delà) serait considéré comme un phénotype transgénérationnel. D'après Schug et al. (2011).

Le terme épigénétique désigne des éléments autour de l'ADN qui régulent son activité tout en étant indépendants de la séquence d'ADN. Il existe plusieurs facteurs qui peuvent perturber l'expression des gènes en modifiant l'ADN, tels que le remodelage des histones et la régulation par les petits ARN non-codants [small interfering et micro interfering ARN (siARN et miARN)]. Parmi ces facteurs, la reprogrammation de l'ADN par des changements dans les profils de méthylation est l'un des mécanismes les plus étudiés concernant la perturbation endocrinienne. La méthylation de l'ADN se fait sur le carbone-5 de la cytosine dans des îlots dinucléotides de Cytosine et guanine (CpG) par des ADN méthyltransférases. Les gènes hyperméthylés sont inactivés alors que ceux qui sont hypométhylés ont tendance à être plus accessibles à la machinerie transcriptionnelle (Schug et al., 2011) (Figure 4).

Alors que la plupart des gènes subissent une vague de déméthylation complète durant le développement embryonnaire précoce, un sous-ensemble de gènes dits gènes soumis à empreinte gardent leurs schémas de méthylation d'ADN qui semblent être programmés de manière permanente. Contrairement aux cellules somatiques, les cellules germinales primordiales subissent une déméthylation lors de la migration et de la colonisation précoce des gonades embryonnaires, suivie d'une reméthylation qui a lieu lors de la détermination du sexe d'une façon sexe-dépendante. L'exposition d'une femelle gestante au moment de la détermination du sexe semble modifier la reméthylation de la lignée germinale et reprogrammer de façon permanente le motif de méthylation de l'ADN (Skinner et al., 2011).

Un des exemples d'une transmission d'une modification épigénétique par la lignée germinale est celui du fongicide anti-androgénique, la vinclozoline. Chez le rat, une exposition *in utero* à la vinclozoline conduit à une forte probabilité de développer des troubles métaboliques, des tumeurs et des dysfonctionnements de la reproduction chez les individus des quatre générations suivantes (Anway and Skinner, 2008b, Shono et al., 2004, Anway et al., 2005, Crews and McLachlan, 2006). Dans le cas du DES, des observations chez l'homme et l'animal montrent clairement l'héritabilité des dysfonctionnements sur deux générations (Li et al., 2003, Newbold et al., 1998, Diamanti-Kandarakis et al., 2009, Newbold et al., 2006). Beaucoup d'autres PE sont impliqués dans la transmission de dysfonctionnement sur plusieurs générations, comme le Bisphénol A (BPA), les hydrocarbures polycycliques, certains pesticides et phytoestrogènes. Il faut toutefois distinguer les transmissions multigénérationnelles de celles dites transgénérationnelles qui sont transmises exclusivement par l'intermédiaire de la lignée germinale. Seuls les effets apparaissant à la 3^{ème} génération (F3) sont considérés comme étant réellement transgénérationnels (cas de la vinclozoline) (Schug et al., 2011) (Figure 5).

III.5. Effets spécifiques d'espèce et différences de sensibilité liées au sexe

Il est actuellement connu que les effets des PE sont sexe et espèce-dépendants (Burger et al., 2007, Cummings et al., 2007, Orlando and Guillette, 2007, Dickerson and Gore, 2007, Gochfeld, 2007, Walker and Gore, 2007). De nombreuses études montrent que les différentes espèces et mêmes les souches d'une même espèce diffèrent dans leur sensibilité aux PE (Crews et al., 2000, Thigpen et al., 2007). En effet, il existe d'importantes différences entre les espèces concernant la nature et les concentrations circulantes des hormones stéroïdiennes, avec des différences au sein même des différentes souches consanguines (Shire, 1976). Par exemple, la testostérone peut être le stéroïde prédominant chez les mâles de certaines espèces, alors que chez d'autres c'est la dihydrotestostérone (DHT) ou le 11-kétotestostérone. Chez les femelles, l'Estrone, le 17 β -Œstradiol (E2), et l'Estriol (E3) sont les hormones les plus communément retrouvées, et les résultats d'études réalisées chez les mammifères montrent que l'E2 est le plus puissant des trois. Pourtant, chez les tortues à oreilles rouges, l'E3 est beaucoup plus performant qu'E2 pour contrecarrer les effets d'une température d'incubation produisant des mâles dans l'étude de détermination du sexe (Bergeron et al., 1999).

De nombreuses études sur les PE illustrent ce type d'effets spécifiques d'espèce. Ainsi, chez le rat, le méthoxychlore est responsable du syndrome de retard anovulatoire (Gray et al., 1988), alors qu'il est sans effet apparent sur le cycle œstral du hamster (Gray et al., 1985). La chlordécone (pesticide) masculinise le comportement des femelles hamsters (Gray, 1982) alors que chez le rat, elle semble plutôt inhiber le comportement sexuel des femelles lorsqu'elle est administrée durant le pro-œstrus (Brown et al., 1991), et accélère la puberté (Gellert, 1978). Plus récemment, Johnson et al. (2012) rapportent qu'une exposition *in utero* aux phtalates chez le rat, provoque des malformations du tractus génital mâle en inhibant la production de testostérone par les cellules de Leydig fœtales. En dépit du fait que la toxicocinétique des phtalates chez la souris est similaire à celle du rat, aucune inhibition de la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig fœtales n'est observée chez la souris.

Les études de sélection montrent que la génétique joue également un rôle important dans les différences de sensibilité aux PE. Ozburn and Morrison (1962) ont montré une tolérance de la souris aux effets du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) après huit générations de sélection. Poonacha et al. (1973) ont donné à des cailles une alimentation contenant 200 ppm de DDT durant les 30 premiers jours de leur vie et constaté le développement d'une résistance après la troisième génération. Dans cette même étude, la sensibilité liée au sexe est également mise en évidence. En effet, les auteurs montrent que les femelles développent une moindre résistance au DDT que les mâles. D'autres études et revues plus récentes viennent également renforcer ce constat (Cummings et al., 2007, Burger et al., 2007, Orlando and Guillette, 2007, Johnson et al., 2012, Gore and Crews, 2009).

III.6. Effets des multi-contaminations

Les êtres vivants ne sont pas exposés à une substance environnementale isolée mais à un mélange de substances. De plus, les effets des différents PE peuvent être additifs voire synergiques (Willingham and Crews, 2000, Crews et al., 2003). En effet, chez la tortue à oreilles rouges, l'administration d'un mélange de polychlorobiphényles (PCB) (Aroclor 1242, trans-Nonachlor, cis-Nonachlor, dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)-éthylène (p,p9-DDE) et chlordane) aux œufs en cours de développement, modifie le sexe-ratio au profit des femelles, alors que l'administration de chaque composé seul et à la même concentration que dans le mélange, produit un effet différent (Willingham and Crews, 2000).

Il est également possible que les effets ne soient pas additifs et que l'association de faibles doses de composés individuellement inactifs résulte en une perturbation biologique (Kortenkamp, 2008). En effet, Tinwell et Ashby (2004) ont testé chez le rat huit produits oestrogéniques séparément et en association. Les auteurs ont montré qu'administrés séparément, ces PE ne donnent aucune réponse utéro-trophique statistiquement significative, alors que lorsqu'ils sont administrés sous forme d'un mélange (avec les mêmes doses qu'en administration isolée), ils produisent un effet utéro-trophique puissant. De même, Brian et al. (2005) ont examiné l'effet d'un mélange de cinq PE oestrogéniques chez les poissons (*Pimephales promelas*) avec l'induction de la vitellogénine comme biomarqueur. Les effets observés montrent encore une fois que ces molécules combinées induisent la synthèse de la vitellogénine à des concentrations qui, individuellement, ne produisent aucun effet sur ce marqueur d'oestrogénicité.

Cette liste de propriétés des PEs, bien que non exhaustive, illustre l'énorme complexité du champ de la perturbation endocrinienne. Elle met en évidence la nécessité de considérer l'implication de tous ces facteurs dans l'évaluation des effets des PEs.

IV. Mécanismes d'action

Initialement, il était admis que les PEs exerçaient leur action exclusivement via les récepteurs aux hormones. Les données actuelles montrent que leurs mécanismes d'action sont beaucoup plus larges et plus complexes (Henley and Korach, 2006). En effet, outre leur action sur la signalisation des récepteurs hormonaux, les PEs sont capables d'agir sur des récepteurs non conventionnels, des coactivateurs de transcription, des voies enzymatiques impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes et/ou de leur métabolisme, ainsi qu'un grand nombre d'autres mécanismes qui convergent tous vers les systèmes endocriniens (Schug et al., 2011). Il est donc possible de dire de façon très schématique, qu'une substance peut perturber le fonctionnement endocrinien de deux façons: en interagissant directement avec les récepteurs aux hormones (action agoniste ou antagoniste), ou en perturbant ou bloquant les mécanismes de production et de régulation des hormones endogènes et/ou de leurs récepteurs. Toutefois, il existe d'autres mécanismes d'action des PEs qui comprennent, entre autres, des effets directs sur les gènes (Moral et al., 2008) et leur impact épigénétique (Anway and Skinner, 2008a). Cette partie illustre la multitude (mécanismes non exhaustifs) et la complexité du mode d'action des PEs.

IV.1. Mécanisme par action directe sur les récepteurs aux hormones

Beaucoup de PEs sont structurellement similaires aux hormones endogènes. Ces PEs sont ainsi capables de mimer l'action des hormones endogènes, leur transport et leur stockage tissulaire. Les propriétés de ces substances les rendent particulièrement aptes à activer ou à antagoniser les récepteurs hormonaux (Schug et al., 2011). Il existe plusieurs types de récepteurs aux hormones: les récepteurs membranaires lorsque les molécules passent difficilement la membrane plasmique (hormones et para-hormones peptidiques, cytokines, prostanoïdes), et les récepteurs intracellulaires, comme les récepteurs nucléaires, pour les molécules plus lipophiles et dont la perméabilité membranaire est plus élevée (hormones stéroïdes) ou pour les molécules endocytées (hormones thyroïdiennes iodées).

Il existe également des récepteurs cytoplasmiques pour différentes hormones dont les effets majeurs font intervenir des récepteurs membranaires. De même, différentes hormones stéroïdiennes ont, en plus de récepteurs intracellulaires, des récepteurs membranaires.

Une grande partie des PEs sont de petites molécules lipophiles qui vont interagir avec des récepteurs aux hormones de la famille des récepteurs nucléaires (RNs) tels que les récepteurs aux œstrogènes (ESRs), le récepteur aux androgènes (AR), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et aux minéralocorticoïdes et les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs) (Swedenborg et al., 2009). L'essentiel des récepteurs inactifs se trouve au niveau du noyau, associé à des protéines non-histoniennes de la chromatine. L'association avec l'hormone libère le récepteur et le complexe Hormone-Récepteur actif peut se fixer à un élément de la région régulatrice (5'-flanking) d'une unité de transcription, conduisant avec d'autres éléments modulateurs, à son activation (agonisme), son inactivation (antagonisme) ou au contrôle de sa vitesse de transcription (Gronemeyer et al., 2004). Ces récepteurs fonctionnent sous forme de mono (exemple : facteur stéroïdogénique-1), d'homo (exemple : récepteurs aux stéroïdes) ou d'hétérodimères, dont le partenaire constant est le récepteur de l'acide rétinoïque 9-Cis (RXR) (exemple: récepteurs aux hormones thyroïdiennes) (Gronemeyer et al., 2004). ESR1, ESR2 et AR sont très tôt identifiés comme étant les cibles de beaucoup de PEs. Le méthoxychlore, un analogue de structure et un substitut du pesticide DDT, et ses métabolites sont responsables d'anomalies sexuelles et de reproduction par antagonisme de AR et d'ESR2 et par action agoniste sur ESR1 (Gaido et al., 2000).

Il est à noter que certains PEs produisent leurs effets par une action sur des récepteurs autres que les récepteurs aux hormones. En effet, un certain nombre d'études montrent des effets via les canaux ioniques. Le BPA, le DDT, le DES, le nonylphénol (détergent) et l'octylphénol (intermédiaire de synthèse des caoutchouc, pesticide et peinture) perturbent l'activité des canaux calciques et/ ou la signalisation cellulaire calcium-dépendante (Nadal et al., 2000, Tanabe et al., 2006, Vandenberg et al., 2012, Ruehlmann et al., 1998, Walsh et al., 2005).

IV.1.1. Cas des perturbateurs endocriniens agissant sur les récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes (ESRs) restent au centre des études sur la perturbation endocrinienne. Les œstrogènes exercent leurs actions dans les tissus cibles par fixation sur l'un des deux ESRs: ESR1 ou ESR2. Comme d'autres récepteurs aux hormones stéroïdiennes, les ESRs fonctionnent sous la forme d'un dimère. Il existe différentes voies par lesquelles les œstrogènes peuvent réguler les processus biologiques via les ESRs (Hall et al., 2001). Dans le modèle d'action classique, les ESRs activés par la fixation de leur ligand se fixent au niveau de l'ADN sur des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) grâce à leur domaine de fixation à l'ADN et recrute des co-régulateurs sur le site d'initiation de la transcription.

Les œstrogènes modulent également l'expression des gènes par un autre mécanisme dans lequel les ESRs interagissent avec d'autres facteurs de transcription comme la protéine activatrice 1 (AP-1) et la protéine stimulatrice (Sp1) (Bjornstrom and Sjoberg, 2005, Kushner et al., 2000, Saville et al., 2000).

Il existe un grand nombre de molécules naturelles ou synthétiques qui peuvent activer les ESRs. Parmi les œstrogènes naturels, il y a ceux produits par les plantes (phytoestrogènes: coumestrol, génistéine, ...) et ceux produits par les champignons (mycoestrogènes: zéaralénone, ...). Les substances oestrogéniques synthétiques comprennent celles produites pour être utilisées à visée thérapeutique chez l'homme comme le DES, et celles destinées à d'autres utilisations type biocide (DDT, méthoxychlore). Ces composés produisent leurs effets en interagissant avec les ESRs. Il existe 3 types de ces récepteurs: les RNs (ESR1 et ESR2), les récepteurs aux œstrogènes associés à la membrane (variants des récepteurs nucléaires) et le récepteur aux œstrogènes couplé à la protéine G (GPR30) qui est une protéine associé à la membrane avec une forte affinité pour les œstrogènes. Les PE à caractère oestrogénique vont, comme les œstrogènes endogènes, se fixer sur le récepteur membranaire ou cytosolique, ce qui va entraîner sa translocation dans le noyau. Le complexe se fixe ensuite sur des éléments de réponse (ERs) présents au niveau de l'ADN et régule la transcription génique et la synthèse protéique. Certains récepteurs résident exclusivement dans le compartiment nucléaire et se situent à proximité des ESRs sous forme inactive.

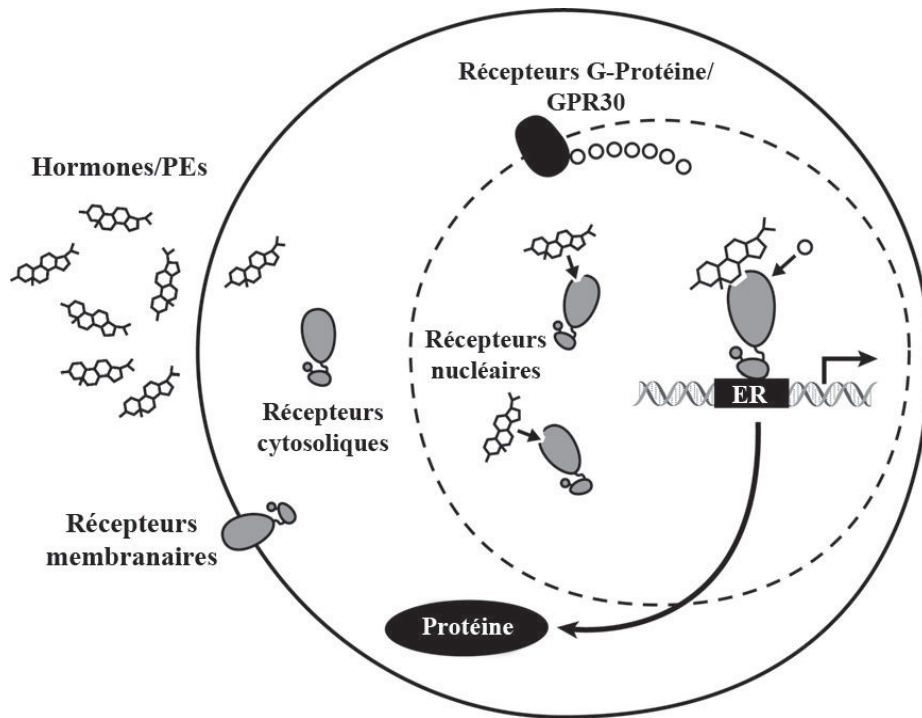


Figure 6. Voie de signalisation des récepteurs aux œstrogènes. D'après Schug et al. (2011).

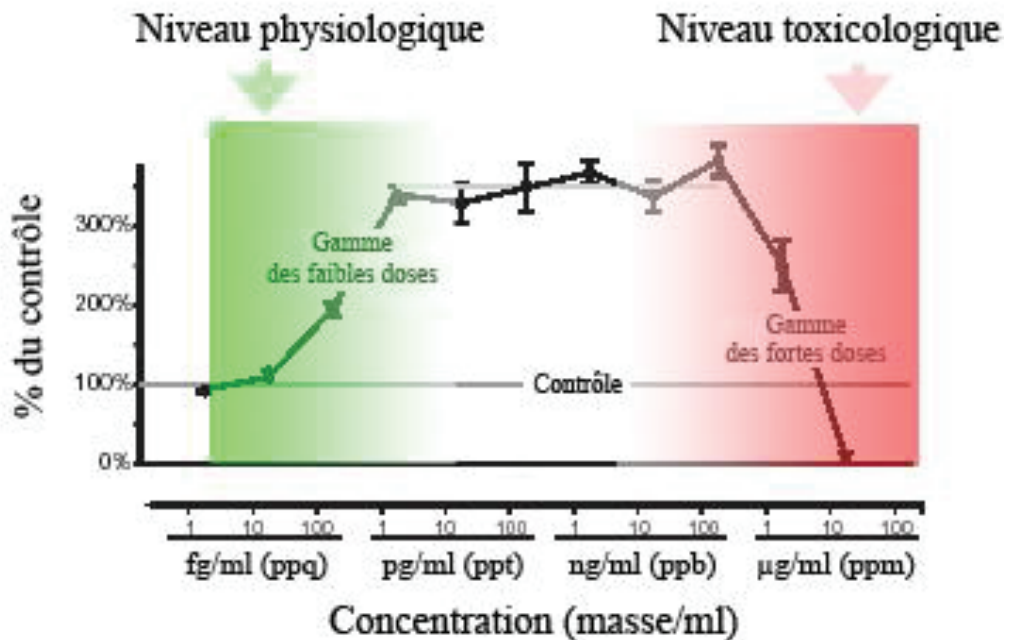


Figure 7. Relation dose-réponse de l'œstradiol. D'après Meyers and Hessler (2007).

La fixation d'une hormone va provoquer leur activation. Au final les PEs peuvent altérer ce processus de signalisation en se liant aux récepteurs stéroïdiens, ce qui conduit à une activation ou une inhibition de la transcription (Figure 6). Massaad et al. (2002), rapportent que les pesticides polychlorés (endosulfan, toxaphène, la dieldrine, o,p0-dichlorodiphényl trichloroéthane (o,p0DDT),...) interagissent directement avec les ESRs et sont capables de déplacer l'E2 de son récepteur.

Alors qu'il est bien établi que les PEs qui activent ESR1 et ESR2 peuvent avoir des effets délétères, les récentes avancées en endocrinologie montrent que les molécules œstrogéniques peuvent avoir des effets non génomiques sur l'expression des gènes, par l'intermédiaire de récepteurs associés à la membrane et de voies ayant recours aux seconds messagers et dont certaines peuvent être très rapidement activées et à des concentrations infinitésimales (Watson et al., 2011).

Comme il a été évoqué précédemment, les hormones endogènes ainsi que les PEs génèrent des courbes relations dose-effet non conventionnelles (page 20). Le mécanisme à l'origine de ce phénomène est le suivant (Figure 7): sous forme liée aux protéines plasmatiques (majeure partie), l'œstradiol est incapable d'interagir avec ses récepteurs et donc d'activer les gènes œstrogène-répondants. Seule la forme libre non liée est active, et dans des conditions physiologiques, sa concentration est très faible (zone verte de la Figure 7: parties par quadrillion (ppq)-parties par trillion (ppt)). Plus la concentration d'œstradiol augmente (au-delà de la zone verte), plus la réponse biologique augmente (ici la prolifération cellulaire). La zone verte représente la gamme de concentrations au-delà desquelles l'hormone non liée se retrouve dans le sang. Lorsque la concentration augmente jusqu'à 1 ppt, la réponse augmente, puis se stabilise (100 ppb). Quand la concentration atteint la gamme forte, la réponse diminue avec un arrêt du système autour de 10 ppm et au-delà. En réalité, quand la concentration de l'œstradiol augmente dans la gamme des faibles doses, l'hormone se fixe sur ses récepteurs et stimule la réponse génique. Toutefois, quand la fixation aux récepteurs atteint 10%, une boucle de rétroaction se met en place, conduisant à une diminution de la disponibilité de récepteurs supplémentaires. Ainsi, si la dose augmente davantage, l'effet de la boucle de rétroaction s'active jusqu'à ce qu'aucune quantité supplémentaire d'œstradiol ne puisse augmenter la réponse du système. Ceci se traduit par un plateau (1 ppt et 100 ppb). Ensuite, les doses d'œstradiol supérieures deviennent toxiques pour les cellules et le système s'arrête de fonctionner, passant même en dessous du niveau du contrôle.

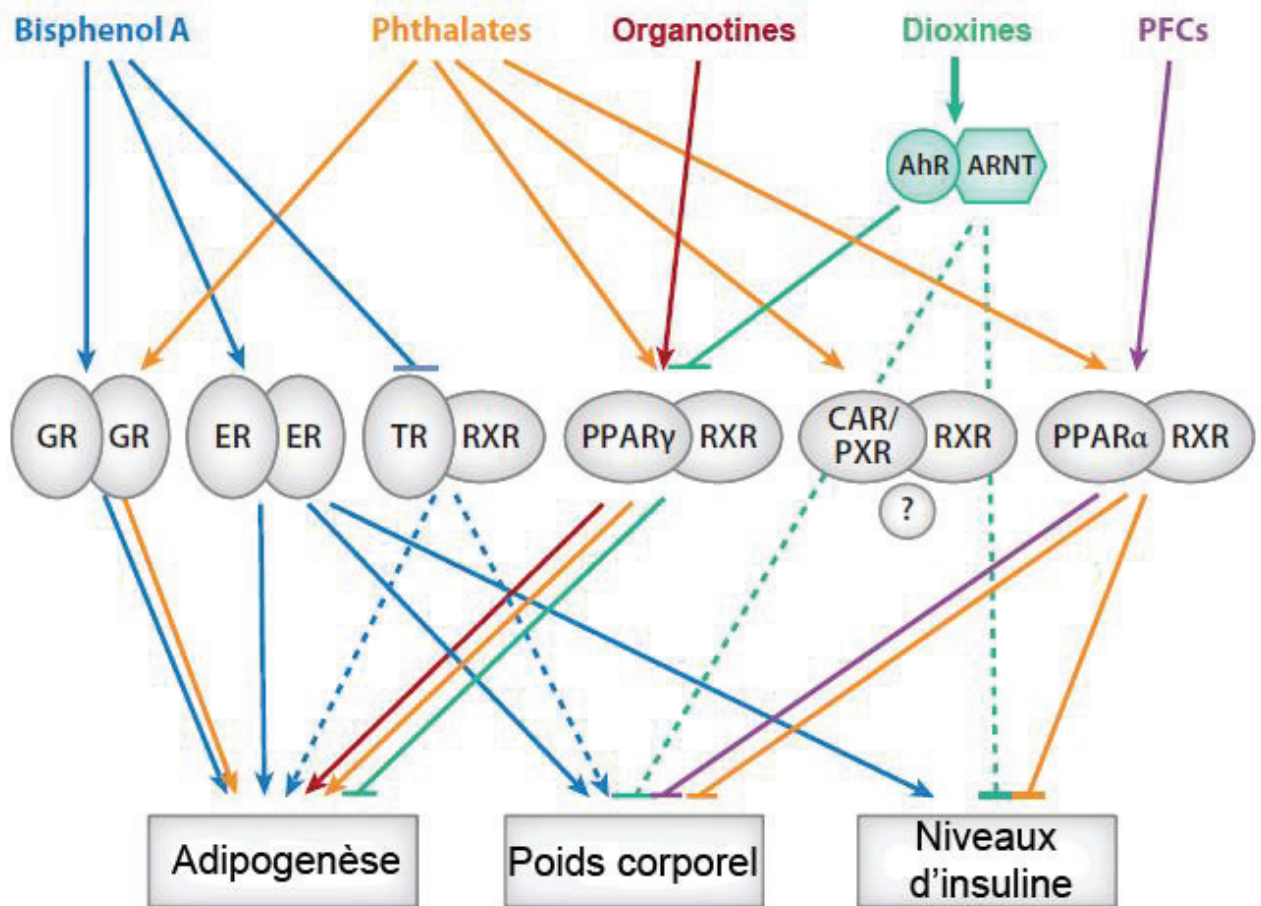


Figure 8. Manifestations métaboliques des perturbateurs endocriniens. D'après Casals-Casas and Desvergne (2011).

IV.1.2. Les effets métaboliques des perturbateurs endocriniens

Outre les effets sur le développement et la reproduction, il existe de plus en plus d'éléments en faveur d'un lien entre l'apparition de troubles métaboliques et l'exposition aux PE. L'incidence de l'obésité dans le monde augmente de façon constante et est souvent associée à des troubles métaboliques (diabète de type 2, complications cardio-vasculaires et pulmonaires, maladies hépatiques). Les PE interagissent avec divers membres de la super famille des RNs, induisant des perturbations métaboliques. Les récepteurs PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) jouent un rôle primordial dans ces effets métaboliques (Figure 8). En effet, l'activation de PPAR γ par les phtalates ou les organotines induit l'adipogenèse *in vitro*, et ce même effet est inhibé par les dioxines via l'activation de l'Aryl-hydrocarbène Receptor (AhR). PPAR α , qui joue un rôle majeur dans l'oxydation des acides gras, limite l'activité adipogénique, et est activé *in vivo* par les phtalates et les polyfluoroalkyle (PFC). Les PE oestrogéniques tels que le BPA sont également impliqués dans la perturbation métabolique suite à une interaction complexe avec les récepteurs aux hormones tels que les ESRs, les TRs et les GRs. Ces récepteurs jouent un rôle important dans le contrôle de l'adipogenèse, de la prise de poids, et des niveaux d'insuline, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore bien élucidés (lignes en pointillées sur la Figure 8). Enfin, même si les mécanismes ne sont pas encore décrits (lignes en pointillés et points d'interrogation sur la Figure 8), les récepteurs Pregnane X Receptor (PXR), Constitutive Androstane Receptor (CAR) et AhR jouent également un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie métabolique en interagissant directement ou indirectement avec les voies métaboliques (Casals-Casas and Desvergne, 2011).

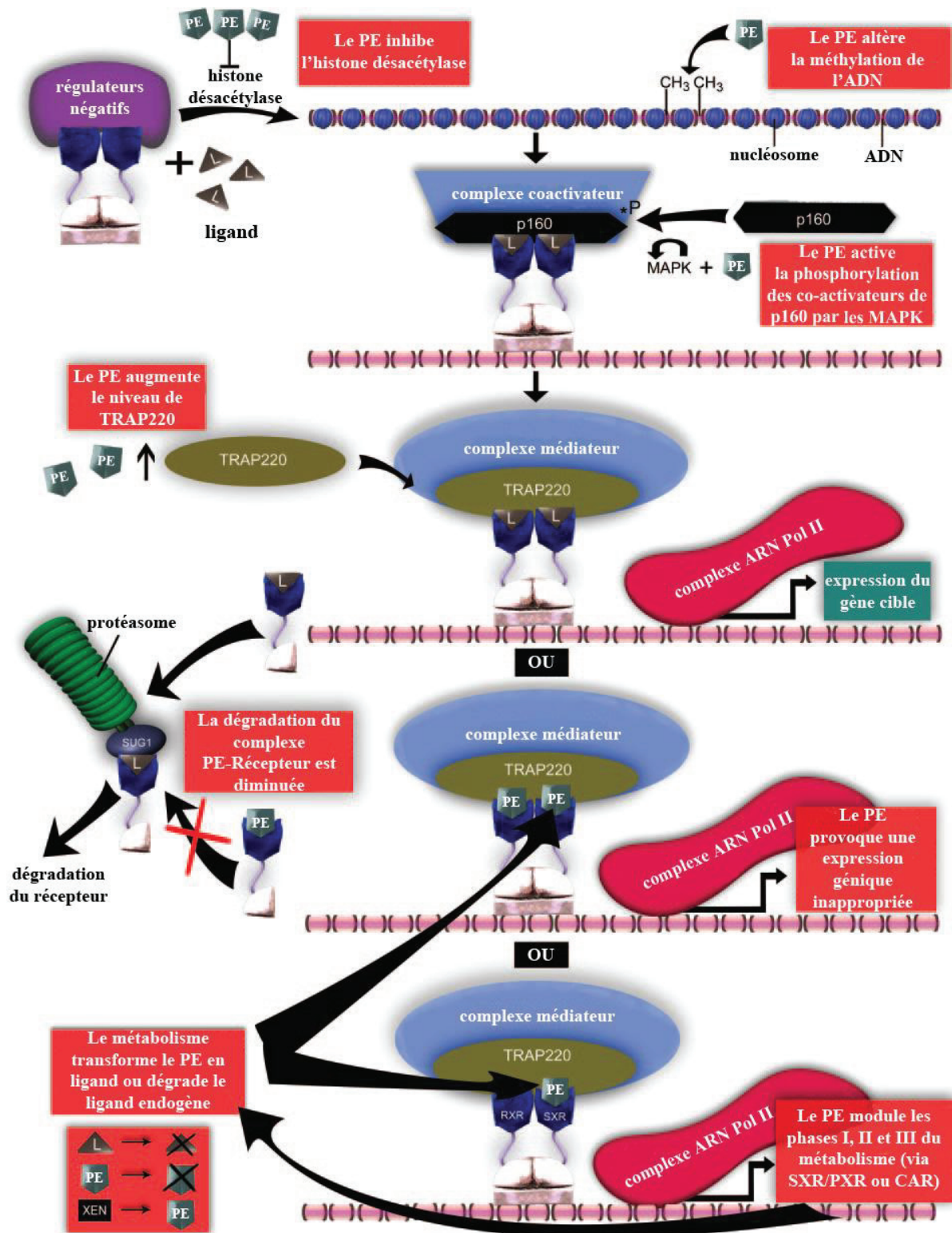


Figure 9. Modes d'action des perturbateurs endocriniens sur la transcription de gènes cibles et sa régulation.. L, ligand; PE, perturbateur endocrinien; XEN, xénobiotique. D'après Tabb and Blumberg (2006).

IV.2. Modulation du métabolisme des hormones stéroïdiennes

La biodisponibilité hormonale dépend de la biosynthèse des hormones, de leur transport vers les tissus cibles, du taux de protéines plasmatiques et enfin du catabolisme des hormones. Les PEs peuvent interférer avec tous ces processus (Baker et al., 1998, You et al., 2001, Boas et al., 2006). Le catabolisme des hormones stéroïdiennes est particulièrement affecté par l'action des PEs, puisque beaucoup d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont impliquées dans ces processus. Les enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP450), CYP1A2, CYP3A4, CYP1A1, et CYP1B1, catalysent l'hydroxylation de l'E2 (Tsuchiya et al., 2005). Les gènes codant pour ces enzymes sont régulés par certains RNs, lesquels peuvent être activés par les PEs. Les PEs peuvent ainsi interférer avec le métabolisme des hormones endogènes par action sur ces RNs (Figure 9). L'activation enzymatique consécutive à l'exposition à un PE peut conduire à une augmentation du catabolisme et donc compromettre les voies de signalisation physiologiques des hormones endogènes. De récentes études montrent que le CYP19B (aromatase) qui convertit la testostérone en œstradiol est directement régulé par AhR. Ainsi, l'activation d'AhR par les PEs peut aboutir à l'augmentation de la production d'œstradiol. Deux RNs, le Steroid X Receptor humain (SXR) et PXR (chez le rat), ainsi que CAR sont des régulateurs importants du métabolisme des xénobiotiques et des hormones stéroïdiennes. (Tabb and Blumberg, 2006). Ces trois récepteurs sont fortement exprimés au niveau du foie et de l'intestin où ils interviennent dans l'induction des enzymes CYP450, d'enzymes de conjugaison et de transporteurs en réponse à leurs ligands endogènes ou xénobiotiques. Comme beaucoup de récepteurs nucléaires, SXR/PXR régulent la transcription après fixation de leur ligands, alors que CAR est actif de manière constitutive (Tsuchiya et al., 2005). Beaucoup de PEs classiques altèrent l'activité de CAR et l'expression de ses gènes cibles. Le transnonachlore (composant du pesticide interdit chlordane) réprime l'activité basale de CAR chez la souris (Tabb and Blumberg, 2006, Moore et al., 2002). Les pesticides organochlorés, le di(2-éthylhexyl) phtalate sont des activateurs de PXR et du CYP3A (Schuetz et al., 1998, Masuyama et al., 2000) et le BPA active SXR (Takeshita et al., 2001).

L'activation de SXR/PXR par tous ces composés peut augmenter la production des métabolites de ces PEs tout en perturbant la biodisponibilité des androgènes et œstrogènes endogènes (pour revue Tabb and Blumberg, 2006).

En plus des CYP450, il existe d'autres enzymes qui interviennent dans le métabolisme des hormones endogènes: enzymes de glucuroconjugaison, d'O-méthylation et de sulfoconjugaison. Parmi ces enzymes, les sulfotransférases (SULT) jouent un rôle important dans la régulation des taux circulants d'hormones en les inactivant. Harris et al. (2000) montrent que certains alkylphénols peuvent être sulfoconjugués par SULT1A1/2 et/ou inhibent ces enzymes. Les auteurs suggèrent que les alkylphénols qui inhibent les SULT peuvent être à l'origine d'une diminution de la sulfoconjugaison de l'œstradiol et donc d'une augmentation de la fraction active responsable de l'apparition de perturbations endocriniennes (Fisher, 2004, Harris et al., 2000).

IV.3. Modulation des coactivateurs des récepteurs nucléaires

Les RNs activent la transcription en se liant directement à des éléments de réponse aux hormones dans la région régulatrice de gènes cibles, et en recrutant un ensemble de protéines coactivatrices et la machinerie de transcription (Tabb and Blumberg, 2006). Les coactivateurs de transcription comprennent la famille des p160 [co-activateur du récepteur des stéroïdes-1 (SRC-1), facteur de transcription intermédiaire 2/protéine d'interaction avec le récepteur des glucocorticoïdes 1, l'activateur du récepteur des hormones thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque/ protéine de fixation au Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ (PPAR- γ), ...]. Les différences tissulaires dans les niveaux d'expression des protéines coactivatrices régulent l'activation des RNs, par concurrence entre les RNs pour les coactivateurs et les autres facteurs de transcription. Ainsi, des modifications dans les niveaux d'expression des récepteurs et/ou des corégulateurs (Acide RiboNucléique messenger (ARNm) et protéines) peuvent moduler l'activité du récepteur. Les PE peuvent moduler l'expression de gènes cibles en modifiant le niveau d'expression des protéines corégulatrices (Figure 9) (Tabb and Blumberg, 2006). En effet, Lonard et al. (2004) montrent que le 4-hydroxy tamoxifène et le raloxifène augmentent le niveau basal d'expression des coactivateurs SRC-1 et SRC-3, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'activation transcriptionnelle d'ESR1. De même, le BPA augmente l'expression de la protéine activatrice du récepteur aux hormones thyroïdiennes 220, ce qui induit l'expression d'ESR2 dans l'utérus de souris (Inoshita et al., 2003).

Une forme plus subtile de perturbation peut faire suite à une concurrence entre les récepteurs aux hormones stéroïdiennes et les récepteurs des xénobiotiques pour les coactivateurs de transcription. Par exemple, les PE substrats de CAR peuvent avoir des effets endocriniens en limitant la disponibilité des protéines coactivatrices. En effet, des études montrent que CAR peut inhiber l'activité transcriptionnelle médiée par les ESRs sans fixation à un ERE (Min et al., 2002). Or des composés comme le 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzène activent CAR et diminuent la disponibilité de la protéine coactivatrice GRIP-1, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activité transcriptionnelle des ESRs (Min et al., 2002).

IV.4. Dégradation des récepteurs nucléaires par l'intervention du protéasome

Plusieurs membres de la superfamille des RNs peuvent être dégradés par la voie ubiquitine du protéasome de façon ligand-dépendante. Le turnover des récepteurs, assuré par leur dégradation via le protéasome, empêche la sur-stimulation des cellules par les hormones endogènes ou tout autre signal d'activation (Dennis et al., 2001). L'inhibition de la voie de dégradation ubiquitine du protéasome inhibe l'activité transcriptionnelle de RNs stéroïdiens tels que le récepteur de la progestérone (PGR) (Syvala et al., 1998) et AR (Sheflin et al., 2000, Lin et al., 2002). ESR1 subit différents taux de dégradation par le protéasome en présence d'agonistes, antagonistes, et de modulateurs sélectifs des ESRs. Ceci démontre que l'activité transcriptionnelle peut être affectée par la modulation de la stabilité du récepteur (Wijayarathne and McDonnell, 2001). Les PEs pourraient donc agir sur la dégradation par le protéasome des récepteurs nucléaires ou des protéines corégulatrices et avoir ainsi une incidence directe sur le niveau et la durée des réponses hormonales normales (Figure 9), et perturber de ce fait le système endocrinien. Masuyama and Hiramatsu (2004) montrent par exemple que le BPA inhibe la dégradation d'ESR2 en empêchant son interaction avec un composant du protéasome (SUG1, suppresseur du Galanin receptor 1), qui est normalement induite par l'œstradiol. En inhibant la dégradation d'ESR2, le BPA augmenterait ainsi l'expression protéique du RN et potentialiserait son activation et favoriserait donc l'apparition de perturbations endocriniennes.

IV.5. Augmentation de la sensibilité aux hormones

Les récents travaux de Jansen et al. (2004) montrent un nouveau mécanisme de perturbation endocrinienne. Leurs résultats montrent que l'acide valproïque (antiépileptique) et l'acide méthoxyacétique (MAA) (métabolite d'un solvant) ne miment pas les hormones endogènes, mais augmentent plutôt l'activité des récepteurs hormonaux (ESR1, ESR2, AR, PGR et le récepteur aux hormones thyroïdiennes β (TR β)) en modifiant les signaux cellulaires qui activent ou inhibent les protéines kinases et les histones désacétylases (Jansen et al., 2004). Le rôle des histones désacétylases est de supprimer un groupe acétyle aux histones, ce qui permet aux histones de se fixer sur l'ADN et d'inhiber la transcription des gènes. L'exposition à l'acide valproïque et au MAA augmente la sensibilité cellulaire aux œstrogènes, progestines, et à d'autres ligands des RNs d'hormones, et améliore l'efficacité de transcription *in vitro* et *in vivo* (Jansen et al., 2004). Les études mécanistiques montrent que cet effet est obtenu par inhibition d'histone désacétylases et par activation de la protéine kinase activée par les mitogènes p42/p44 à des doses proches des niveaux d'exposition de l'homme. Les individus exposés à ces acides gras à chaîne courte sont ainsi plus susceptibles d'avoir des effets secondaires suite à la prise d'œstrogènes et de progestatifs (contraception orale et traitement hormonal substitutif de la ménopause). Ces sensibilisateurs aux hormones représentent une nouvelle voie d'interaction des PEs avec les RNs.

IV.6. Altération de la méthylation de l'ADN

L'ADN des cellules germinales primordiales est déméthylé, puis reméthylé de façon sexe-spécifique pendant la phase de détermination du sexe des gonades (Reik and Walter, 2001). La méthylation de l'ADN contrôle l'expression génique (Razin and Kantor, 2005) (Figures 4, 5 et 9). Un PE peut interférer avec la fidélité de ce processus et reprogrammer la lignée germinale en agissant sur les RNs tels que les ESRs et AR. Le méthoxychlore et la vinclozoline constituent des exemples de PEs agissant via ce mécanisme d'action. En effet, des études montrent que ces molécules altèrent les profils de méthylation de l'ADN du génome de la lignée germinale mâle et que ce phénotype est ensuite transmis aux générations suivantes (Anway et al., 2005, Kelce et al., 1994, Tabb and Blumberg, 2006).

Tableau 1. Exemples de perturbateurs endocriniens: origine et effets

Perturbateurs endocriniens	Origine/Utilisation	Effets endocriniens	Références
Acides organiques			
Acide méthoxyacétique	Métabolite de l'éthylène glycol mono méthyl éther (solvant industriel)	Hypofertilité, avortements spontanés, réduction du nombre de spermatozoïdes chez l'homme	Henley et Korach, 2006
Alkylphénols			
Bisphénol A	Antioxydant, plastifiant, assouplissant PVC	Puberté précoce, perturbation du développement mammaire, augmentation de l'incidence du cancer du sein et de la prostate, perturbation de la reproduction chez les rongeurs	Vom Saal et al., 2007 Diamanti-Kandarakis et al., 2009
Nonylphénol	Détergent	Puberté précoce, hypofertilité, perturbation de la production d'embryons, du volume de ponte, et du nombre d'œufs chez les animaux aquatiques	Vanderberg et al., 2012
Octylphénol	Tensioactif, intermédiaire de synthèse des caoutchoucs, pesticide et peinture		
Organochlorés			
Aroclor 1221 (Polychlorobiphényle)	Fabrication liquide de refroidissement, lubrifiants, peintures, plastiques	Perturbation de la différenciation sexuelle cérébrale chez le rat	Vanderberg et al., 2012
Chlordécone	Pesticide	Masculinisation du comportement des femelles hamsters, puberté précoce chez les ratte	Geilert, 1978 Gray, 1982
Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)	Insecticide	Puberté précoce, hypofertilité des hommes et des femmes de la génération F1	Diamanti-Kandarakis et al., 2009
Dioxines	Sous-produits des processus industriels	Perturbation du développement mammaire, augmentation de la susceptibilité au développement de cancers mammaires, blocage de l'ovulation chez la ratte pubère	Diamanti-Kandarakis et al., 2009
Méthoxychlore	Insecticide	Syndrôme de retard anovulatoire chez le rat, puberté précoce chez le rat	Gray et al., 1988
Phthalates	Plastifiant utilisé pour assouplir les PVC	Développement mammaire précoce chez les jeunes filles, réduction de la distance anogénitales chez les garçons	Diamanti-Kandarakis et al., 2009
Phytoestrogènes			
Génistéine	Soja et produits dérivés	Comportements agressifs et défensifs, maintien de l'os spongieux après ovariectomie chez le rat	Vanderberg et al., 2012
Produits pharmaceutiques			
Acide valproïque	Antisépileptique	Effets secondaires suite à une association aux œstrogènes et progestatifs de synthèse (eg. contraception orale, traitement hormonal substitutif après la ménopause)	Tabb et Elumberg, 2006
Diethylstilbestrol synthétique (hormone)	Mé-dicament anti-abortif	Malformations de l'appareil génital de la génération F1 chez l'homme et les rongeurs (mâles et femelles)	Henley et Korach, 2006 Myagawa et al., 2011
Vinorelbine	Pesticide/Fongicide	Troubles métaboliques, tumeurs et dysfonctionnements de la reproduction des rats mâles des générations F1 à F4	Arway et Skinner, 2008b Shono et al., 2004 Arway et al., 2005 Crews et McLachlan, 2006

V. Réglementation et perturbateurs endocriniens

L'Union Européenne a établi une classification des substances chimiques toxiques pour la reproduction (directive 67/548/CEE modifiée relative à la classification, l'étiquetage et l'emballage des substances dangereuses). Elle comporte trois catégories, selon le niveau de connaissance des effets sur la santé de la substance considérée. Les effets cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (CMR), sont pris en compte dans la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances). En France, un décret spécifique au milieu professionnel est mis en place pour la mise en œuvre de mesures préventives. Cependant les autres effets liés à la perturbation endocrinienne ne sont pas considérés. Du côté environnemental, la classification de PEs n'existe pas en tant que telle. Toutefois il existe des réglementations limitant la contamination de l'environnement, comme la Directive Cadre sur l'Eau par exemple, qui limitent les rejets de certains produits toxiques pour l'environnement dont certains PEs (comme les PCB, les phtalates, ...). Il n'existe donc actuellement pas de réglementation propre aux PEs alors que la réglementation devrait pouvoir intégrer l'évolution des connaissances en termes de sources de contamination, d'effets sur les écosystèmes et la biodiversité, et de notion de faibles doses et de période d'exposition (Jean and Benmarhnia, 2011, Bars et al., 2012).

Le tableau 1 regroupe les principaux PEs cités dans cette partie, leurs origines ainsi que leurs effets endocriniens majeurs.

**Chapitre 2. LA ZEARALENONE:
CONTAMINANT ALIMENTAIRE ET
PERTURBATEUR ENDOCRINIEN**

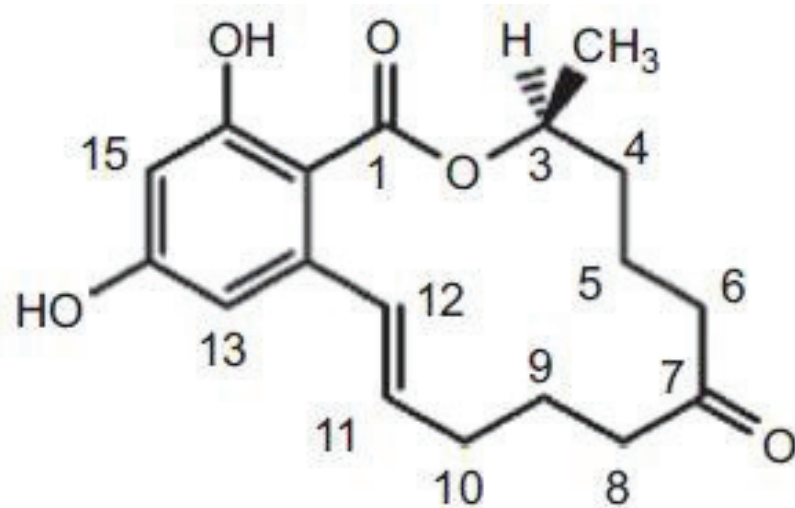


Figure 10. Structure de la zéaralénone.

Les PEs possédant une activité oestrogénique représentent le plus large groupe de PEs connus à ce jour. La zéaralénone (ZEN), décrite dans ce chapitre, en fait partie et constitue un modèle de contaminant environnemental d'origine naturelle répondant à la définition des PEs.

I. Structure chimique et propriétés physicochimiques

La ZEN est une mycotoxine oestrogénique non stéroïdienne, issue du métabolisme secondaire de nombreuses espèces de champignons du genre *Fusarium* : *F.graminerum* ou *Gibberella zea*, *F.culmorum*, *F.cerealis*, *F.equiseti*, *F.crookwellense* et *F. semitectum* (Chelkowski, 1998).

I.1. Structure chimique

La ZEN a été isolée pour la première fois en 1962 sur du maïs contaminé par *Gibberella zea* (Stob et al., 1962), et sa structure chimique est déterminée en 1966 (Urry et al., 1966) et 1967 (Kuo et al., 1967). La ZEN est une lactone macrocyclique de l'acide resorcylique possédant un centre de stéréo isomérisation (Figure 10). De formule brute $C_{18}H_{22}O_5$, son poids moléculaire est de 318.36. Selon la nomenclature de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), son nom chimique est : (4S, 12E)-16,18-dihydroxy-4-méthyl-3-oxabicyclo [12.4.0] octadeca-1(18), 12, 14,16-tetraène-2,8-dione. Cette molécule est issue d'un processus de synthèse dit polycétidique, car il implique une réaction de condensation tête-queue d'unités d'acétate grâce au système enzymatique acétate-malonyl-coenzyme (Huffman et al., 2010, Kim et al., 2005).

I.2. Nomenclature

La dénomination commune de «zéaralénone» est le fruit d'une combinaison entre *G. Zea*, resorcylic acid lactone, -éne, pour la présence d'une double liaison en position C11-C12, et enfin -one en raison de la présence d'une fonction cétone en position C-7 (Zinedine et al., 2007). D'autres dénominations existent, comme Resorcylic Acid Lactone, F-2 toxine et Fermentation Estrogenic Substance (Gaumy et al., 2001, Metzler, 2010).

Les abréviations de la ZEN et de ses métabolites utilisées dans ce document sont celles proposées par Metzler (2010).

I.3. Propriétés physico-chimiques

Macroscopiquement, la ZEN pure se présente sous forme de cristaux blancs avec un point de fusion de 164-165°C. Elle est capable d'absorber la lumière ultraviolette avec un maximum d'absorption à 236 nm, et est fluorescente. Cette dernière caractéristique est exploitée pour son dosage, et celui de ses dérivés par des techniques de chromatographie couplées à une détection UV-Fluo (Gaumy et al., 2001). De par sa structure de lactone macrocyclique, la ZEN est une substance très faiblement soluble dans l'eau. De plus, la présence de fonctions alcools et cétones explique sa très faible solubilité dans les solvants apolaires comme l'hexane. Ainsi, cette molécule possède toutes les caractéristiques structurales pour avoir un optimum de solubilité dans les solvants de polarité intermédiaire comme le dichlorométhane, l'acétone et l'éthanol (Gaumy et al., 2001). Malgré la présence d'une fonction lactone et d'une double liaison en C11-C12, la ZEN est classée parmi les mycotoxines stables (Krska et al., 2003). En effet, un chauffage à 150°C pendant plusieurs heures n'est pas capable de dégrader la ZEN pure ou des graines contaminées par la ZEN. L'augmentation de la température à 200°C n'altère que très modérément sa stabilité (Lauren and Smith, 2001, Yumbe-Guevara et al., 2003). Toutefois, Ryu et al. (1999) montrent que son chauffage dans une solution alcaline produit un début de dégradation dès 150°C.

Tableau 2. Contamination de céréales destinées à l'alimentation des animaux de rente en Europe. D'après Döll et Dänicke (2011).

Céréales	Nombre d'échantillons testés	Echantillons contaminés (%)	Maximum (mg/kg)
Blé	847	30	0.15
Maïs	824	79	6.49
Orge	226	5	0.05
Avoine	377	20	1.31
Seigle	84	5	0.02

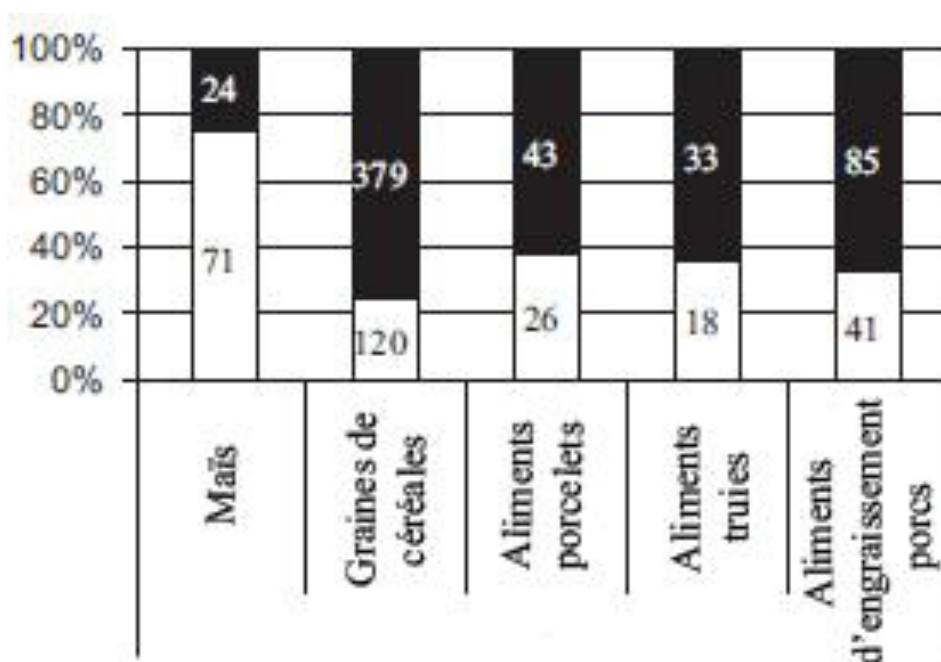


Figure 11. Résultats du programme de contrôle national sur la présence de la zéaralénone dans les céréales et les aliments complets de différentes catégories de porcs en 2008 (données fournies par l'Office fédéral de la protection des consommateurs et de la sécurité alimentaire allemande). D'après Döll et Dänicke (2011).

■ Proportion et nombre d'échantillons inférieurs aux limites de détection; □ proportion et nombre d'échantillons supérieurs aux limites de détection.

II. Contamination des aliments destinés aux animaux

Les champignons du genre *Fusarium* sont des phytopathogènes qui contaminent de nombreuses cultures agricoles (les céréales en particulier) du monde entier. Cette contamination concerne majoritairement les zones à climat frais et humide (régions tempérées d'Europe, d'Amérique et d'Asie) (Zinedine et al., 2007). La ZEN est synthétisée de façon concomitante avec d'autres fusariotoxines comme les trichotécènes (déoxynivalénol et nivalénol) et les fumonisines (fumonisine B1), par les mêmes espèces de champignons (Gaumy et al., 2001). Les principales espèces de *Fusarium* productrices de ZEN sont représentées par *F. graminearum* et *F. culmorum*. Ces champignons colonisent les cultures céréalières plein champ et produisent leurs toxines principalement avant la récolte, et dans une moindre mesure après la récolte, lors de mauvaises conditions de manipulation, séchage et stockage des céréales (Zinedine et al., 2007). Les conditions météorologiques, en particulier pendant les périodes de croissance et de floraison des plants, ont un impact majeur sur l'infection des cultures par les *Fusarium* et la production de mycotoxines (faible température et humidité élevée). C'est pourquoi, les taux de contamination par la ZEN varient d'une année à l'autre (EFSA, 2011). A titre d'exemple, Meister (2009), montre lors d'une enquête menée en Allemagne de 2000 à 2007 que les échantillons céréaliers des récoltes des années 2002 et 2007 sont les plus contaminés par la ZEN (Meister, 2009). De même, une étude dans les Pays bas menée en 2003 et 2004, montre que des teneurs très élevées en ZEN (jusqu'à 5700 µg/kg) sont retrouvées dans le blé après les fortes pluies de l'automne 2004 (Hoogenboom et al., 2008).

L'évaluation de la contamination des céréales destinées à l'alimentation des animaux de rente par la ZEN en Europe en 2003, a révélé que le blé, le maïs et l'avoine sont les denrées les plus contaminées (Tableau 2). Le rôle du maïs dans cette contamination est particulièrement important puisque les données officielles de surveillance allemande (Office fédéral de la protection des consommateurs et de la sécurité alimentaire allemand) montrent que plus de 60% des échantillons de maïs analysés sont contaminés par la ZEN, tandis que les autres céréales et aliments pour porc (aliments complets) ont un taux de contamination plus faible entre 20 et 40% (Figure 11) (Döll et Dänicke, 2011).

III. Devenir de la zéaralénone dans l'organisme (données sur animaux)

La ZEN est une molécule soluble dans les solvants de polarité intermédiaire, ce qui lui permet une large diffusion dans l'organisme. Dans cette partie seront abordées ses différentes étapes toxico-cinétiques (absorption, distribution, métabolisme et élimination).

III.1. Absorption

Après administration orale, la ZEN est rapidement et massivement absorbée chez le rat, le lapin, le porc et l'homme (Avantaggiato et al., 2003, Zinedine et al., 2007). Toutefois, cette absorption est très difficile à quantifier à cause d'une forte excrétion biliaire, et de l'existence d'un cycle entéro-hépatique (Biehl et al., 1993, Zinedine et al., 2007). L'absorption de la ZEN chez le porc après l'administration d'une dose orale unique de 10 mg/kg est estimée à 80-85% (Biehl et al., 1993, Zinedine et al., 2007). L'apparition rapide de la ZEN dans le sang suggère une forte absorption au niveau de la partie proximale du tractus gastro-intestinal (estomac et intestin grêle). En effet, une étude de transport réalisée sur un modèle mimant le tractus gastro-intestinal de porc, a permis de déterminer que l'absorption de la ZEN s'effectue principalement au niveau du jéjunum et de l'iléum (Avantaggiato et al., 2003). Il n'existe pas de données concernant son absorption chez l'homme, mais il semblerait qu'elle soit, comme chez l'animal, rapide et massive d'après une étude réalisée sur la lignée intestinale humaine Caco-2 (Pfeiffer et al., 2011). Les études du mécanisme par lequel la ZEN est absorbée au niveau intestinal montrent que cette absorption suit une cinétique de premier ordre, qui serait en faveur d'une diffusion passive (Cavret and Lecoœur, 2006, Ramos et al., 1996). Il existe très peu d'études sur la prise en charge de la ZEN par des transporteurs membranaires. Nos travaux antérieurs sur les cellules intestinales humaines Caco-2, montrent que la ZEN est activement prise en charge par les pompes d'efflux ABCC1/MRP1 et ABCC2/MRP2, qui sont des transporteurs de la famille des ATP Binding Cassettes (ABC) (Videmann et al., 2009). Une autre étude montre que cette molécule est également prise en charge par des transporteurs d'anions et de cations organiques de l'homme et du rat (OAT1-4 et OCT1-2) au niveau rénal et hépatique. Les auteurs suggèrent que ces transporteurs seraient impliqués dans son absorption au niveau de ces deux organes (Tachampa et al., 2008).

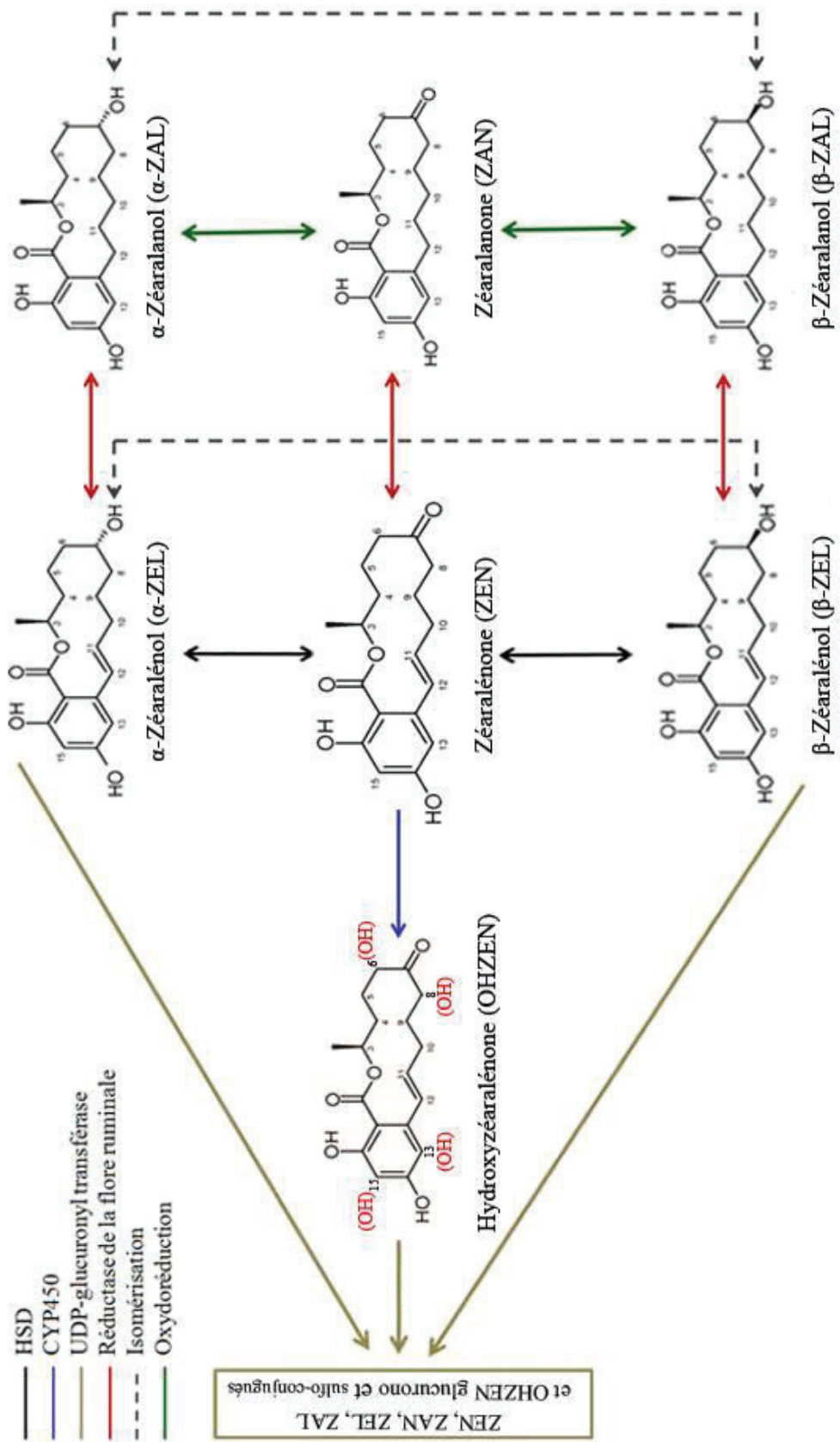


Figure 12. Métabolisme de la zéaralénone.

III.2. Distribution

La ZEN possède une très faible affinité pour les globulines sériques, où se fixent également les hormones: 5% seulement contre 100% pour E2. Ceci a pour conséquence une élévation de la fraction sérique libre, ainsi disponible pour aller se fixer sur les récepteurs cibles (Ahamed et al., 2001).

Toutefois, cette toxine possède un volume apparent de distribution large (Kuiper-Goodman et al., 1987) et la ZEN et ses métabolites sont largement distribués dans les tissus chez le rat et le porc (Bernhoft et al., 2001, Goyarts et al., 2007a, Shin et al., 2009). Ils se concentrent principalement dans le foie, l'intestin, la bile et les reins (Bernhoft et al., 2001). La ZEN est également retrouvée dans les organes possédant des récepteurs aux œstrogènes comme l'utérus, les ovaires et les testicules (Kuiper-Goodman et al., 1987, Shin et al., 2009). Il existerait également une accumulation au niveau du tissu adipeux, en faveur d'un phénomène de stockage (Kuiper-Goodman et al., 1987). De plus, la ZEN et ses métabolites sont capables chez le rat et le porc de franchir la barrière placentaire et se retrouvent au niveau des tissus fœtaux (Bernhoft et al., 2001, Danicke et al., 2007a, Goyarts et al., 2007a).

III.3. Métabolisme

Le métabolisme de la ZEN est principalement hépatique et en partie intestinal. Chez les mammifères, il existe trois voies de biotransformation en compétition (Figure 12):

Des réactions de réduction de la fonction cétone en position 7, aboutissent à la formation des isomères α et β -zéaralénol (α et β -ZEL). Ces réactions sont catalysées par les enzymes 3- α et 3- β hydroxy stéroïde déshydrogénases (HSDs), NADH et/ou NADPH dépendantes en fonction des espèces (Hussein and Brasel, 2001, Videmann et al., 2009, Zinedine et al., 2007). Ces enzymes sont normalement impliquées dans le métabolisme des stéroïdes endogènes, d'où une possible compétition entre la ZEN et ces stéroïdes pour le site actif des HSDs (Gaumy et al., 2001, Zinedine et al., 2007).

Chez les ruminants, la ZEN et les α et β -ZEL sont à leur tour réduits (double liaison en C11-C12) par des réductases de la flore ruminale en zéaralanone (ZAN), et en α et β -zéaralanol (α et β -ZAL) (Miles et al., 1996, Duca et al., 2012).

Toutefois cette réduction est quantitativement moins importante que celle aboutissant à la formation des isomères α et β -ZEL (Gaumy et al., 2001, Zinedine et al., 2007, EFSA, 2011).

Des réactions de mono-hydroxylation par les cytochromes P450 recombinants humains (Bravin et al., 2009, Pfeiffer et al., 2009) et les microsomes hépatiques humains *in vitro* sur les positions 6/8 [partie aliphatique, 6/8 hydroxy zearalenone (OH-ZEN)] et 13/15 [partie aromatique, 13/15 hydroxy zearalenone (OH-ZEN)] (Pfeiffer et al., 2009). Cette voie métabolique n'est étudiée que récemment et manque à ce jour de données *in vivo*.

Les métabolites oxydés majoritaires semblent être ceux qui proviennent de l'hydroxylation du cycle aromatique et sont des catéchols. Ces composés s'oxydent en quinines qui peuvent modifier les macromolécules biologiques notamment en formant des adduits à l'ADN. Il semblerait que le cytochrome impliqué dans cette voie soit majoritairement le CYP 1A2, avec une moindre contribution du CYP 3A4 (Pfeiffer et al., 2009). Les métabolites catéchols de la ZEN, α -ZEL et β -ZEL sont également substrats des catéchol-O-méthyl transférases et aboutissent à la formation de mono méthyle éther catéchols *ex vivo* (Pfeiffer et al., 2009).

Pour ce qui est des métabolites hydroxylés en C6/8 de la ZEN, ce sont les CYP 2C8 et CYP3A4/5 qui semblent être principalement impliqués selon une étude réalisée avec des CYP recombinants humains (Bravin et al., 2009). *In vitro*, l'homme semble produire peu de C6/8 OH-ZEN par rapport à d'autres espèces (singe > chien > lapin > rat > homme >> souris) (Bravin et al., 2009). Une étude récente montre que les catéchols de la ZEN n'ont plus d'activité oestrogénique (Reinen et al., 2011). Les C6/8 OH-ZEN quant à eux, semblent être moins actifs que la ZEN selon le test d'activation transcriptionnelle des récepteurs aux œstrogènes α et β dans la lignée humaine Hela (Bravin et al., 2009).

Il est à noter qu'il existe des différences interspécifiques quant aux proportions des métabolites produits (Cavret and Lecoœur, 2006, Gaumy et al., 2001, Zinedine et al., 2007). Malekinejad et al. (2006) rapportent des différences interspécifiques chez les mammifères dans la transformation hépatique de la ZEN. Le porc et le mouton produisent majoritairement l' α -ZEL (5 fois plus que le β -ZEL pour le porc) (Biehl et al., 1993, Malekinejad et al., 2006), alors que les rats et les vaches produisent respectivement 60 et 4.3 fois plus de β -ZEL que d' α -ZEL (Jodlbauer et al., 2000). Quelques données suggèrent que l'homme produit des quantités significatives d' α et de β -ZEL avec une prédominance de l' α -ZEL selon des données d'excrétion urinaire (Mirocha et al., 1981).

Concernant les métabolites mono hydroxylés, les CYPs recombinants humains qui convertissent la ZEN en catéchols, produisent majoritairement le 15-OH-ZEN, alors que les rats, les porcs et les vaches donnent principalement le 13-OH-ZEN (EFSA, 2011).

Des réactions de conjugaison de la ZEN et de ses métabolites, principalement à l'acide glucuronique par les uridine diphosphate glucuronyl transferases (UDPGT) (Cavret and Lecoer, 2006, Zinedine et al., 2007), ainsi qu'au sulfate par SULTs (Gaumy et al., 2001), sont considérées comme des voies de détoxification de la ZEN puisque qu'elles produisent des métabolites biologiquement inactifs (aucune preuve d'activité à ce jour) (EFSA, 2011).

Sur la base d'études réalisées *in vitro*, la ZEN, les α - β ZEL, ainsi que les autres métabolites réduits (α - β ZAL) sont facilement glucuronoconjugués dans le foie, l'intestin ainsi que dans les organes extra-hépatiques chez l'homme et chez différentes espèces animales (rats, porcs, bovins) (Pfeiffer et al., 2010). Les UGTs humains les plus actifs dans la glucuronoconjugaison de la ZEN et de ses métabolites sont UGT1A1, 1A3 et 1A8. Selon les études *in vitro* réalisées sur des microsomes hépatiques humains, le glucuronide majoritairement formé *in vivo* serait probablement le 14-O-glucuronide (16 et 7-O glucuronides faiblement produits) (Pfeiffer et al., 2010). Par contre, la sulfoconjugaison, qui est quantitativement moins importante que la glucuronoconjugaison, se produirait exclusivement sur le groupement hydroxyle en position 14 dans la lignée intestinale humaine Caco-2 (Pfeiffer et al., 2011).

On retrouve des différences interspèces dans les réactions de conjugaison: chez le porc, du fait de l'absence de sulfotransférases, seuls les métabolites glucuronoconjugués sont formés (Biehl et al., 1993). Chez le rat, les métabolites glucuronoconjugués sont majoritairement formés (Gaumy et al., 2001).

Au vu de ses données et sachant qu'il existe des différences d'activité biologique entre les différents métabolites (l' α -ZEL est biologiquement le plus actif et le β -ZEL le moins actif (voir mécanisme d'action page 53), le 15-OH-ZEN est associé à une plus forte propension au stress oxydatif que le 13-OH-ZEN et les glucurono et sulfoconjugués sont à priori inactifs), il apparait clair que ces différences interspécifiques dans le métabolisme de la ZEN (compétition entre des voies d'activation et de désactivation) peuvent expliquer les différences de sensibilité aux effets oestrogénique de cette mycotoxine (Gaumy et al., 2001, Zinedine et al., 2007, EFSA, 2011).

De plus, bien que très peu de données sur la toxico-cinétique de la ZEN chez les jeunes animaux soient disponibles, il est possible que les fœtus et les nouveau-nés puissent être plus sensibles aux effets des œstrogènes phénoliques à cause de leur immaturité métabolique et physiologique (métabolisme hépatique et intestinal de phase II et fonction d'excrétion rénale plus faibles par rapport aux adultes) (EFSA, 2011).

III.4. Elimination

La ZEN et ses métabolites sont éliminés dans l'urine et la bile sous forme majoritairement glucurono-conjuguée, mais également sous forme libre (Cavret and Lecoer, 2006, Zinedine et al., 2007). La voie urinaire est la voie d'élimination principale chez l'homme, le rat et le lapin (Gaumy et al., 2001, Zinedine et al., 2007). Chez le porc, il existe une très forte excrétion biliaire de la ZEN et de ses dérivés à l'origine d'un cycle entéro-hépatique, et d'une forte élévation du temps de demi-vie plasmatique de ces composés. Cela peut expliquer la grande sensibilité de cette espèce à la toxicité de cette mycotoxine (Gaumy et al., 2001, Danicke et al., 2005). Chez les ruminants, les taux retrouvés dans la bile sont de 68% pour le β -ZEL, 24% pour l' α -ZEL, et 8% pour la ZEN (Tep, 2008). Bravin et al. (2009) rapportent la présence des 6/8-OH-ZEN dans le foie et l'urine du rat.

Le passage de la ZEN et de ses métabolites dans le lait est très faible (Hagler et al., 1980, Prelusky et al., 1990, Seeling et al., 2005). Les teneurs de ces toxines diminuent rapidement dès l'arrêt de l'exposition, et leur accumulation dépend de la dose d'exposition. Ainsi, il est rapporté que la contamination du lait de vache atteint 0.016% lorsque 1.8g de ZEN sont ingérés, et 0.008% pour une dose ingérée de 6g (Cavret and Lecoer, 2006). De même, 0.7% de ZEN sont retrouvés dans le lait de vaches après administration répétée (7jours) d'une dose de 25 mg/kg d'aliment, alors que la prise d'une dose unique plus forte (250 mg/kg d'aliment) donne des teneurs indétectables (Mirocha et al., 1981). Une récente étude réalisée en Argentine, montre que les vaches laitières dont l'alimentation est naturellement contaminée par la ZEN, donnent un lait dont la teneur en ZEN est estimée à 0.125 μ g/kg (Signorini et al., 2012).

IV. Exposition humaine

La contamination de l'homme par la ZEN peut être directe, par la consommation de végétaux et produits dérivés contaminés, ou indirecte par l'ingestion d'aliments d'origine animale (viande, œufs, lait, ...), les animaux de rente ayant eux même ingéré des aliments contaminés par la ZEN. L'European Food Safety Authority (EFSA) a récemment synthétisé les données concernant la contamination par la ZEN des aliments d'origine végétale et animale (EFSA, 2011). Les données détaillées dans les paragraphes qui suivent rassemblent une partie des données sur la contamination des aliments en Europe depuis l'émission de ce rapport.

Une autre source de contamination auparavant négligée est actuellement en cours d'investigation. En effet, la ZEN est décrite comme étant un micropolluant de l'eau. Cette voie de contamination sera également brièvement abordée.

IV.1. Aliments d'origine végétale

En 2003, la coopération scientifique pour les questions relatives à l'alimentation (Scientific Cooperation on Questions relating to Food, SCOOP) émet un rapport sur la contamination des céréales et de leurs produits dérivés sur la base de données collectées entre 1990 et 2002, fournies par neuf pays européens. Sur 4918 échantillons, la ZEN est détectée à un taux de 32 %. Les aliments les plus contaminés sont le maïs, le blé et leurs dérivés respectifs. La ZEN est détectée dans 70% des 1265 échantillons de maïs et dérivés, dont 10% avec des concentrations supérieures à 200 µg/kg. La plus forte concentration est signalée dans un échantillon de grains de maïs en provenance d'Italie (6492 µg/kg). Pour ce qui est du blé et ses produits dérivés, 25% des échantillons contiennent de la ZEN, mais seulement deux échantillons dépassent les 200 µg/kg. Des teneurs élevées en ZEN sont également retrouvées dans des échantillons d'avoine provenant de Finlande, et dont 44% contiennent plus de 200 µg/kg de la toxine (SCOOP, 2003). En se basant sur les teneurs moyennes de la ZEN dans les aliments couramment consommés, la consommation quotidienne moyenne des adultes varie entre 4 et 29 ng/kg de poids corporel. Les jeunes enfants ont une consommation quotidienne moyenne plus élevée, entre 6 et 55 ng/kg de poids corporel. Le maïs, le blé et leurs produits dérivés représentent les aliments les plus impliqués dans cette exposition (EFSA, 2011).

Tableau 3. Contamination d'aliments d'origine végétale par la zéaralénone dans quelques pays européens.

Pays	Année(s)	Nbre d'échantillons	Aliments analysés	Détection de ZEN (%)	Concentration* (µg de ZEN/kg d'aliment)	Référence
Allemagne	1999	20	Aliments pour bébés et jeunes enfants	0		Schollengerger et al. (1999)
	1999	60	Farine de blé	30	3 (médiane)	Schollengerger et al. (2002)
	2000-2001	84	Aliments à base de céréales	38	2-67	Schollengerger et al. (2005)
		85	Fruits et légumes	8	2-17	
	2004	35	Graines oléagineuses et noix	11	2-4	Kapperstein et al. (2005)
		38	Huile de germe de blé	≈100	177	
		20	Huile de soja	70	4	
	2005	41	Blé	63	15	Schollengerger et al. (2006)
		17	Avoine	24	21	
	2005	41	Maïs	85	48	Schollengerger et al. (2007)
45		Soja (spécialités allemands)	15.5	2-214		
2008	110	Huiles comestibles	11		Schollengerger et al. (2008)	
	407	Blé	41	72		
2000-2007	514	Seigle	16	23	Meister (2009)	
	44	Maïs	27	70		
2007	40	Maïs	93	480	Goertz et al. (2010)	
	139	Maïs cru importé de France et d'Argentine	42	100-1000		
Le royaume uni	1999	56	Maïs importé de France	59	26	Scudamore and Patel (2000)
	2004-2007	56	Maïs importé de France	59	26	Scudamore and Patel (2009)
France	2000	245	Composites de 176 aliments	2		Leblanc et al. (2005)
	2007-2008		Blé	<1	157	Giraud et al. (2010)
Belgique	2002		Blé issu de l'agriculture conventionnelle	85		Puissemier et al. (2006)
			Blé issu de l'agriculture biologique	5		
	2003		Blé issu de l'agriculture conventionnelle	0		
			Blé issu de l'agriculture biologique	0		
Danemark	1998-2001	30	Farine de blé	33	≈ 1	Rasmussen et al. (2003)
	2005-2006	36	Céréales issues de l'agriculture biologique	≈ 100	0-50.4	
Lituanie	2005-2006	36	Céréales issues de l'agriculture biologique	≈ 100	0-50.4	Suproniene et al. (2010)
		54	Blé	2	29	
Bulgarie	2007	18	Orge	11	10	Manova and Mladenova (2009)
		19	Maïs	21	80.6	
Roumanie	2002-2004	91	Céréales	90	0-100	Tabuc et al. (2009)
	2002	46	Maïs	30	8-969	
Italie	2009	43	Céréales du petit déjeuner	9	<100	Cavaliere et al. 2005
		44	Aliments pour bébés	2	<20	
Portugal	2007	300	132 maïs et aliments à base de maïs, 82 blé et aliments à base de blé, 25 orge, 53 soja, 8 tourmesol	56	70	Marques et al. (2008)
		64	Paprika	39		
Espagne	2009	35	Piments	46		Santos et al. (2010)

* Valeurs correspondant à des moyennes sauf si indiqué

Tableau 4. Estimation journalière de la consommation de zéaralénone en France. D'après Leblanc et al. (2005).

Catégorie population	Consommation (ng/kg/j)	% t-DJA (0,2µg/kg/j)	% population > t-DJA
adultes	33-70	16-35	<1
enfants (3-14 ans)	66-132	33-65	2,5
végétariens	50-560	25-285	31

Le Tableau 3 montre les taux de contamination d'une variété d'aliments par la ZEN dans quelques pays européens entre 1999 et 2009 issus du dernier rapport de l'EFSA (EFSA, 2011).

De par son caractère thermostable, la ZEN est également retrouvée dans les produits dérivés des céréales couramment consommés, comme la farine, le malt, et la bière, bien que les *Fusarium* à l'origine de sa production soient détruits (Brera et al., 2006). Les traitements thermiques des aliments comme la fabrication du pain, des pâtes et la cuisson des biscuits ne sont donc pas des techniques de décontamination efficaces (Gaumy et al., 2001, Zinedine et al., 2007). En France, une étude réalisée dans le but d'estimer l'exposition de la population française aux principales mycotoxines via l'alimentation (trois régions différentes et sur deux saisons), montre que sur 245 échantillons alimentaires analysés, 2% sont contaminés par la ZEN. Les aliments les plus contaminés sont par ordre décroissant: les céréales du petit déjeuner de type muesli et pétales de maïs enrichis (200µg/kg et 22µg/kg respectivement), les conserves de soja (53µg/kg), et enfin les noix et les graines oléagineuses (18 µg/kg) (Leblanc et al., 2005). Cette étude a permis d'estimer la consommation moyenne de la population totale à 33 ng/kg de poids corporel/jour. Les enfants (3-14 ans) ont, comme dans l'étude européenne, une consommation moyenne plus élevée estimée à 66 ng/kg de poids corporel/jour. Les végétariens représentent la population qui a la plus forte consommation quotidienne de ZEN variant de 50 à 200 ng/kg de poids corporel/ jour, puisqu'ils consomment beaucoup de produits céréaliers (Tableau 4).

IV.2. Aliments d'origine animale

Dans l'évaluation des risques pour le consommateur liés à la présence de résidus de ZEN et de ses métabolites dans les aliments d'origine animale, le rapport entre la quantité de ZEN retrouvée dans l'aliment consommé par l'homme et celle dans les aliments pour animaux (facteur de transfert), peut fournir une estimation approximative.

De nombreuses études européennes montrent que l'imprégnation par la ZEN et ses métabolites des tissus comestibles des animaux de rente et de leurs produits dérivés (œufs, lait, ...) après ingestion d'une alimentation contaminée par la toxine est faible voire nulle (Sypecka et al., 2004, Danicke et al., 2007b, Danicke et al., 2002a, Doll et al., 2003, Seeling et al., 2005, Kleinova et al., 2002).

Le foie est le plus exposé en raison de la forte recirculation entéro-hépatique de la ZEN et de ses métabolites (Danicke et al., 2002b, Danicke et al., 2007a, Goyarts et al., 2007b). Toutefois, en négligeant certains facteurs pouvant influencer le facteur de transfert (temps d'exposition, espèce, ...), il est possible d'estimer qu'un homme de 70 kg devrait consommer entre 4 et 56 kg par jour des divers produits animaux pour seulement s'approcher de la limite sanitaire de consommation. C'est pourquoi, et compte tenu du fait que la consommation d'aliments contaminés d'origine végétale n'a pas cette dilution via l'animal, il s'avère que la contribution des résidus de la ZEN dans les produits animaux est négligeable dans l'exposition totale du consommateur à la ZEN. Ceci n'est pas le cas aux Etats Unis d'Amérique et au Canada, où un dérivé de la ZEN, le Zeranol (RalGro®), est utilisé comme anabolisant du bétail (interdit de l'union européenne depuis 1985). En effet, dans ce régions, l'apport de la viande dans la contamination humaine par la ZEN n'est pas négligeable voire assez important (Bandera et al., 2011, EFSA, 2011).

Tableau 5. Les teneurs maximales fixées pour la zéaralénone par la commission de régulation N° 1881/2006. D'après EFSA (2011).

Denrées alimentaires	Teneurs maximales (µg/kg)
Céréales brutes autres que le maïs	100
Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être traité par mouture humide	350
Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales, son et germe comme produit final destinés à la consommation humaine directe, à l'exception des aliments figurant ci-dessous	75
Huile de maïs raffinée	400
Pain (y compris produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner, à l'exclusion des collations et des céréales pour petit déjeuner à base de maïs	50
Maïs destiné à la consommation humaine directe, céréales pour petit déjeuner à base de maïs et de collations à base de maïs	100
Aliments transformés à base de céréales (à l'exception traitée à base de maïs) et les aliments pour nourrissons et jeunes enfants	20
Aliments transformés à base de maïs destinées aux nourrissons et jeunes enfants	20
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est > 500 µm (relevant du code NC 1103 13 ou 1103 20 40) et autres produits de mouture de maïs dont la taille des particules est > 500 µm et qui ne sont pas destinés à la consommation humaine directe (relevant du code NC 1904 10)	200
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est < 500 µm (relevant du code NC 1102 20) et autres produits de mouture de maïs dont la taille des particules est < 500 µm et qui ne sont pas destinés à la consommation humaine directe (relevant du code NC 1904 10 10)	300

V. Réglementation

En 2000, le Comité International Mixte United Nations Food and Agriculture Organization (FAO)/OMS d'experts sur les additifs alimentaires (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) établit pour la ZEN une dose journalière tolérable maximale provisoire (pDJMT) de 0.5 µg/kg de poids corporel, basée sur la dose sans effet (No Observed Effect Level, NOEL) évaluée chez l'espèce la plus sensible, le porc. La même année, le Comité Scientifique de l'Alimentation (Scientific Committee on Food, SCF) établit une dose journalière admissible temporaire (t-DJA) de 0.2 µg/kg de poids corporel, basée sur une étude à court terme chez le porc (Minervini and Dell'Aquila, 2008). Cette DJA a été désignée comme temporaire et inclut un facteur d'incertitude supplémentaire en raison du manque de données toxicologiques (par exemple, la question d'une plus grande sensibilité des porcs prépubères par rapport aux adultes soulevée par de nouvelles données de l'étude de Bauer et al. (1987)).

Les données toxico-dynamiques actuelles montrent qu'il est probable que la femme n'est pas plus sensible à la ZEN et ses métabolites que la femelle du porc. Pour le calcul de la DJA, il n'est donc pas nécessaire d'inclure un facteur d'incertitude de 2,5 pour les différences toxicodynamiques entre le porc et l'homme. En utilisant le NOEL de 10 µg/kg de poids corporel par jour et un facteur d'incertitude de 40 (4 pour les différences toxico-cinétiques inter-espèces et 10 pour la variabilité inter-humaine), une DJA de 0,25 µg/kg de poids corporel est ainsi obtenue. Comme un certain nombre d'études pertinentes, y compris chez le porc, sont devenues disponibles depuis que la précédente t-DJA a été établie par le SCF en 2000, c'est la DJA définitive de 0,25 µg/kg de poids corporel qui est maintenant en vigueur (EFSA, 2011).

La commission de régulation a également fixé des limites maximales pour la ZEN dans les aliments. Le Tableau 5 montre les limites fixées dans les aliments à base de céréales et les aliments destinés aux bébés, nourrissons et jeunes enfants.

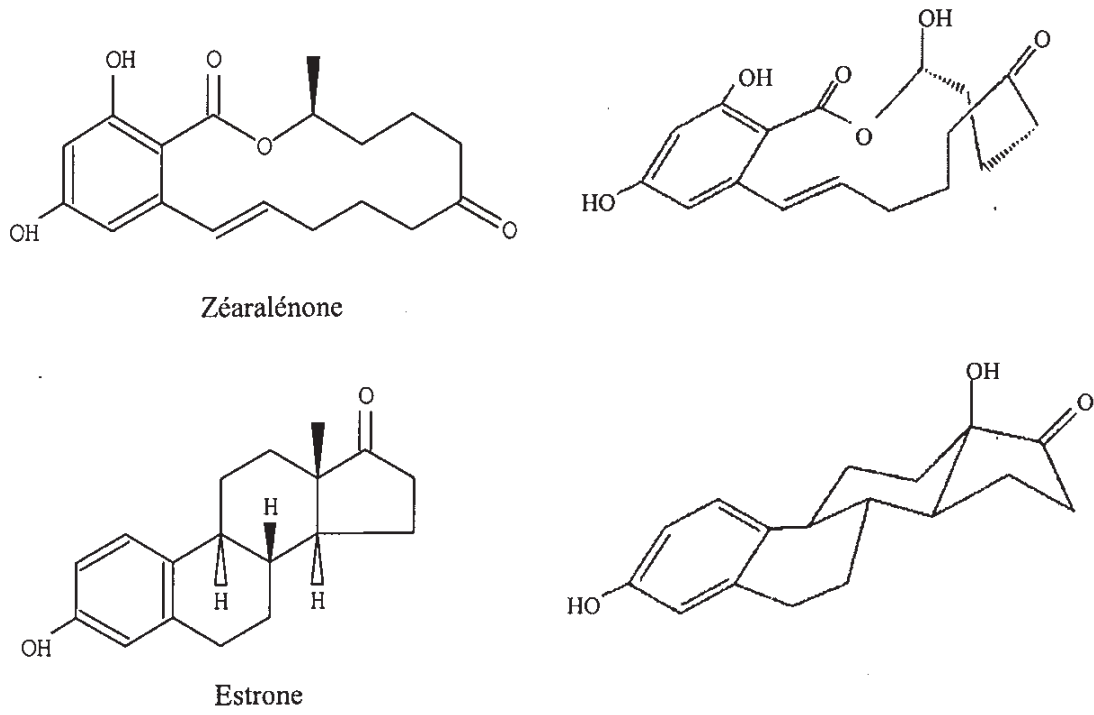


Figure 13. Comparaison des structures de la zéaralénone et de l'Estrone. D'après Gaumy et al. (2001).

VI. Toxicité de la zéaralénone

Le devenir de la ZEN dans l'organisme est caractérisé par l'importante hétérogénéité interspécifique de son métabolisme. L'activité de conjugaison domine quantitativement l'activité de réduction, pourtant c'est bien cette dernière qui l'emporte d'un point de vue toxicologique, puisqu'elle aboutit à la formation d'un composé (l' α -ZEL), biologiquement plus actif que la molécule mère. Dans les parties qui suivent seront abordés le mécanisme d'action et la toxicité de la ZEN et de ses dérivés.

VI.1. Mécanisme d'action de la zéaralénone et de ses dérivés

VI.1.1. Activité oestrogénique

La ZEN est un PE dont les effets sur le système endocrinien sont principalement liés à ses propriétés oestrogéniques. Des études *in vivo* et *in vitro* montrent que la ZEN et ses dérivés (α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL et β -ZAL) se fixent de façon compétitive aux récepteurs cytosoliques ESR1 et ESR2, et les activent au niveau des tissus riches en ces récepteurs comme l'utérus, les glandes mammaires, le foie et l'hypothalamus (Takemura et al., 2007, Zinedine et al., 2007). La structure de ces composés est suffisamment flexible pour leur permettre d'adopter une conformation qui leur permet d'occuper le site actif des ESRs comme les occupent les estrogènes naturels (Figure 13). L'E2 par exemple, n'a pas besoin de changer de conformation lors de sa fixation sur le site actif des ESRs contrairement à la ZEN et ses dérivés. C'est une des raisons pour lesquelles c'est un activateur des ESRs plus efficace (Shier et al., 2001, Takemura et al., 2007). Le groupement phénol est indispensable à l'activité de la ZEN et de ses dérivés. Le retrait des groupements phénols, ou leur blocage par méthylation, ont des répercussions sur la fixation aux ESRs et conduit à une forte diminution de leur activation (Gaumy et al., 2001, Takemura et al., 2007).

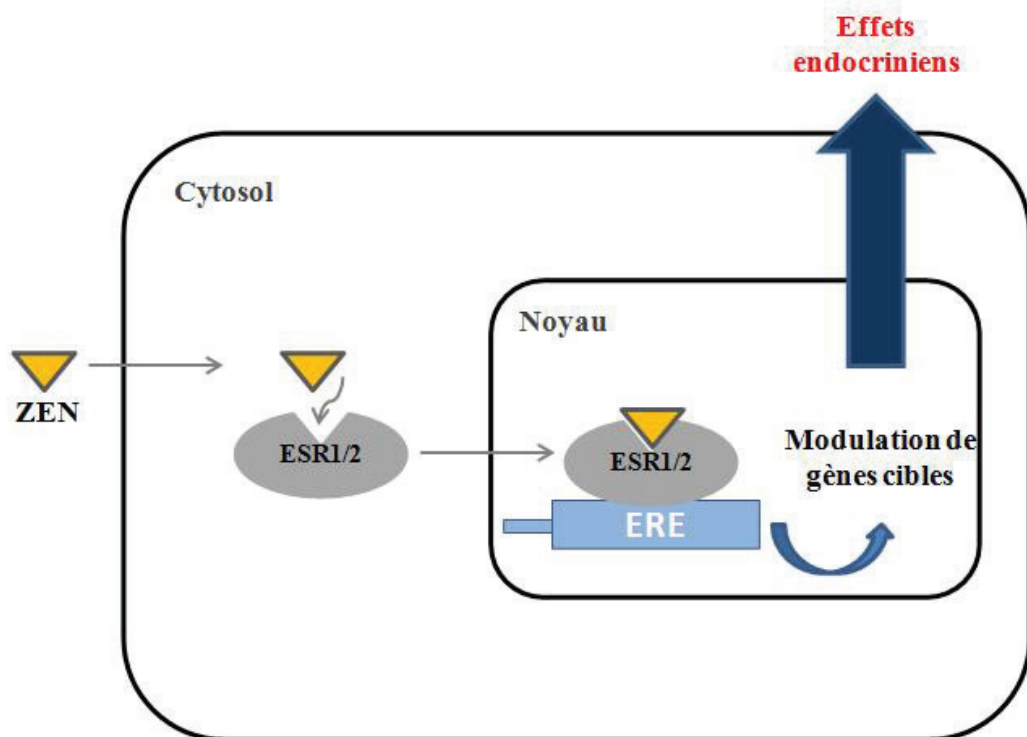


Figure 14. Mécanisme d'action de la zéaralénone. Après pénétration dans la cellule, la ZEN se fixe sur les récepteurs aux œstrogènes cytosoliques (ESR1 et ESR2). Le complexe ZEN-Récepteur formé est transloqué dans le noyau et se lie à des éléments de réponse aux œstrogènes de gènes cibles (ERE), modulant ainsi leur expression et provoquant l'apparition d'effets endocriniens.

La ZEN est un agoniste d'ESR1 et un agoniste partiel d'ESR2 (Kuiper-Goodman et al., 1987). Les stéréo-isomères diffèrent considérablement dans leur potentiel oestrogénique. En effet, Minervini et al. (2005) ont montré dans une étude *in vitro* réalisée sur les cellules MCF-7, que l' α -ZEL possède l'affinité la plus élevée (3 à 35% celle d'E2), suivi par la ZEN (1-10%). Le β -ZEL possède l'affinité la plus faible pour les ESRs (0.01%). L' α -ZEL est également environ sept fois plus actif que la ZEN dans l'essai utéro-trophique (Kuiper-Goodman et al., 1987). *In vivo*, l'activité de la ZEN par rapport à E2 sur des souris jeunes, est d'environ 0.001, alors que dans le test de kératinisation vaginale chez la souris, la ZEN a une activité de 0.0001 et de 0.1 celle de E2, après des administrations, sous-cutanée et topique respectivement (Kuiper-Goodman et al., 1987). La ZEN agit également comme un agoniste des ESRs dans le cerveau où elle augmente la densité des récepteurs progestatifs et l'adaptation comportementale à l'ovariectomie (Turcotte et al., 2005). En plus des différences liées à la stéréoisométrie, il existe également des différences inter-espèces dans les affinités de fixation aux ESRs. Ainsi, l'affinité relative de l' α -ZEL pour les ESRs chez le rat, le porc et la poule suit l'ordre suivant: porc > rat > poule (Metzler et al., 2010). Toutefois la découverte des récepteurs aux œstrogènes membranaires pourrait remettre en question la capacité de ces tests à prévoir l'activité oestrogénique d'un xénoestrogène. En effet, d'après ces tests le BPA posséderait un potentiel oestrogénique faible, or Alonso-Magdalena et al. (2012) montrent qu'avec les récepteurs membranaires aux œstrogènes, le BPA est aussi puissant que l'est l'E2.

La fixation de la ZEN et de ses dérivés sur les ESRs initie une séquence d'événements cellulaires comparable à celle qui précède une stimulation oestrogénique (Figure 14). Cette activation favorise la synthèse d'ARN, de protéines, ainsi que la prolifération cellulaire (Ahamed et al., 2001), augmentant ainsi la masse des organes (Heneweer et al., 2007). Cette dernière propriété a été exploitée via la production d'un dérivé réduit de la ZEN, le zéaralanol, 4 fois plus oestrogénique, produit commercialisé comme agent anabolisant d'élevages de bovins et d'ovins. Cependant, en raison de ses nombreux effets néfastes, son utilisation est interdite au sein de l'Union Européenne depuis 1989, mais reste autorisée dans d'autres régions du monde (Gaumy et al., 2001, Zinedine et al., 2007).

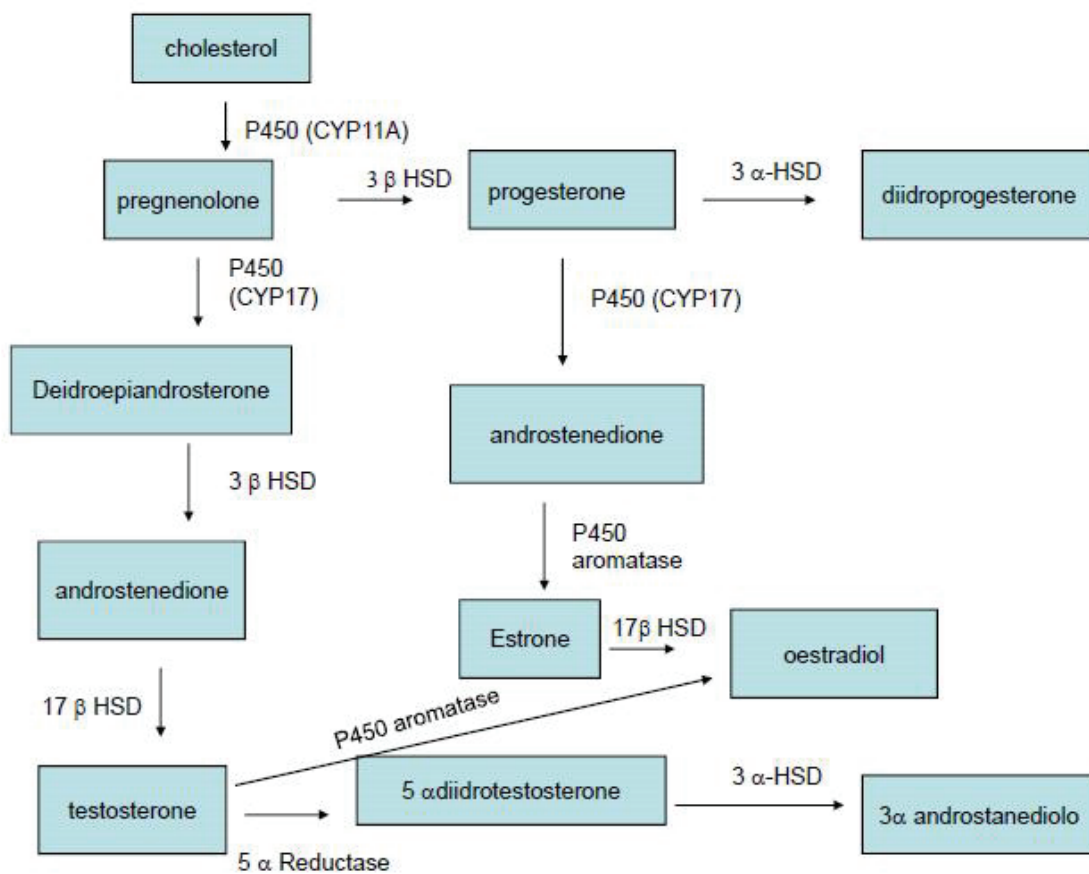


Figure 15. Voies biochimiques de synthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol. D'après (Minervini and Dell'Aquila, 2008).

VI.1.2. Interaction avec le métabolisme des hormones

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes gonadiques (progestérone, E2 et testostérone) font partie de deux classes majeures de protéines : les cytochromes P450 et les HSDs (Figure 15). Les enzymes HSDs sont présentes dans de nombreux tissus comme le foie, les reins, les testicules, la prostate, l'hypothalamus, la glande pituitaire, les ovaires et l'intestin, et jouent un rôle central dans la synthèse de nombreuses hormones comprenant l'E2 et la testostérone (Minervini and Dell'Aquila, 2008). La ZEN étant un substrat des 3 α et 3 β -HSDs, elle rentre en compétition avec les hormones stéroïdiennes pour leurs sites de fixation. Elle est ainsi capable d'interférer dans l'équilibre des stéroïdes actifs dans les tissus riches en récepteurs aux stéroïdes (Benzoni et al., 2008, Zinedine et al., 2007). Ce mécanisme d'action contribue au fait que la ZEN soit un PE.

VI.1.3. Effets sur les facteurs de transcription

Outre son action indirecte sur le métabolisme des hormones stéroïdiennes, la ZEN est également capable d'interférer indirectement dans le métabolisme d'un grand nombre de molécules endogènes et de xénobiotiques. En effet, de nombreuses études indiquent que la ZEN est capable d'activer PXR (Ayed-Boussema et al., 2011, Ding et al., 2006, Duca et al., 2012, Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007, Mnif et al., 2007). Or, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de molécules endogènes et de xénobiotiques, tels que le CYP3A4, les glutathion-S-transférases, les sulfotransférases et les UGTs est régulée par PXR (Ding et al., 2006). Dans les cultures primaires d'hépatocytes humains, la ZEN active, outre PXR, CAR et AhR. Ceci a pour conséquence d'activer certains gènes cibles de la phase I du métabolisme: principalement le CYP3A4, CYP2B6 et CYP1A1 et, dans une moindre mesure, les CYP3A5 et CYP2C9 (Ayed-Boussema et al., 2011). De plus, PXR joue un rôle dans la régulation des gènes codants pour les transporteurs d'anions organiques (OATPs) et pompes d'efflux ATP-binding cassette (ABC) (voir partie régulation de l'expression des transporteurs ABC page 78) (Kast et al., 2002, Maher et al., 2005a). Yu et al. (2004) mettent également en évidence un effet de la ZEN sur les niveaux d'expression des ARNm d'enzymes impliquées dans le métabolisme des œstrogènes (CYP1A1 et CYP1B1) dans les cellules MCF-7.

VI.1.4. Stress oxydant et mort cellulaire

Un certain nombre d'études montre que la ZEN est capable d'induire un stress oxydant qui semble jouer un rôle majeur dans la cytotoxicité provoquée par cette toxine. La ZEN et ses métabolites réduits induisent, *in vitro*, une perturbation du cycle cellulaire, une inhibition de la synthèse des protéines et de l'ADN (Hassen et al., 2005, Abid-Essefi et al., 2004, Gazzah et al., 2010), ainsi qu'une augmentation du malondialdéhyde (MDA) qui est un marqueur du stress oxydant (Abid-Essefi et al., 2004, Ferrer et al., 2009, Salah-Abbes et al., 2010b). Le potentiel oxydant de la ZEN est également confirmé par une étude réalisée sur les cellules C5-O (lignée de kératinocytes de souris Balb/c), où un antioxydant (le 4-(méthylthio)-3-isothiocyanate butényle) contrecarre la peroxydation lipidique induite par la ZEN (Salah-Abbes et al., 2010b). Toujours *in vitro*, la ZEN est également capable d'induire l'apoptose (Salah-Abbes et al., 2010b, Abid-Essefi et al., 2009, Gazzah et al., 2010) et une déstabilisation lysosomale (Kouadio et al., 2005). Les effets de la ZEN sur le stress oxydant et la mort cellulaire doivent encore être éclaircis en raison du manque de données *in vivo*, et de l'existence de résultats contradictoires dans lesquels la ZEN aurait plutôt un effet anti-apoptotique (Ahamed et al., 2001, Yu et al., 2005).

VI.2. Les différents niveaux de toxicité de la zéaralénone

VI.2.1. Toxicité aiguë

Après une administration par voie orale, la ZEN a une faible toxicité aiguë chez la souris, le rat et le cochon d'inde (Dose Létale 50 orale >2000 mg/kg de poids corporel) (Kuiper-Goodman et al., 1987, EFSA, 2011). L'administration orale d'une dose unique de 40mg/kg de poids corporel à des souris est responsable d'une infiltration lymphoïde du foie et d'une réduction des glomérules rénaux (Abbes et al., 2006). Elle est plus toxique par voie intra-péritonéale (Creppy, 2002, Kuiper-Goodman et al., 1987, Zinedine et al., 2007). L'administration d'une dose unique de ZEN par voie intra-péritonéale chez la ratte (1.5, 3 et 5 mg/kg de poids corporel) est à l'origine de perturbations hépatiques et hématologiques significatives (Maaroufi et al., 1996).

VI.2.2. Toxicité subaiguë et subchronique

Les études de toxicité orale allant jusqu'à 90 jours, montrent des modifications dans les paramètres hématologiques, des perturbations hépatiques et des effets oestrogéniques chez les rongeurs ayant reçu d'importantes doses orales de ZEN (Forsell et al., 1986, Underhill et al., 1995, NTP, 1982, EFSA, 2011). Le porc et le mouton semblent être plus sensibles que les rongeurs. Ainsi, chez le porc, la dose sans effet (No Observed Effect Level, NOEL) est de 40µg/kg/jour alors qu'elle est de 100µg/kg chez le rat (Creppy, 2002, Kuiper-Goodman et al., 1987, Zinedine et al., 2007, Jiang et al., 2010).

VI.2.3. Toxicité chronique et carcinogénicité

Les études de toxicité chronique et de carcinogénicité de la ZEN confirment ses effets oestrogéniques chez les rongeurs (NTP, 1982, Becci et al., 1982, EFSA, 2011). Cependant, ces études ne fournissent pas de preuves évidentes de l'activité cancérigène de la ZEN chez les animaux de laboratoire. En effet, des souris B6C3F1 qui ont reçu une alimentation contaminée par la ZEN à des doses de 0, 50 et 100 mg/kg d'aliment, pendant 103 semaines, présentent des adénocarcinomes hépato-cellulaires (8, 6 et 14% chez les mâles, et 0, 4 et 14 % chez les femelles) avec une augmentation statistiquement significative dans le groupe des femelles aux fortes doses (Creppy, 2002, Zinedine et al., 2007, NTP, 1982), mais aucun effet n'est rapporté chez le rat (Becci et al., 1982, NTP, 1982). Il est également à noter que ces tumeurs sont observées uniquement à des doses largement supérieures à celles qui provoquent des effets hormonaux. Ceci suggère que ces tumeurs sont la conséquence des effets oestrogéniques de cette mycotoxine. La ZEN et ses dérivés sont classés dans le groupe 3 par le centre international de recherche sur le cancer (International Agency for Research on Cancer, l'IARC), en raison du manque de données sur son potentiel cancérigène (Creppy, 2002, EFSA, 2011).

VI.2.4. Génotoxicité

La ZEN n'est pas mutagène (test d'Ames sur *Salmonella typhimurium* négatif) (Kuiper-Goodman et al., 1987), mais est décrite comme étant un agent clastogène dans une variété de systèmes cellulaires comme les cellules ovariennes de hamster chinois (Chinese Hamster Ovary cells, CHO) (Galloway et al., 1987), les cellules pulmonaires de hamster V79 (Thust et al., 1983), les cellules rénales de singe Vero (Ouanes et al., 2003, Othmen et al., 2008), et les lymphocytes bovins (EFSA, 2011, Lioi et al., 2004). Elle est par exemple responsable chez les cellules CHO d'échanges entre chromatides sœurs, d'aberrations chromosomiques et d'une polyploïdie. *In vivo*, le potentiel cytogénétique de la ZEN est également confirmé. En effet, elle induit la formation de micronoyaux dans les cellules de la moelle osseuse de souris après administration orale de 10-40 mg/kg de poids corporel/jour (Ouanes et al., 2003), et des aberrations chromosomiques chez la souris après administration intra-péritonéale (Ouanes et al., 2005), ainsi que chez le rat (Creppy, 2002, Gaumy et al., 2001, Zinedine et al., 2007).

La ZEN est aussi responsable de la formation d'adduits à l'ADN au niveau rénal et hépatique chez des souris traitées par voie intra-péritonéale ou orale (Benzoni et al., 2008, Zinedine et al., 2007, Othmen et al., 2008, Pfohl-Leszkowicz et al., 1995, Grosse et al., 1997), mais l'interprétation de ces données est entravée par l'absence d'identification de la structure des adduits. Toutefois, des données récentes (Pfeiffer et al., 2009) montrent la formation de catéchols de la ZEN. Or ces catéchols peuvent former des adduits à l'ADN et sont décrits par Cavalieri and Rogan (2010) comme étant en lien avec la carcinogenèse de l'œstradiol. Ce mécanisme pourrait être pertinent concernant la génotoxicité de la ZEN, mais il existe actuellement trop peu de données pour évaluer l'importance de son implication dans la clastogénicité de la ZEN. D'autre part, l'opposition aux effets génotoxiques de la ZEN par les antioxydants est en faveur d'un mécanisme lié au stress oxydant (EFSA, 2011).

VI.2.5. Immunotoxicité

De nombreuses études montrent les effets immunotoxiques de la ZEN dans des modèles *in vitro*. La ZEN est ainsi capable d'inhiber de 50 % la prolifération de lymphocytes périphériques humains et de rat (Atkinson and Miller, 1984, Cooray, 1984, Forsell and Pestka, 1985) et d'induire la production des interleukines 2 et 5 par les lymphocytes T en culture (Marin et al., 1996). La ZEN inhibe également la prolifération des cellules mononuclées du sang périphérique humaines et porcines et des neutrophiles porcins et réduit la production de cytokines et d'anticorps (IgG, IgA et IgM) (Berek et al., 2001, Vlata et al., 2006, Marin et al., 2010, Marin et al., 2011). Dans certaines de ces études, la ZEN semble moins immunotoxique que ses métabolites réduits α et β -ZEL (Marin et al., 2010, EFSA, 2011). Les études réalisées *in vivo* chez la souris ne montrent pas d'immunotoxicité de la ZEN lorsque celle-ci est administrée par voie orale ou sous cutanée (Forsell et al., 1986, Pung et al., 1984, Pestka et al., 1987), à l'exception de deux études où l'exposition de souris à des doses fortes de ZEN (40-80 mg/kg pc par jour) est responsable d'une diminution significative des lymphocytes et de la production de cytokines et d'anticorps. (Ben Salah-Abbes et al., 2008, Salah-Abbes et al., 2010a).

Le porc est considéré comme l'espèce animale la plus sensible à la ZEN et ses métabolites (EFSA, 2011). Pourtant, seules quelques études d'immuno-modulation ont été réalisées chez cette espèce (Luongo et al., 2008, Marin et al., 2011, Marin et al., 2010, Rotter et al., 1994).

Tableau 6. Effet de la zéaralénone sur l'appareil reproducteur des truies.

Truies prépubères			
Etude	Animaux	Exposition	Observations
Green et al., 1990	48 truies 178 j	10 mg/kg aliment (env. 250 µg/kg/j) 15 j avt mise à reproduction	Pas d'effet sur puberté 0 effet sur reproduction ↘ LH
Edwards et al., 1987	85 truies 145-193 j	10 mg/kg aliment (env. 250 µg/kg/j) 30 j	Tuméfaction vulve, retard puberté 10 j 0 effet sur reproduction
Rainey et al., 1990	60 truies > 70 j	1,5-2 mg/kg aliment (env. 30 µg/kg/j) 45 ou 90 j	Tuméfaction vulve, puberté avancée 0 effet sur reproduction ↘ LH

Truies cyclées			
Etude	Animaux	Exposition	Observations
Edwards et al., 1987	99 truies 5-20 j du cycle	0, 1, 5, 10 mg/kg aliment (0, 40, 200, 400 µg/kg/j)	Allongement interoestrus 32j
Etienne et Jemmali, 1982	27 truies après puberté	4 mg/kg aliment	45% des truies en anoestrus 50 j CJ persistent, oedème utérin

Truies gravides			
Etude	Exposition	Observation	
Etienne et Jemmali, 1982	3,6-4,3 mg/kg aliment pdt la gestation	↘ Poids de l'utérus et du conceptus (26%)	
Long et Diekman, 1984	0, 5, 15, 30, 60, 90 mg/kg aliment J2-J15 gestation	J40: Mortalité embryonnaire, momification fœtale (doses 60 et 90 mg/kg) utérus non modifié	
Long et al., 1982	7,38-64 mg/kg aliment J3-J34 gestation	↘ Nombre de fœtus J38 et J43: maintien du CJ	
Diekman et Long, 1989 Long et al., 1992	1 mg/kg aliment J7-J10 gestation	Dégénérescence des blastocytes (J11-J13 gestation) Dégénérescence embryonnaire	

CJ corps jaune; LH Hormone lutéïnisante

VI.2.6. Toxicité sur la reproduction

La ZEN est un PE dont les principaux effets toxiques résultent de son mécanisme d'action et concernent donc essentiellement le système reproducteur. Le porc et le mouton semblent être plus sensibles que les rongeurs (EFSA, 2011).

Les effets de la ZEN chez les femelles d'animaux de laboratoire (souris, rats, cobayes et lapins), illustrent son activité oestrogénique (Kuiper-Goodman et al., 1987, Zinedine et al., 2007, Kanora and Maes, 2009, Golinski et al., 2010). Ses effets comprennent : une diminution de la fertilité (Zinedine et al., 2007), des altérations de l'appareil reproducteur et des glandes mammaires (Nikaido et al., 2004, Heneweer et al., 2007, Nikaido et al., 2003, Jefferson et al., 2002, Belli et al., 2010), l'augmentation des résorptions fœto-embryonnaires, une réduction de la taille des portées (Collins et al., 2006, Zinedine et al., 2007), des modifications du poids des glandes surrénales, de la thyroïde et de l'hypophyse et des perturbations des taux sériques de progestérone et de l'E2 (EFSA, 2011, Zinedine et al., 2007). La ZEN n'est par contre pas tératogène chez les rongeurs (EFSA, 2011).

De nombreuses études montrent que le porc est l'espèce la plus sensible. La ZEN est ainsi responsable chez les femelles d'anomalies de l'appareil reproducteur (Palyusik et al., 1990, EFSA, 2011, Oliver et al., 2010) et de signes d'hyperoestrogénisme (Obremski et al., 2003b), tels que le gonflement et l'épaississement du vagin et de la vulve quelques jours seulement après le début de l'exposition (Rainey et al., 1990). L'hypertrophie utérine (Obremski et al., 2003b) et des perturbations du cycle œstral (Edwards et al., 1987, Zwierzchowski et al., 2005, Etienne and Jemmali, 1982), de l'ovulation (Obremski et al., 2003a), de la conception, de l'implantation et de la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa, des ovocytes et des ovules fécondés sont également rapportées (Alm et al., 2002, Tiemann et al., 2003, EFSA, 2011, Chen et al., 2009, Jakimiuk et al., 2010, Ranzenigo et al., 2008). L'exposition à la ZEN durant la gestation entraîne une augmentation de la mortalité des embryons, une diminution du poids fœtal, une réduction de la taille des portées et une altération de la viabilité néonatale (Danicke et al., 2007a, Tiemann et al., 2008, EFSA, 2011, Long and Diekman, 1984, Long et al., 1982, Long et al., 1992, Diekman and Long, 1989). Un grand nombre de données suggèrent que les truies prépubères seraient plus sensibles que les truies sexuellement matures (Edwards et al., 1987, Obremski et al., 2003b, Zwierzchowski et al., 2005, Wasowicz et al., 2005, Doll et al., 2003, Gajecka et al., 2011, EFSA, 2011, Bauer et al., 1987, Etienne and Jemmali, 1982, Rainey et al., 1990, Green et al., 1990) (Tableau 6).

C'est d'ailleurs sur la base de ces études que la DJT-t de 0.2 µg/kg pc et la DJT définitive de 0.25 µg/kg ont été établies.

La ZEN et ses métabolites réduits ont également des effets chez le mâle mais à des doses plus élevées que celles produisant des effets chez les femelles (EFSA, 2011). Chez les rongeurs et d'autres espèces comme le cheval, la ZEN est responsable d'anomalies de la sécrétion hormonale (testostérone, hormone chorio-gonadotrophique, ...), de la baisse de la production et de la qualité du sperme ainsi que de la fertilité (Yang et al., 2007a, Yang et al., 2007b, Ben Salah-Abbes et al., 2009, Abou Nazel and El-Shanawany, 2007, Minervini et al., 2010, Filannino et al., 2011). Elle est également responsable d'atrophie et d'anomalies histologiques du testicule (Kim et al., 2003, Ben Salah-Abbes et al., 2009). L'effet protecteur des antioxydants sur ces perturbations chez les rongeurs est en faveur d'un mécanisme en lien avec la production d'espèces réactives de l'oxygène (Ben Salah-Abbes et al., 2009, EFSA, 2011).

Comme pour les femelles, les porcs mâles sont également plus sensibles à la ZEN que les autres espèces. Des effets sur le taux de testostérone, le comportement sexuel, le poids et l'histologie des testicules et des organes sexuels secondaires, et sur la spermatogenèse sont rapportés (Tsakmakidis et al., 2006, Tsakmakidis et al., 2007, Tsakmakidis et al., 2008, Diekman and Green, 1992). Toutefois, et comme chez les rongeurs, les porcs mâles sont moins sensibles que les femelles aux effets de la ZEN sur la reproduction (Sutkeviciene et al., 2009, EFSA, 2011).

Aucun effet tératogène lié à la ZEN n'a été rapporté à ce jour (Collins et al., 2006, Zinedine et al., 2007, EFSA, 2011). Il existe peu d'éléments concernant les effets d'une exposition à long terme, et sur les effets transgénérationnels liés à l'exposition de la mère durant la gestation (EFSA, 2011). Seules quelques études rapportent des effets multigénérationnels de la ZEN. En effet, deux études montrent une anomalie de développement des glandes mammaires chez les femelles exposées *in utero* et en période néonatale (Nikaido et al., 2004, Belli et al., 2010, Schoevers et al., 2012). Une récente étude montre également une réduction de la quantité de follicules sains chez des truies nouvellement nées et prépubères issues de mères exposées pendant la gestation et l'allaitement à la ZEN. Les auteurs suggèrent que cet effet peut conduire à l'épuisement prématuré des ovocytes à l'âge adulte (Schoevers et al., 2012).

Chez l'homme, quelques études suggèrent une relation entre l'exposition à la ZEN et l'apparition d'une puberté centrale précoce chez les jeunes filles (Massart et al., 2008, Pazaiti et al., 2012) et d'adénocarcinomes endométriaux chez les femmes (Gajecki et al., 2004, Tomaszewski et al., 1998). Au New Jersey, une étude réalisée sur 163 petites filles (9-10 ans) montre la présence de la ZEN et de ses dérivés dans l'urine de 78.5% des filles. Ces dernières ont tendance à être de plus petite taille et à ne pas avoir atteint le début du développement mammaire. Les auteurs suggèrent que la ZEN aurait un effet anti-oestrogénique semblable à celui décrit pour les isoflavones (Bandera et al., 2011). Dans une autre étude récente, le métabolite α -ZEL a été retrouvé dans tous les échantillons utérins provenant de femmes (66-76 ans) souffrant de cancers endométriaux. Dans cette étude, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les teneurs en α -ZEL et le stade clinique du cancer. La consistance de la tumeur et la teneur en α -ZEL ont cependant été corrélés. Plus le tissu est compact moins il est imprégné du métabolite (Gadzala-Kopciuch et al., 2011).

L'hypothèse selon laquelle la ZEN présente dans les aliments puisse contribuer à l'accroissement de la survenue du cancer du sein est discutée mais manque de données scientifiques. Dans des études réalisées *in vitro*, la ZEN stimule la prolifération des cellules de la lignée cancéreuse mammaire humaine MCF-7 exprimant les ESRs humains. Ce test constitue la base des essais qui sont largement utilisés pour détecter l'activité oestrogénique des xénobiotiques (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007).

En résumé, les observations chez l'homme ne lient pas de façon certaine l'exposition à la ZEN via l'alimentation aux perturbations oestrogéniques. Toutefois, il est nécessaire de souligner que la presque totalité des ces études tente de mettre en évidence une corrélation entre les effets et les teneurs en ZEN. Or les PE peuvent produire leurs effets à des doses très faibles qui sont potentiellement indétectables avec les techniques de dosages. De plus, compte tenu de l'importance de la fenêtre d'exposition et du temps de latence entre le moment où a lieu l'exposition et le moment où les perturbations se manifestent, il est possible que les effets potentiellement imputés à la ZEN se manifestent alors même que la toxine n'est plus détectable chez les individus testés.

**Chapitre 3. LES TRANSPORTEURS ABC: DES
PROTEINES QUI VOUS VEULENT DU BIEN!**

Les transporteurs ABC forment une super famille de protéines transmembranaires responsables du transport actif d'une grande variété de composés à travers les membranes biologiques (ions, phospholipides, peptides, stéroïdes, polysaccharides, acides aminés, médicaments et autres xénobiotiques) (Dean, 2009, Gutmann et al., 2010, Leslie et al., 2005). Le nom d'ABC pour ATP Binding Cassette, provient du fait que ces transporteurs nécessitent l'énergie fournie par l'hydrolyse de molécules d'ATP pour leur fonctionnement, et qu'ils possèdent un motif hautement conservé de fixation de l'ATP. Chez l'homme, il existe 49 gènes codant pour ces transporteurs, organisés en sept sous-familles de A à G (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>). Parmi ces transporteurs, certains sont particulièrement spécialisés dans le transport de xénobiotiques et sont impliqués dans la «multidrug résistance». C'est à cette catégorie de transporteurs ABC que nous nous sommes intéressés dans ce travail.

L'implication de ces pompes d'efflux dans l'élimination de substances exogènes est décrite pour la première fois dans des phénomènes de chimiorésistance à des anticancéreux. ABCB1/MDR1/P-glycoprotéine (P-gp) est le premier de ces transporteurs à être identifié dans les années 1970 dans des cellules ovariennes résistantes à divers agents anticancéreux (actinomycine D, méthotrexate, danomycine et colchicine) (Ling and Thompson, 1974, Juliano and Ling, 1976, Riordan and Ling, 1979). Un deuxième transporteur responsable d'une nouvelle forme de chimiorésistance multiple qui n'implique pas la P-gp est identifié en 1987. Il s'agit d'une Multidrug resistance Related Protein (MRP/ABCC) MRP1/ABCC1 (Mirski et al., 1987, McGrath and Center, 1987). Ensuite d'autres membres de cette même sous-famille sont décrits comme le transporteur MRP2/ABCC2, MRP3/ABCC3, MRP4/ABCC4 et MRP5/ABCC5 (Cole et al., 1992, Paulusma et al., 1996, Allikmets et al., 1996, Kool et al., 1997). Enfin, la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) codée par le gène *ABCG2* est découverte pour la première fois dans une lignée de cellules issue d'un carcinome mammaire (MCF-7) résistante à la doxorubicine (Doyle et al., 1998).

Outre leur rôle dans la résistance aux médicaments, ABCB1, ABCC1-5 et ABCG2 s'expriment dans les tissus sains (non cancéreux), où ils sont majoritairement impliqués dans l'efflux de xénobiotiques et de molécules endogènes. Au sein de ces tissus, ils semblent jouer un rôle primordial dans la protection de l'organisme contre l'accumulation de leurs substrats et la toxicité qui en résulte (Leslie et al., 2005). Les parties qui suivent traitent de la structure, la localisation, la fonction, les substrats, le mécanisme d'action et la régulation de ces transporteurs.

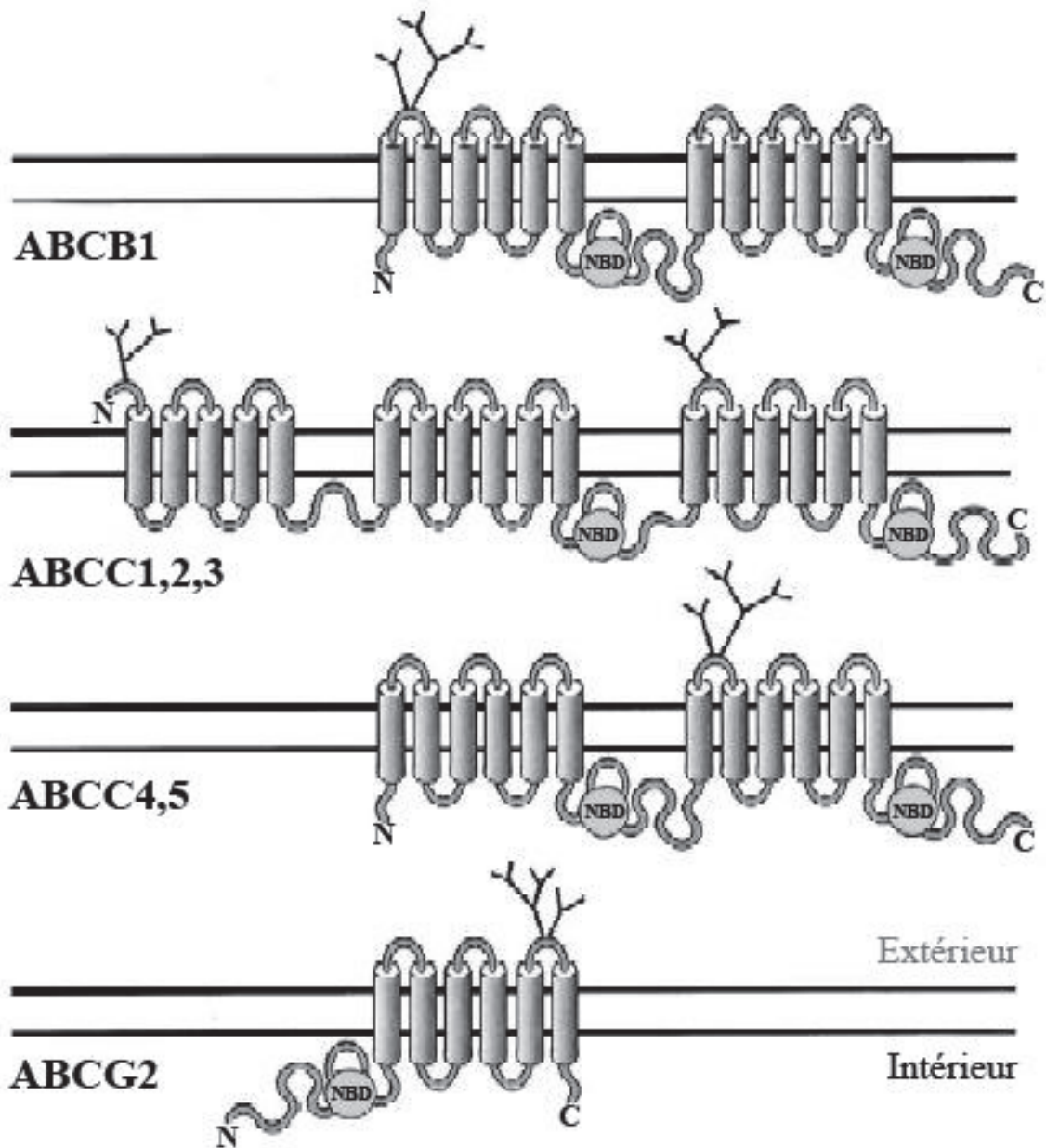


Figure 16. Structure des transporteurs ABC. D'après Schinkel and Jonker (2003).

I. Structure

La structure générale des transporteurs ABC comprend, le plus souvent, deux domaines transmembranaires (TMD, TransMembranaire Domain) composés chacun de 6 segments transmembranaires et deux domaines de fixation aux nucléotides (NBD, Nucleotide Binding Domain) (Leslie et al., 2005). Selon leur structure, les transporteurs ABC peuvent être classés en 4 groupes (Figure 16). Le premier groupe (celui d'ABCB1) est organisée en deux monomères de taille identique comprenant chacun 6 segments transmembranaires (TMD) et un domaine de fixation à l'ATP (NBD). La première boucle extracellulaire de ce groupe est fortement N-glycosylée. La même architecture globale est retrouvée dans le groupe comprenant ABCC4 et ABCC5, sauf que la N-glycosylation est située dans la 4^{ème} boucle extracellulaire. ABCC1, ABCC2 et ABCC3 appartiennent au 3^{ème} groupe qui a la même structure de base qu'ABCC4 et ABCC5, avec un domaine transmembranaire supplémentaire composé de 5 segments et situé dans l'extrémité N-terminale. L'extrémité N-terminale se retrouve donc dans la face extracellulaire. Le dernier groupe est représenté par ABCG2 qui est considéré comme un héli-transporteur, puisque qu'il n'est constitué que d'un seul TMD et d'un seul NBD. Toutefois, il fonctionne sous la forme d'un dimère, car ce n'est que sous cette forme que les transporteurs ABC sont fonctionnels (Schinkel and Jonker, 2003). Le domaine ATP Binding Cassette est un motif hautement conservé parmi les transporteurs ABC (identité de séquence de 30 à 50%) (Choudhuri and Klaassen, 2006), et constitue une structure caractéristique de cette famille de protéines. En effet, il existe deux motifs situés à 100-200 acides aminés (AA) de chaque NBD, nommés Walker A et Walker B, et dont les séquences sont très conservées parmi les membres de cette famille (Leslie et al., 2005, Linton and Higgins, 2007, Seeger and van Veen, 2009, Linton, 2007). Le résidu lysine du motif Walker A est impliqué dans la liaison du phosphate β de l'ATP, alors que le résidu acide aspartique du motif Walker B interagit avec le Mg^{2+} (Leslie et al., 2005). En plus de ces deux motifs, il existe une troisième séquence qui est également hautement conservée, située entre les motifs Walker A et Walker B, appelée le motif signature ABC ou motif C. Le rôle de ce motif semble concerner la reconnaissance, la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Leslie et al., 2005). Dans une configuration dite en sandwich, le motif C d'un NBD se trouve face au Walker A de l'autre NBD. Un résidu serine dans chaque motif C semble nécessaire à cette configuration, et pourrait être responsable de l'interaction avec le phosphate γ de l'ATP (Leslie et al., 2005).

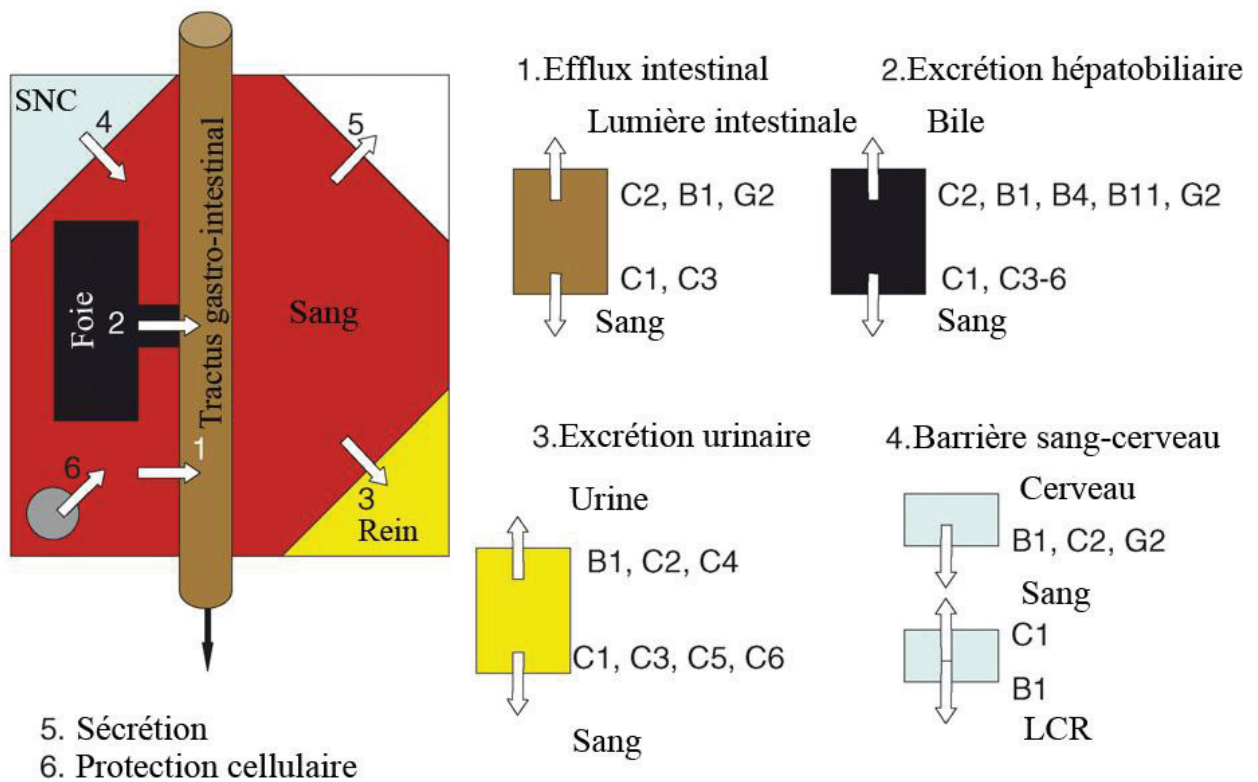


Figure 17. Les transporteurs ABC déterminent l'absorption, la distribution, l'accumulation cellulaire, et l'excrétion de leurs substrats. D'après Szakacs et al. (2008).

II. Localisation et fonctions

Toutes les pompes d'efflux abordées dans cette thèse sont principalement situées dans la membrane plasmique d'où elles expulsent une variété de molécules en dehors des cellules contre un gradient de concentration. Leur distribution tissulaire et leur localisation cellulaire influencent donc l'absorption, la distribution, l'accumulation cellulaire, l'excrétion, et de ce fait la toxicité d'une grande variété de substrats. Les transporteurs ABC ont une localisation basolatérale ou apicale au niveau des cellules épithéliales constitutives des barrières physiologiques (barrière digestive, barrière hémato-encéphalique (BHE), ...). Ces deux localisations leur permettent de jouer un rôle important dans la détermination des paramètres pharmacocinétiques de leurs substrats (Figure 17). Au niveau de l'épithélium intestinal, les transporteurs ABC apicaux expulsent leurs substrats vers la lumière gastro-intestinale, tandis que les transporteurs ABC basolatéraux favorisent le passage de leurs substrats dans le compartiment sanguin (1). Les xénobiotiques qui échappent à cette «première ligne de défense» atteignent ainsi le foie par le système porte où ils seront éventuellement métabolisés puis excrétés dans la bile (2). L'excrétion biliaire des xénobiotiques peut être considérée comme un «deuxième mécanisme de défense», assuré par le même type de transporteurs, faisant repasser ces substrats vers la lumière gastro-intestinale (circulation entéro-hépatique). Les xénobiotiques qui atteignent la circulation systémique peuvent être ensuite éliminés au niveau rénal grâce aux nombreuses pompes d'efflux présentes dans les reins (3). Les transporteurs ABC présents au niveau des barrières comme la BHE ou la barrière sang-liquide céphalorachidien (LCR) (4), et au niveau des membranes cellulaires (membranes des lymphocytes CD4+ et traitement anti VIH), préviennent l'accumulation de leurs substrats dans ces organes et cellules (6). La sécrétion des xénobiotiques dans des compartiments spécifiques (tels que le lait (5)) est également régulée par les transporteurs ABC (Szakacs et al., 2008).

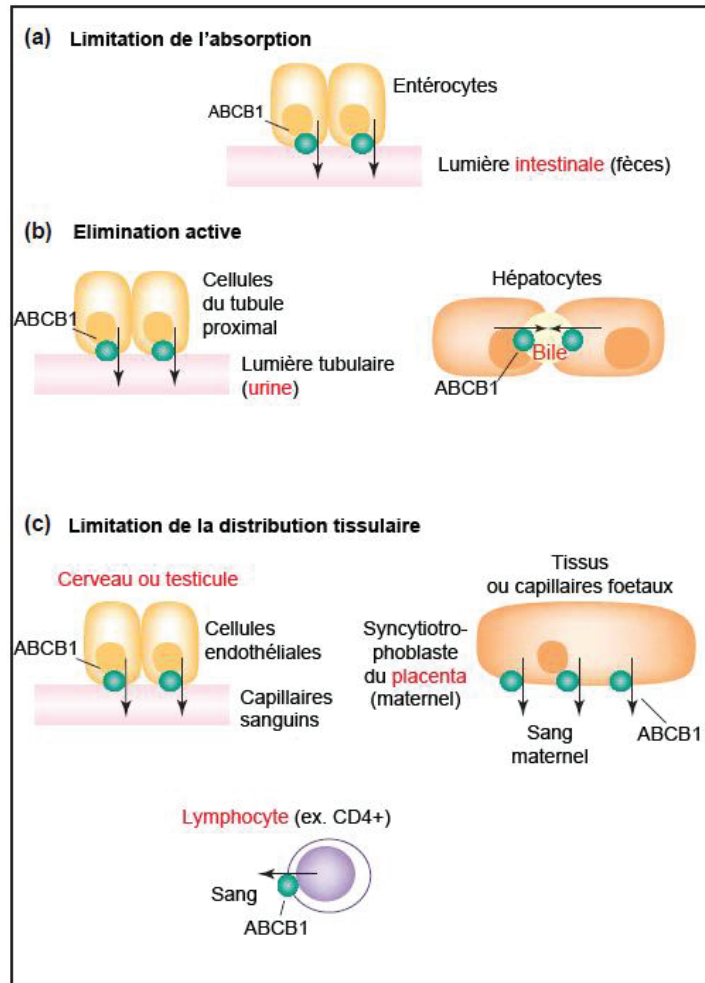


Figure 18. Expression et fonction d'ABCB1 dans différents tissus. D'après Fromm (2004).

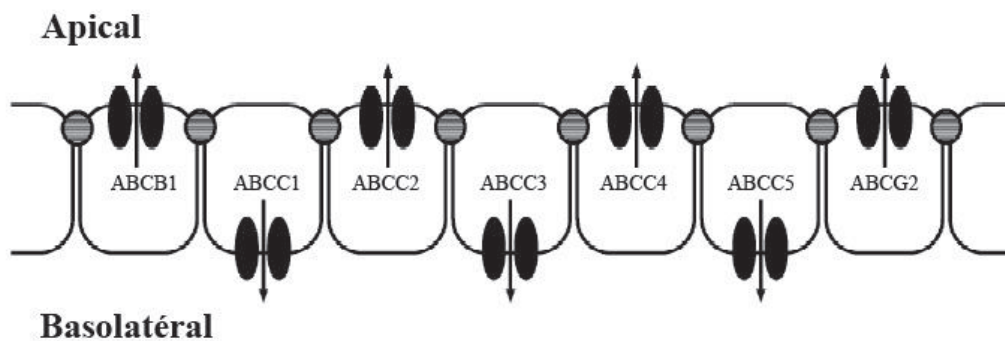


Figure 19. Localisation subcellulaire des transporteurs ABC dans les cellules épithéliales polarisées rénales. D'après Schinkel and Jonker (2003).

De façon générale, les transporteurs ABC sont présents dans de nombreux organes et s'expriment à des niveaux différents en fonction du tissu et de l'espèce. ABCC1 et ABCC3 s'expriment dans la plupart des tissus au pôle basolatéral des cellules épithéliales. ABCC2, ABCG2 et ABCB1 ont une distribution tissulaire plus restreinte. Ces transporteurs ont une localisation apicale et se situent essentiellement au niveau des barrières de l'organisme comme la BHE, le placenta, le foie, l'intestin, et les reins (Leslie et al., 2005). ABCC4 et ABCC5 ont quant à eux une localisation apicale dans certains tissus, et une localisation basolatérale dans d'autres (Szakacs et al., 2008).

II.1. ABCB1/MDR1/P-gp

Chez l'homme, ABCB1 est présente au niveau des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal, où son expression augmente progressivement du duodénum jusqu'au colon (Leslie et al., 2005). Au niveau de la muqueuse intestinale, elle contribue à la sécrétion directe de ses substrats dans la lumière intestinale et donc à la diminution de l'absorption des substances ingérées (Ayrton and Morgan, 2001, Kusuhara and Sugiyama, 2002). De par sa fonction d'efflux, ABCB1 influence ainsi directement la biodisponibilité de ses substrats, ce qui a été démontré pour les médicaments (Ayrton and Morgan, 2001, Sparreboom et al., 1997, Beaumont et al., 2000, Drescher et al., 2003, Westphal et al., 2000). Ce transporteur est également abondamment exprimé dans les membranes des canalicules biliaires au niveau hépatique (Thiebaut et al., 1987). Les fonctions d'ABCB1 au niveau intestinal et hépatique montrent son important rôle excrétoire (Schinkel and Jonker, 2003). La Figure 18 montre l'expression et la fonction d'ABCB1 dans ces divers tissus.

Cette fonction de protection a lieu également au sein d'autres organes. Ainsi, ABCB1 s'exprime au niveau de l'épithélium respiratoire, ainsi que dans les membranes plasmiques des macrophages alvéolaires, où elle expulse les composés environnementaux dans la lumière des poumons (Leslie et al., 2005). Elle est également retrouvée au niveau des cellules épithéliales des tubules proximaux, où elle est responsable de l'efflux des xénobiotiques hydrophobes du sang vers l'urine et de ce fait de leur élimination (Leslie et al., 2005, Schinkel and Jonker, 2003, Johnstone et al., 2000) (Figure 19). ABCB1 joue un rôle primordial dans la BHE, où elle s'exprime au niveau des plexus choroïdes, des astrocytes, de la microglie et de l'endothélium capillaire, et prévient ainsi l'accumulation des toxines au niveau du système nerveux (Leslie et al., 2005, Dallas et al., 2006, Ito et al., 2005).

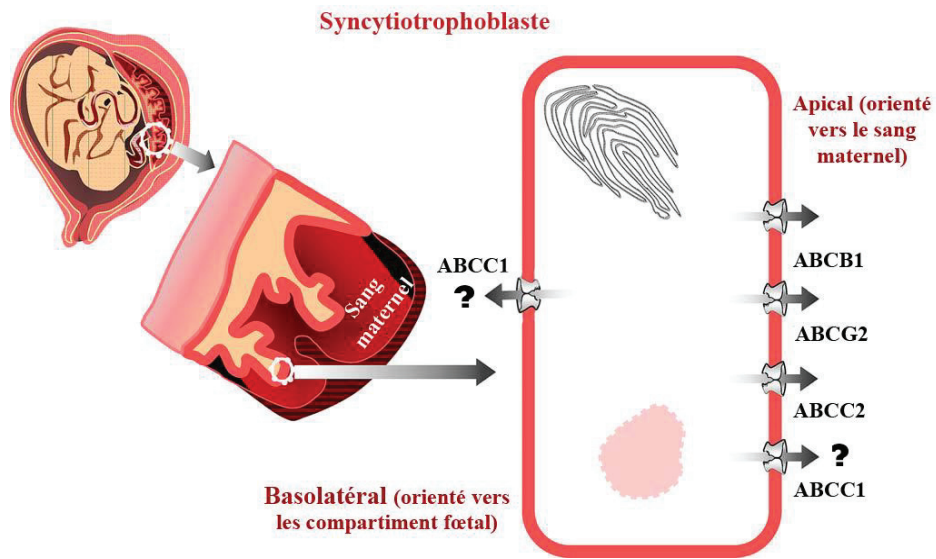


Figure 20. Localisation des transporteurs ABC dans le placenta. D'après Mao (2008) avec modifications.

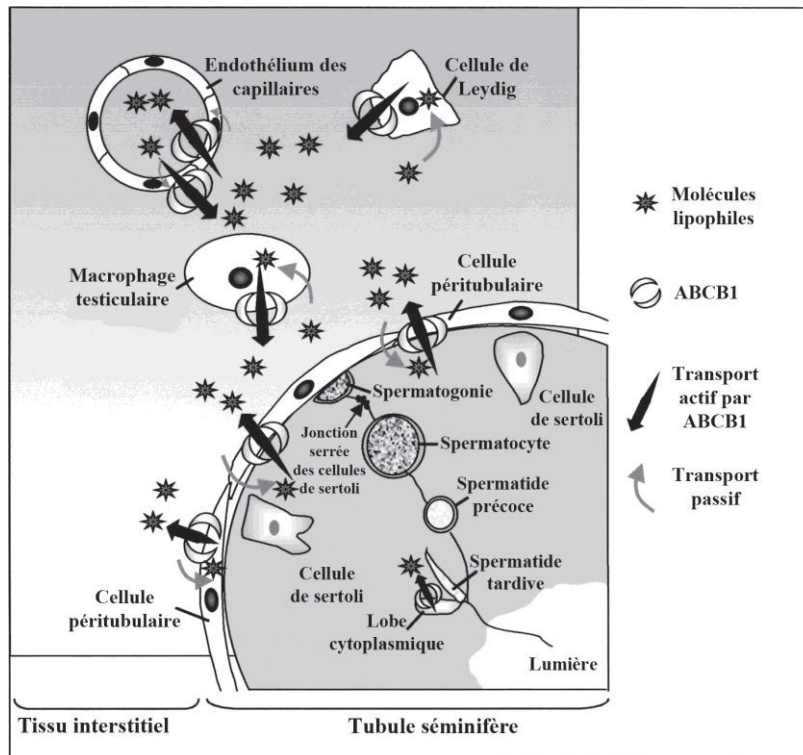


Figure 21. Localisation d'ABCB1 dans le testicule. D'après Melaine (2002).

ABCB1 est également présente dans l'épithélium sécrétoire de l'utérus (Axiotis et al., 1991a, Axiotis et al., 1991b, van Kalken et al., 1993), et au niveau du pôle apical du syncytiotrophoblaste où cette protéine interviendrait dans l'efflux de ses substrats vers le sang maternel et dans la protection du fœtus en permettant l'efflux des xénobiotiques vers le compartiment maternel (Mao, 2008) (Figure 20).

ABCB1 est fortement exprimée au niveau des cellules endothéliales des capillaires testiculaires, elle est également présente au niveau des cellules de Leydig, des macrophages testiculaires, et des cellules de Sertoli (Figure 21). Elle intervient dans la protection des cellules somatiques contre la toxicité des xénobiotiques (Leslie et al., 2005, Melaine, 2002).

D'autres études montrent également son expression au niveau du cœur, plus précisément au niveau des cellules endothéliales des capillaires et des artérioles. L'expression d'ABCB1 au niveau cardiaque pourrait être un facteur important dans la modulation des concentrations des médicaments pris en charge par ce transporteur comme les beta bloquants, les glycosides cardiaques ou la doxorubicine (Solbach et al., 2006, Meissner et al., 2002, Lazarowski et al., 2005).

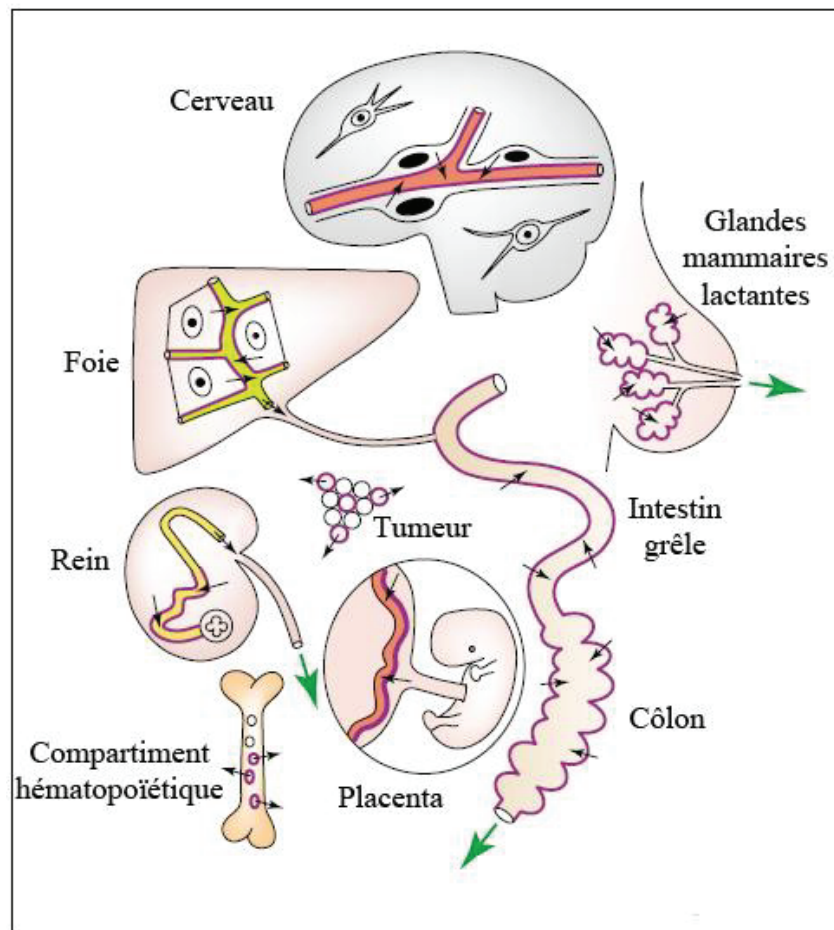


Figure 22. Distribution tissulaire d'ABCG2. La présence d'ABCG2 est indiquée par la couleur violette. Les flèches noires indiquent la direction de l'efflux des substrats alors que les flèches vertes indiquent l'excrétion nette du corps. D'après van Herwaarden and Schinkel (2006).

II.2. ABCG2/BCRP

La Figure 22 résume la localisation tissulaire d'ABCG2. Chez l'homme, ce transporteur est fortement exprimé au niveau de la bordure en brosse du syncytiotrophoblaste où ce transporteur intervient dans la protection du fœtus en permettant l'efflux des xénobiotiques vers le compartiment maternel (Leslie et al., 2005, Mao, 2008, Robey et al., 2009). Contrairement à son rôle protecteur vis-à-vis du fœtus au niveau placentaire, ABCG2 semble concentrer ses substrats dans le lait au niveau des glandes mammaires, augmentant ainsi le risque d'exposition du nouveau-né à ces molécules. Son expression est augmentée dans la glande mammaire en phase de lactation chez la souris, la vache et la femme (Alcorn et al., 2002, Robey et al., 2009). Au niveau des testicules, ABCG2 protège les cellules germinales des agents génotoxiques mutagènes, puisque des taux élevés de cette protéine sont retrouvés au niveau des cellules de Sertoli (Leslie et al., 2005, Robey et al., 2009, Jones and Cyr, 2011, Lassalle et al., 2004, Maliepaard et al., 2001, Scharenberg et al., 2009). La protéine est également retrouvée au niveau des spermatides rondes et allongées, des cellules myoïdes périvitubulaires, et des cellules endothéliales des micro-vaisseaux au niveau de l'intersticium (Bart et al., 2004).

ABCG2 s'exprime fortement au niveau du tractus gastro-intestinal. Chez l'homme son expression est très élevée au niveau du duodénum, puis diminue tout au long du tractus depuis l'ileum terminal jusqu'au rectum, où le plus faible taux d'expression est retrouvé (Robey et al., 2009). Comme ABCB1, cette pompe d'efflux est retrouvée au niveau des canalicules biliaires au niveau hépatique (Maliepaard et al., 2001). L'expression d'ABCG2 au niveau du tractus gastro-intestinal suggère qu'elle joue un rôle dans la limitation de l'absorption orale de ses substrats (Robey et al., 2009). ABCG2 n'est pas détectée dans les érythrocytes, leucocytes et plaquettes humains, mais Zhou et al. (2001) et Scharenberg et al. (2002) montrent que cette protéine est massivement présente dans les cellules souches hématopoïétiques chez la souris et l'homme. Quelques études montrent qu'ABCG2 est également exprimée au niveau cardiaque (Solbach et al., 2006).

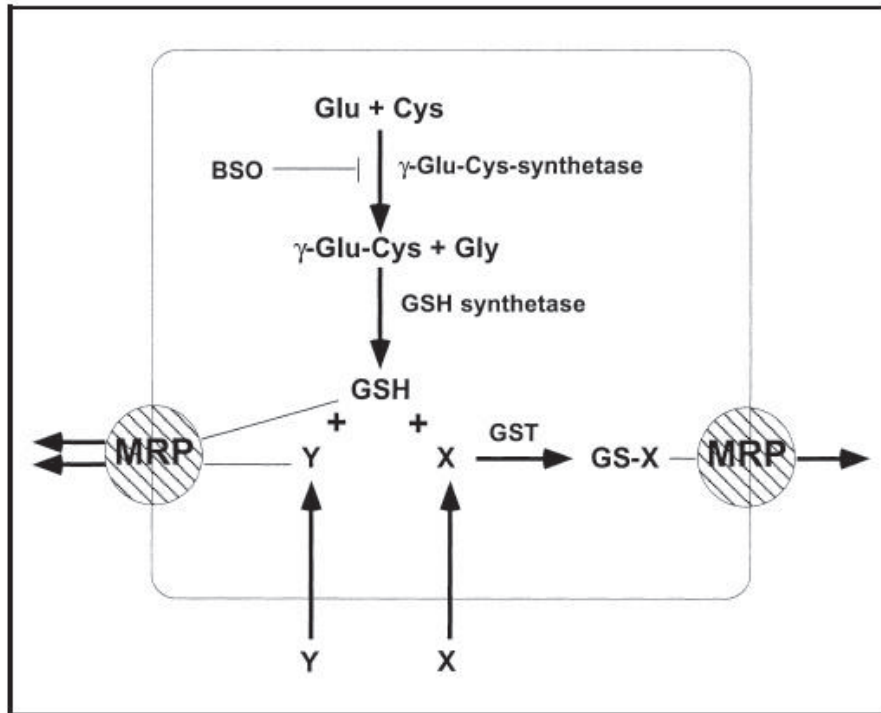


Figure 23. Modèle d'interrelation entre les transporteurs ABCCs/MRPs et le glutathion réduit (GSH). D'après Borst et al. (2000).

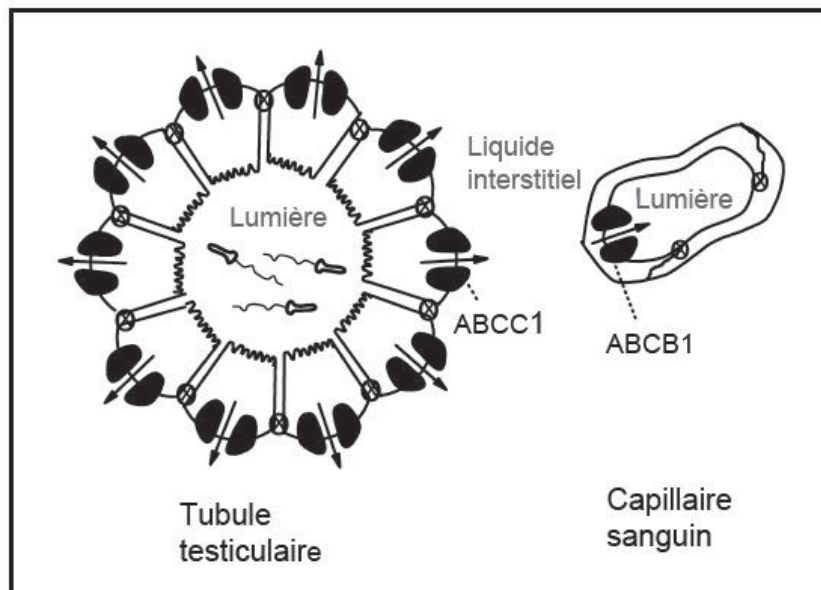


Figure 24. Localisation schématique d'ABCB1 et d'ABCC1 dans la barrière hémato-testiculaire. D'après Borst et al. (2000).

II.3. ABCCs/MRPs

Les transporteurs de la sous famille ABCC ont en commun un mode d'action en lien avec le glutathion réduit (GSH) (Figure 23). En effet, certains de leurs substrats (symbolisés par X dans la Figure 23) sont pris en charge sous forme conjuguée au glutathion par l'intermédiaire des Glutathion S-transférases. Le transport d'autres molécules non conjuguées (symbolisées par Y dans la Figure 23) par les MRPs est, lui, couplé à celui du GSH. C'est le cas des anions organiques qui représentent une large partie des composés pris en charge par les ABCCs. Dans les deux cas, le transport des substrats est dépendant d'une production continue du GSH puisqu'il est bloqué par l'inhibiteur de la gamma-glutamylcystéine synthétase (DL-buthionine (S, R)-sulfoximine, BSO). Il faut également noter que certains substrats des ABCCs peuvent également être des molécules sulfo ou glucuronoconjuguées (Borst et al., 2000).

II.3.1. ABCC1/MRP1

Chez l'homme, ABCC1 s'exprime dans un grand nombre de tissus et se localise au niveau du pôle basolatéral des cellules épithéliales (Borst et al., 1999, Borst et al., 2000, Cole et al., 1992), sauf dans les cellules endothéliales du cerveau où sa localisation est apicale (Szakacs et al., 2008). Son niveau d'expression est relativement élevé dans les poumons, les testicules et les reins (Leslie et al., 2005). Son expression est particulièrement importante au niveau des cellules de Sertoli où ce transporteur semble jouer un rôle primordial dans la protection des cellules germinales (Figure 24) (Su et al., 2011, Vahakangas and Myllynen, 2009, Borst et al., 2000). Cette protéine est également présente au niveau de la BHE et de l'intestin. Au niveau intestinal, elle participe au transport de ses substrats vers la circulation portale (Leslie et al., 2005). Au niveau de la BHE, elle transporte les xénobiotiques du LCR vers le sang, et empêche ainsi leur pénétration dans le LCR. MRP1 est présente au niveau du placenta mais sa localisation apicale ou basolatérale est discutée (Figure 20) (Behravan and Piquette-Miller, 2007, Enders and Blankenship, 1999, Leazer and Klaassen, 2003, Leslie et al., 2005, St-Pierre et al., 2004). Une étude rapporte également sa localisation au niveau de l'utérus (Matsumoto et al., 2007) (Figure 25).

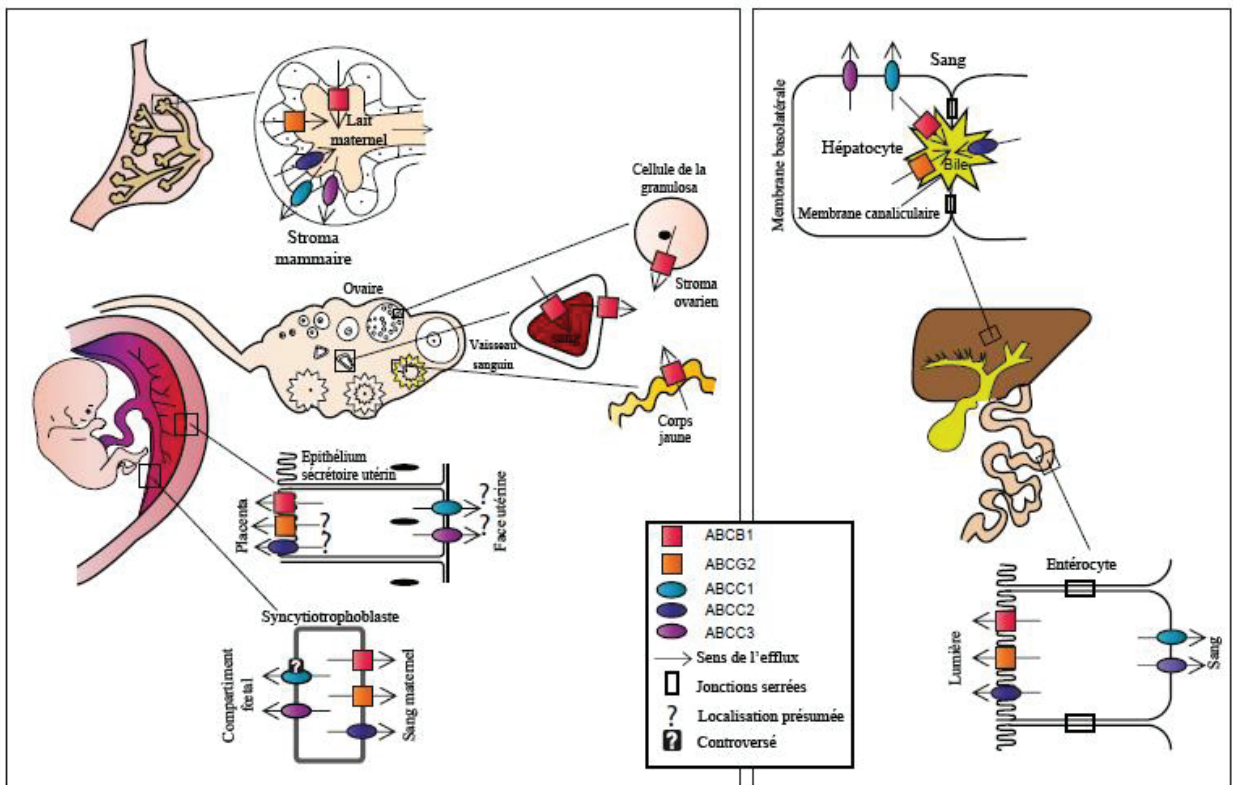


Figure 25. Localisation des transporteurs ABC. D'après Koraichi et al. (2012).

II.3.2. ABCC2/MRP2

ABCC2 est la seule protéine de la sous famille ABCC à avoir une localisation apicale. Elle ne semble pas s'exprimer dans les poumons (Leslie et al., 2005). Au niveau du tractus gastro-intestinal, son expression est plus élevée dans le duodénum, puis diminue progressivement jusqu'à devenir indétectable au niveau de l'iléum terminal et du colon (Leslie et al., 2005). Au niveau des cellules épithéliales des tubules proximaux, ABCC2 est responsable de l'élimination urinaire des substrats conjugués (au glutathion, glucuronide, et sulfate) (Leslie et al., 2005) (Figure 19). Elle s'exprime aussi dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, et s'exprime fortement au niveau du syncytiotrophoblaste des villosités terminales, prévenant le passage des métabolites conjugués des xénobiotiques et des molécules endogènes de la mère vers la circulation fœtale (Leslie et al., 2005). Comme pour ABCC1, une localisation au niveau de l'utérus est également rapportée (Matsumoto et al., 2007).

II.3.3. ABCC3/MRP3

ABCC3 est beaucoup moins bien étudiée qu'ABCC1 et ABCC2. De plus, la plupart des études sont réalisées chez l'homme et le rat. Comparé à ABCC1, ABCC3 a une localisation tissulaire plus restreinte (Borst et al., 2007). Cette protéine est localisée au niveau du foie, de l'intestin grêle, du colon, la glande surrénale, et dans une moindre mesure dans le pancréas et les reins (Figure 19) (Kiuchi et al., 1998, Kool et al., 1997, Kool et al., 1999, Scheffer et al., 2002). Dans le foie, ABCC3 est faiblement exprimée dans la membrane basolatérale des hépatocytes et dans les canalicules biliaires (Konig et al., 1999b, Scheffer et al., 2002, Kool et al., 1997, Ortiz et al., 1999). ABCC3 est également présente dans la membrane basolatérale de la vésicule biliaire (Rost et al., 2001). D'après Schinkel et al. (2003), ABCC3 jouerait un rôle dans la circulation cholé-hépatique et entéro-hépatique des acides biliaires (Schinkel and Jonker, 2003). Une étude rapporte également sa localisation au niveau de la prostate (Uchiumi et al., 1998), et une autre sa présence comme pour ABCC1 et ABCC2 au niveau de l'utérus (Matsumoto et al., 2007).

II.3.4. ABCC4/MRP4

Le gène codant pour ABCC4 est identifié en 1996 (Allikmets et al., 1996). L'expression de cette protéine était initialement décrite comme étant restreinte à quelques tissus (Kool et al., 1997). De nombreuses études montrent ensuite que ce transporteur est en fait largement distribué avec des niveaux d'expression des ARNm allant de très fort dans la prostate à indétectable dans le foie. (Lee et al., 1998b). Chez l'homme, les ARNm d'ABCC4 sont détectés dans la plupart des tissus à l'exception de la moelle osseuse, du col utérin, du thymus, de l'endothélium vasculaire, et des tissus mous (Borst et al., 2007). D'autres études chez l'homme, localisent la protéine dans le rein (van Aabel et al., 2002), le foie (Rius et al., 2003), les érythrocytes (Klokouzas et al., 2003), la glande surrénale (Zelcer et al., 2003), les plaquettes (Jedlitschky et al., 2000), le cerveau (Nies et al., 2004) et le pancréas (Keppler and Konig, 2000). Chez le rat et la souris, ABCC4 est également retrouvée dans de nombreux tissus avec en particulier une forte expression au niveau rénal (Chen and Klaassen, 2004, Leggas et al., 2004, Maher et al., 2005b). Quelques études montrent également qu'ABCC4 est présent dans le testicule humain et murin. La protéine est en particulier retrouvée au niveau des cellules de Sertoli où elle aurait un rôle dans la protection de la lignée germinale (Ritter et al., 2005, Robillard et al., 2012).

Une caractéristique de cette pompe d'efflux est la dualité de sa localisation dans les cellules polarisées. En effet, ABCC4 peut être apicale ou basolatérale en fonction du type cellulaire. Lee et al. (1998) montrent que MRP4 est située au pôle basolatéral des cellules tubuloacinaires de la prostate humaine (Lee et al., 1998a), alors qu'elle est localisée dans la face apicale des tubules proximaux du rein (Smeets et al., 2004, van Aabel et al., 2002). La protéine est également apicale dans les hépatocytes humains, de rat et de souris (Rius et al., 2003), ainsi que dans l'épithélium pancréatique (Konig et al., 2005). Dans le cerveau humain et murin, ABCC4 se retrouve au pôle basolatéral de l'épithélium des plexus choroïdes et sur la face apicale de l'endothélium capillaire (Chen and Klaassen, 2004, Leggas et al., 2004, Nies et al., 2004).

La localisation membranaire de MRP4 est donc cellule et tissu spécifique. Ceci lui permet d'effluer ses substrats dans le sang et l'urine, mais également vers les cellules adjacentes au niveau de la matrice extracellulaire ou du stroma (Borst et al., 2007).

II.3.5. ABCC5/MRP5

Ce transporteur d'anions organiques (Wijnholds et al., 2000) est exprimé dans les cellules rénales polarisées de chien MDCK-II au niveau basolatéral, et impliqué dans le transport du S-glutathionyl 2,4-dinitrobenzène (GS-DNP) et de GSH (pour revue Schinkel and Jonker (2003)). Cependant l'exacte localisation de MRP5 reste encore à définir correctement (Schinkel and Jonker, 2003, Borst et al., 2007). Il semblerait qu'elle ait une répartition ubiquitaire. En effet, Kool et al. (1997) montrent que son ARNm est détecté dans la plupart des tissus testés. Une forte expression est retrouvée dans le cerveau et le muscle squelettique (McAleer et al., 1999), et une expression dans la membrane des érythrocytes est également rapportée (Jedlitschky et al., 2000). Deux études plus récentes montrent que MRP5 s'exprime dans les cardiomyocytes, de l'endothélium cardiovasculaire et des cellules musculaires lisses du cœur humain (Dazert et al., 2003, Solbach et al., 2006). Une autre étude montre que cette protéine est également présente dans les cellules musculaires lisses du tractus urogénital masculin (corps caverneux, uretère, urètre, vessie), et dans les cellules épithéliales de la muqueuse de l'urètre et de l'uretère. Les auteurs suggèrent qu'elle jouerait un rôle dans le transport du nucléotide guanosine mono phosphate cyclique (cGMP) qui régule le tonus des muscles lisses et en particulier dans cette étude, l'érection (Nies et al., 2002). En 2005, Meyer Zu Schwabedissen et al. (2005a) mettent en évidence l'expression d'ABCC5 dans le pôle basal du syncytiotrophoblaste, et dans les vaisseaux fœtaux humains. De plus, ils montrent que son expression augmente avec la progression de la gestation. Ils suggèrent un rôle dans la transduction du signal et dans la différenciation placentaire.

De façon générale, l'expression d'ABCC5 dans les cellules musculaires et dans les endothéliums capillaire suggère, outre son rôle de défense, une implication dans les processus de signalisation physiologique via la prise en charge de messagers tels que le cGMP.

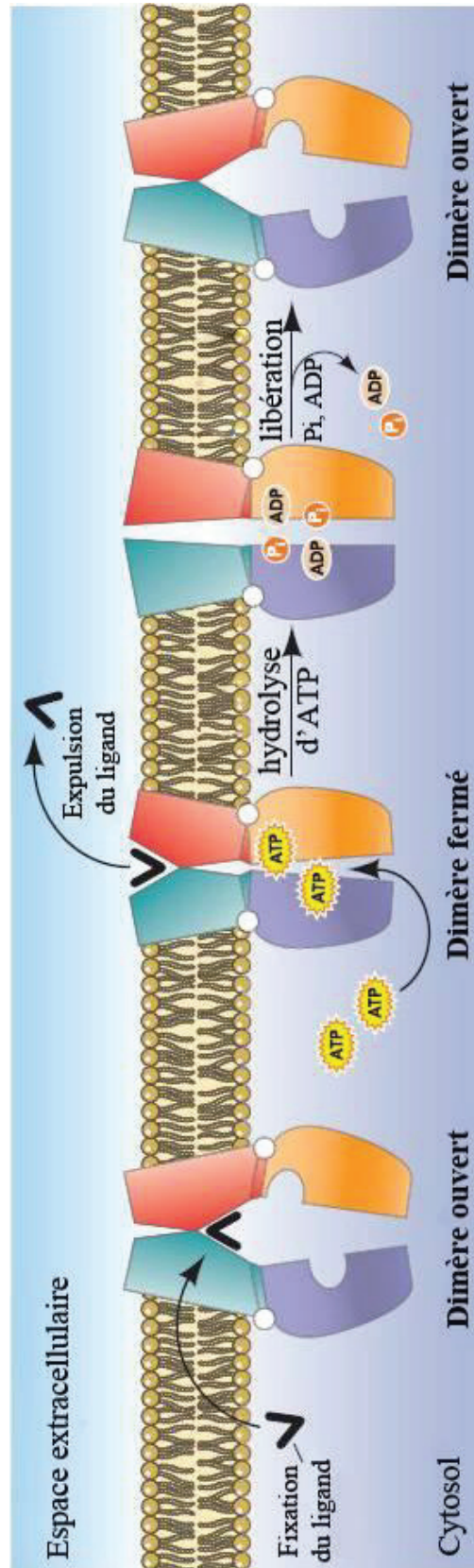


Figure 26. Le modèle «ATP Switch». D'après Linton (2007).

III. Mécanisme d'action

Une bonne compréhension de la manière dont les transporteurs ABC fonctionnent pour prendre en charge activement leurs substrats à travers les membranes phospholipidiques, a été un défi dès lors que la première séquence complète d'un transporteur ABC a été décryptée il y a environ 30 ans. Malgré un grand nombre d'études biochimiques, biophysiques et structurales, des questions fondamentales sur le couplage de l'hydrolyse de l'ATP et la translocation unidirectionnelle du substrat subsistent. Un certain nombre de modèles ont été proposés pour expliquer le mode de fonctionnement des transporteurs ABC. Dans ce travail, seront abordés les deux modèles les plus actuels: le modèle «Constant Contact» (George and Jones, 2012) et celui de «l'ATP Switch» (Linton and Higgins, 2007).

III.1. Le modèle «ATP Switch» (Figure 26)

Le modèle ATP Switch est également connu sous les noms de «Tweezers-Like» (pince à épiler) (Chen et al., 2003) et de «Processive Clam» (pince processive) (van der Does and Tampe, 2004) desquels il dérive. En fait, les trois modèles sont des variations d'un même principe mécanistique.

Le dimère des transporteurs ABC alterne entre un état de forte affinité et un état de faible affinité pour le substrat au niveau des deux faces de la membrane. Dans le mécanisme ATP-Switch (le plus populaire), ces deux états sont couplés au cycle catalytique de l'ATP, d'une façon qui est totalement compatible avec ce qui est connu actuellement sur la structure de ces transporteurs.

Le substrat pénètre dans la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire et se lie à une poche de haute affinité formée par les TMDs (en rouge et vert sur la Figure 26). Cette liaison induit un changement conformationnel des domaines NBDs (en bleu et orange sur la Figure 26), qui a pour conséquence une augmentation de l'affinité de ces derniers pour l'ATP. Deux molécules d'ATP vont se fixer sur les NBDs. L'énergie libérée par l'apparition de la forme fermée du dimère NBDs provoque un changement conformationnel des TMDs, et leur passage à la forme de faible affinité pour le substrat, et de ce fait l'expulsion de ce dernier dans l'espace extracellulaire.

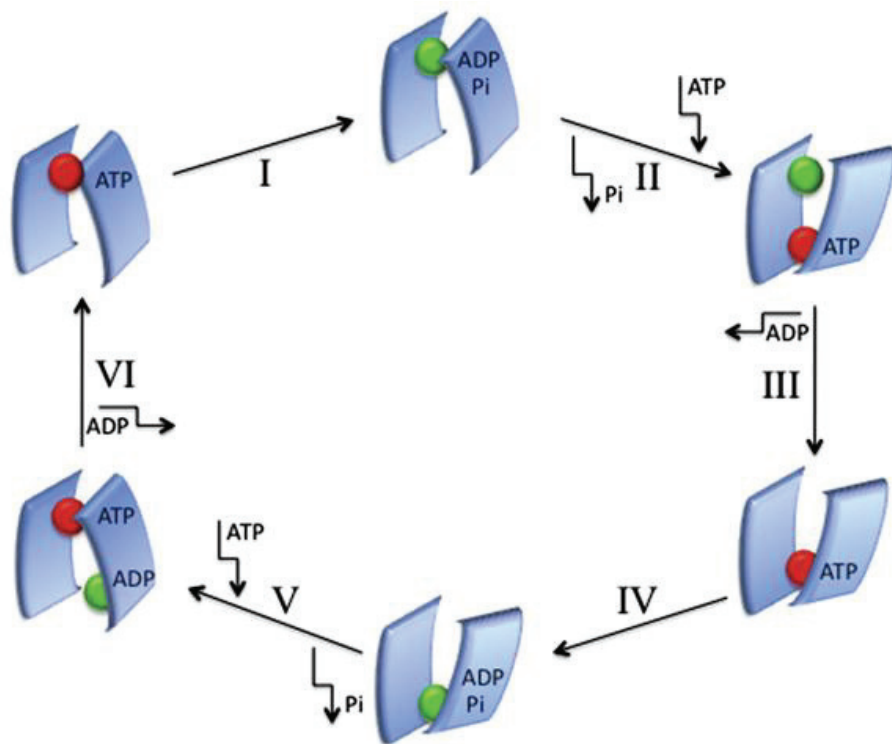


Figure 27. Le modèle «Constant Contact». D'après George and Jones (2012).

Ensuite, l'hydrolyse des ATP (conséquence inéluctable de la conformation fermée), déclenche la dissolution de la forme fermée du dimère NBD. Cela provoque une amplification du changement conformationnel des TMDs. Enfin la libération du phosphate inorganique (Pi), puis de l'ADP restaure la forme ouverte du dimère NBD, le rendant ainsi disponible pour un nouveau cycle (Linton, 2007, Linton and Higgins, 2007).

III.2. Le modèle «Constant Contact» (Figure 27)

Le modèle «Constant Contact» dérive d'anciens travaux de Senior et al (Senior et al., 1995, Senior and Bhagat, 1998). Le principe de ce mécanisme d'action repose sur l'alternance d'hydrolyse de l'ATP dans chaque NBD, avec une ouverture du site au moment de l'hydrolyse alors que le second site reste fermé avec de l'ATP fixé et enfermé. Un site s'ouvre suffisamment pour libérer le nucléotide sans que les monomères des NBDs n'aient à se séparer complètement, puis lorsque ce site se ferme et fixe une nouvelle molécule d'ATP, c'est le côté opposé qui amorce l'hydrolyse à son tour et le processus se répète en cycles alternés (George and Jones, 2012).

Pour chaque site catalytique, il y a deux états distincts, soit sous occlusion (fermé) ou ouvert (permettant l'échange de nucléotides), ou dans la situation où le site est vide, une affinité élevée ou faible pour le nucléotide. Les deux sites actifs fonctionnent à 180° en opposition de phase par rapport à ce cycle, et l'hydrolyse de l'ATP se produit en alternance entre les deux sites. Les deux NBD restent en contact pendant tout le cycle, avec l'ouverture et la fermeture de ces sites se produisant par l'intermédiaire de changements conformationnels de sous unités des monomères NBD. Dans l'étape I (Figure 27), le site actif de fixation de l'ATP est fermé alors que le site opposé est vide et l'hydrolyse de l'ATP se produit. À la deuxième étape (II), avec des produits d'hydrolyse encore liés au site actif fermé, le site, vide, et de faible affinité, passe à un statut de forte affinité, ce qui permet la liaison de l'ATP. À l'étape III, la liaison de l'ATP au site vide et la libération du phosphate inorganique (Pi) du site post-hydrolyse fermé favorise l'ouverture du site lié à d'ADP, la libération d'ADP et la fermeture du site ATP-dépendant. La phase IV représente l'étape de phase inverse à 180° (l'opposé de l'étape I) et la progression dans les étapes I, II et III se répète dans le site actif opposé au cours des étapes IV, V et VI. La libération de l'ADP dans la sixième étape complète le cycle.

Tableau 7. Exemples de substrats xénobiotiques et endogènes des transporteurs ABC.

Transporteurs	Substrats xénobiotiques	Substrats endogènes
ABCB1	Doxorubicine, mitoxantrone, étoposide, actinomycine D, méthotrexate, topotécan, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, cimétidine, colchicine, bupéramide, vérapamil, digoxine, dexaméthasone, corticostérone, ivermectine, rhodamine, aflatoxine B1	Corticostérone, aldostérone, cortisol, β amyloïde
ABCC1	Doxorubicine, vincristine, étoposide, cyclophosphamide, conjugués, aflatoxine B1	Glutathion, E2-glucuronide, acides biliaires sulfatés, bilirubine, conjugués du glutathion (leukotriène C4, prostaglandine A2..), acide folique, estrone-3-sulfate
ABCC2	Cisplatine, doxorubicine, topotécan, irinotécan, imatinib, vincristine, méthotrexate, étoposide, lopinavir, glucuronide du diclofénac, aflatoxine B1	Leukotriène C4, conjugués de la bilirubine, glutathion
ABCC3	Dinitrophényle S-glutathion, étoposide, glucuronide de l'acétamiphène, vincristine, ampicilline	Leucotriène C4, E2-glucuronide, cholate, glycocholate, taurocholate
ABCC4	6-Thio guanine, 6-mercaptopurine, topotécan, 9-2-(phosphonomethoxy)ethyl)-adénine (PMEA)	cGMP, cAMP, sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEAS), E2-glucuronide, prostaglandine E1, prostaglandine E2
ABCC5	6-Mercaptopurine, 6-thio guanine, PMEA, métaux lourds, (2,4-dinitrophenyl)-S-glutathion	cGMP, cAMP
ABCG2	Doxorubicine, mitoxantrone, topotécan, irinotécan, méthotrexate, lamivudine, azidothymidine, inhibiteurs de Topoisomérase I, rhodamine 123, hoechst 33342, génistéine	Estrone-3-sulfate, E2-glucuronide, phosphatidylserine, protoporphyrine IX

D'après Schinkel and Jonker (2003), Zhou et al. (2008), Lam et al. (2001) et Uhr et al. (2002).

IV. Les substrats des transporteurs ABC

Le transporteur ABCB1 est caractérisé par une faible spécificité de substrats. Il est en effet capable de transporter une large variété de composés, avec cependant une préférence pour les cations organiques et les composés amphiphiles. Le mode de fonctionnement des transporteurs ABC implique une première insertion du substrat dans la bicouche lipidique avant sa prise en charge par le transporteur, or seuls les molécules amphiphiles ont la capacité de s'insérer dans les membranes plasmiques (Schinkel and Jonker, 2003). Les substrats de la P-gp sont des molécules organiques dont la taille est comprise entre 200 et 1900 Da et possèdent un ou plusieurs groupements aromatiques. Toutefois ABCB1 est aussi capable de transporter des molécules linéaires, ou cycliques non aromatiques. La liste des substrats de ce transporteur s'allonge au fur et à mesure des études, elle comprend des anticancéreux, des antiviraux, des inhibiteurs des canaux calciques, des immunosuppresseurs et de nombreuses substances toxiques parmi lesquelles certaines mycotoxines comme la fumonisine B1 (Choudhuri and Klaassen, 2006, De Angelis et al., 2005, Schinkel and Jonker, 2003).

Comme pour ABCB1, la spécificité des substrats des ABCCs est relativement faible. De façon très générale, ABCC1, ABCC2 et ABCC4 transportent principalement des conjugués du glutathion comme les leucotriènes. ABCC2 et ABCC3 sont majoritairement impliquées dans le transport des glucuronides de la bilirubine (Akita et al., 2001). Les nucléotides adénosine mono phosphate cycliques (cAMP) et cGMP sont massivement pris en charge par ABCC4 et ABCC5 (Keppler, 2011).

Concernant ABCC1, la spécificité de substrat semble être similaire à celle d'ABCB1 (Tableau 7), Toutefois, de nombreux travaux montrent que les substrats préférentiels d'ABCC1 sont des anions organiques (Jedlitschky et al., 1994, Muller et al., 1994) comme les médicaments conjugués au GSH, à l'acide glucuronique ou sulfonique. (Hipfner et al., 1999, König et al., 1999a, Jedlitschky et al., 1996), alors qu'ABCB1 a une faible affinité pour ces composés chargés négativement. En effet, comme précédemment mentionné, ABCC1 est une pompe d'efflux des conjugués du glutathion (GSX), ce qui explique sa capacité à prendre en charge le méthotrexate (anion organique) ou l'arsénite (H₃AsO₃) (glutathion conjugué).

Il existe beaucoup de similitudes dans les spectres de substrats d'ABCC1 et ABCC2, mais ils ne sont tout de même pas identiques (Schinkel and Jonker, 2003).

Parmi les anticancéreux pris en charge par MRP2, il y a le méthotrexate, les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine), la mitoxantrone, la vincristine, la vinblastine, l'irinotécan et probablement aussi le cisplatine et l'étoposide (Borst et al., 2000, Hooijberg et al., 1999, Koike et al., 1997, Evers et al., 1998, Cui et al., 1999). Comme ABCC1, ABCC2 est aussi principalement un transporteur des anions organiques (Evers et al., 2000). Parmi les substrats bien connus d'ABCC2, il y a des xénobiotiques amphiphiles anioniques et des molécules endogènes conjugués au GSH, à l'acide glucuronique ou sulfonique comme le glucuronide de E2 par exemple (Konig et al., 1999a, Evers et al., 2000).

ABCC3 est également un transporteur d'anions organiques (Hirohashi et al., 1999, Kool et al., 1999), mais, contrairement à ABCC1 et ABCC2, il a une préférence pour les glucuronoconjugués par rapport aux conjugués du glutathion (Hirohashi et al., 1999). La fonction physiologique d'ABCC3 reste à établir. L'importante augmentation de l'expression d'ABCC3 dans le foie de rats cholestatiques (Hirohashi et al., 1999, Ortiz et al., 1999) et dans le foie humain (Konig et al., 1999a, Kool et al., 1999), suggère que ABCC3 peut prendre en charge les anions organiques du foie vers le sang lorsque la sécrétion dans la bile est bloquée (Kool et al., 1999, Konig et al., 1999b). Une implication d'ABCC3 dans l'absorption normale de sels biliaires dans l'intestin est également envisagée (Borst et al., 2007).

En 1999, Schuetz et al. (1999) découvrent qu'ABCC4 efflue les médicaments anti-VIH : 9-(2-phosphonylméthoxyéthyle) adénine (PMEA) et monophosphate azidothymidine (AZTMP) *in vitro*. ABCC4 est un transporteur d'analogues de base et prend en charge certains anticancéreux (par exemple, la 6-mercaptopurine et la thioguanine). C'est également un transporteur d'anions organiques, comme tous les membres de la famille des ABCCs. Toutefois, il est possible qu'il ait une spécificité pour les conjugués du phosphate. Une étude montre également qu'ABCC4 est capable de transporter le glucuronide d'E2 ainsi que le sulfate du déhydro-épiandrostérone (DHEAS) (Zelcer et al., 2003). Les auteurs suggèrent que ce transporteur serait impliqué dans la prise en charge d'acides biliaires et de conjugués des stéroïdes.

Borst et al. (2000) montrent qu'ABCC5 transporte des anions organiques et des conjugués du glutathion *in vitro*, et que ce transport est bloqué en présence d'inhibiteurs organiques typiques (Ortiz et al., 1999). McAleer et al. (1999) et Pratt et al. (2005) mettent en évidence que comme ABCC4, ABCC5 est une pompe d'analogues de nucléotides (6-mercaptopurine, thioguanine, 5-fluorouracile, ...). McAleer et al. (1999) constatent une résistance aux métaux lourds (chlorure de cadmium et tartrate d'antimoine de potassium par exemple) de cellules transfectées avec ABCC5. Les auteurs suggèrent son implication dans le transport de tels métaux. Toutefois, cette étude n'a pas été reproduite (Borst et al., 2000). Le rôle physiologique d'ABCC5 reste à déterminer. Les souris homozygotes pour un gène ABCC5 défectueux sont viables et en bonne santé au moins jusqu'à l'âge de 1 an (Wijnholds et al., 2000).

Bien qu'ayant un spectre de substrats plus étroit qu'ABCB1 et les ABCCs, ABCG2 transporte notamment: les anthracyclines, les inhibiteurs de la topoisomérase I de la famille des camptothécines, les indolocarbazoles et un dérivé de la mitoxantrone (Haimeur et al., 2004, Mao and Unadkat, 2005). Une étude récente montre qu'ABCG2 prend en charge les acides biliaires dans le foie et le placenta chez le rat (Blazquez et al., 2012). De nombreuses études montrent qu'ABCG2 prend également en charge des hormones comme les androgènes et les conjugués de xénobiotiques et d'œstrogènes comme les sulfoconjugués, mais pas les œstrogènes libres (Huss et al., 2005, Robey et al., 2009, Tanaka et al., 2005, Vlaming et al., 2009, Suzuki et al., 2003, Imai et al., 2003). Une récente étude montre qu'ABCG2 est également capable de prendre en charge les conjugués des phyto-œstrogènes (van de Wetering and Saptho, 2012).

Le Tableau 7 montre quelques exemples de substrats des transporteurs ABC.

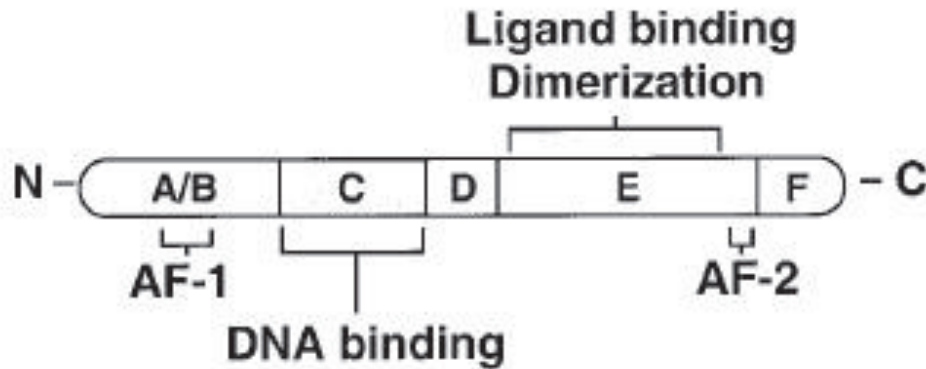


Figure 28. Structure des récepteurs nucléaires. Un récepteur nucléaire typique est composé de plusieurs domaines fonctionnels. La partie variable NH₂-terminale (A/B) contient le domaine de transactivation indépendante du ligand AF-1. Le domaine conservé de liaison à l'ADN (DBD ou région C), est responsable de la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques. Une région variable de liaison (D) relie le DBD à la région E/F qui contient le domaine de fixation du ligand (LBD), et la surface de dimérisation. Le domaine de transactivation indépendante du ligand est situé dans la région A/B, et le domaine de transactivation dépendante du ligand AF-2 est situé à l'intérieur de la région COOH-terminale du LBD. D'après Aranda and Pascual (2001).

Tableau 8. Exemples de récepteurs nucléaires et leurs ligands. D'après Tep (2008).

	Dénomination	Ligands identifiés
HOMODIMERES		
GR	Glucocorticoid Receptor	Glucocorticoïdes
PGR	Progesterone Receptor	Progestérone
AR	Androgen Receptor	Androgènes
ESR1-2	Estrogen receptor	Œstrogènes
HETERODIMERES		
TR	Thyroid hormone Receptor	Hormones thyroïdiennes
VDR	Vitamin D Receptor	1,25-di(OH)-vitamine D
RAR α,β,γ	Retinoic Acid Receptor	Acide rétinoïque all-trans
RXR α,β,γ	Retinoic X Receptor	Acide rétinoïque 9-cis
PPAR α,β,γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor	Prostanoïdes, acides gras
LXR α,β,γ	Liver XReceptor	Oxystérols
FXR	Farnesoid X Receptor	Acides biliaires
PXR	Pregnane X Receptor	Acides biliaires/xénobiotiques
CAR	Constitutive Androstane Receptor	Xénobiotiques

V. Régulation de l'expression

Les gènes qui codent pour les transporteurs ABC sont inductibles (Akita et al., 2001, Hartmann et al., 2005, Hirai et al., 2007, Kast et al., 2002, Klaassen and Aleksunes, 2010). De nombreuses études sur la régulation de leur expression montrent l'implication de RNs (Aleksunes and Klaassen, 2012).

Les RNs, dont la structure type est présentée dans la Figure 28, fonctionnent sous forme d'homo ou d'hétérodimères pour réguler l'expression de leurs gènes cibles (Tableau 8). Certains de ces récepteurs sont dit orphelins car leurs ligands n'ont pas encore été identifiés. Pour ceux dont les ligands sont identifiés, les ligands peuvent être des hormones classiques (hormones stéroïdiennes par exemple), ou des composés issus du métabolisme (acides gras, prostaglandines, acides biliaires, ...), et donc d'origine intracellulaire (Aranda and Pascual, 2001). Certains RNs peuvent être actifs de façon constitutive ou encore être activés par d'autres voies comme la phosphorylation (Aranda and Pascual, 2001) (Figure 29). Toutes ces voies d'activation des RNs illustrent la multitude des mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes de façon générale, et des gènes codant pour les transporteurs ABC en particulier. Le Tableau 9 montre les principaux RNs impliqués dans la régulation des transporteurs ABC.

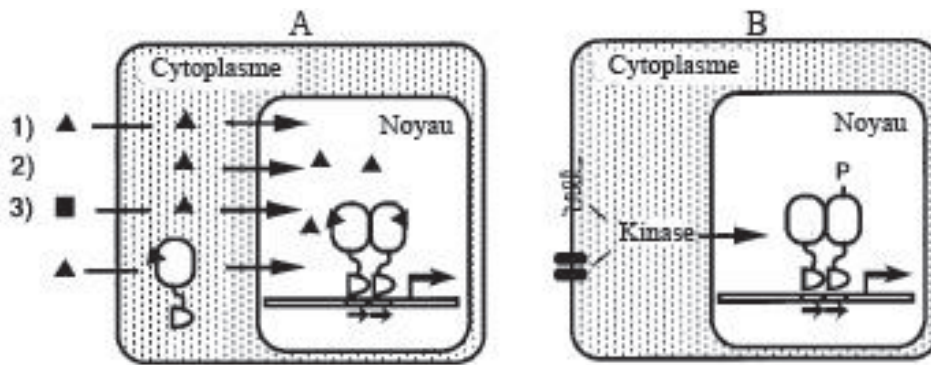


Figure 29. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires. A. Le ligand peut être généré de trois façons différentes: 1) un ligand actif ou une hormone est synthétisée dans un organe endocrine classique et pénètre dans la cellule, 2) le ligand peut être généré à partir d'un précurseur ou d'une pro-hormone dans la cellule cible, et 3) le ligand peut être un métabolite synthétisé dans la cellule cible. Le récepteur sans ligand peut avoir une localisation nucléaire. Cependant, certains récepteurs stéroïdiens sont cytoplasmiques en l'absence de ligand à cause de leur association avec un complexe multiprotéique de chaperons, comprenant Hsp90 et Hsp56. La liaison du ligand induit la dissociation du complexe et la translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, les récepteurs régulent la transcription en se liant, généralement sous forme de dimères, à des éléments de réponse aux hormones (HRE) situés dans les régions régulatrices des gènes cibles. B. Des voies alternatives d'activation des RNs ligands indépendantes existent. Certains récepteurs peuvent être constitutivement actifs, et l'activité d'autres RNs peut être modulée autrement. Par exemple, par phosphorylation médiée par des hormones et des facteurs de croissance qui ensuite active diverses voies de transduction du signal. D'après Aranda and Pascual (2001).

Tableau 9. Les principaux RNs (hors ESRs) impliqués dans la régulation des transporteurs ABC.

RNs	Transporteurs ABC régulés	Références
PXR	ABCB1/Abcb1a-b	Geick et al. (2001); Nagaoka et al. (2006); Ott et al. (2009)
	ABCC2/Abcc2	Kast et al. (2002)
	ABCC3/Abcc3	Aleksunes et Klaassen (2012); Maher et al. (2005a); Teng et al.
CAR	ABCB1/Abcb1a-b	Burk et al. (2005)
	ABCC2/Abcc2	Kast et al. (2002)
	ABCC3/Abcc3	Maher et al. (2005a)
	ABCC4/Abcc4	Aleksunes et Klaassen (2012); Maher et al. (2005a)
AhR	ABCC2/Abcc2	Aleksunes et Klaassen (2012); Maher et al. (2005a)
	ABCC3/Abcc3	Maher et al. (2005a)
	ABCC4/Abcc4	Aleksunes et Klaassen (2012); Maher et al. (2005a)
	ABCC5/Abcc5	Maher et al. (2006b)
	ABCG2/Abcg2	Ebert et al. (2005); Robey et al. (2009); Tompkins et al. (2010)
FXR	ABCC2/Abcc2	Kast et al. (2002)
PPAR α	ABCC2/Abcc2	Hirai et al. (2007); Johnson et Klaassen (2002)
	ABCC3/Abcc3	Maher et al. (2005a)
	ABCC4/Abcc4	Moffit et al. (2006)
PPAR γ	ABCG2/Abcg2	Robey et al. (2009); Szatmari et al. (2006)
Nrf2	ABCC2/Abcc2	Jigorel et al. (2006)
	ABCC3/Abcc3	Jigorel et al. (2006)
	ABCG2/Abcg2	Adachi et al. (2007); Hagiya et al. (2008); Singh et al. (2010); Jigorel et al. (2006)

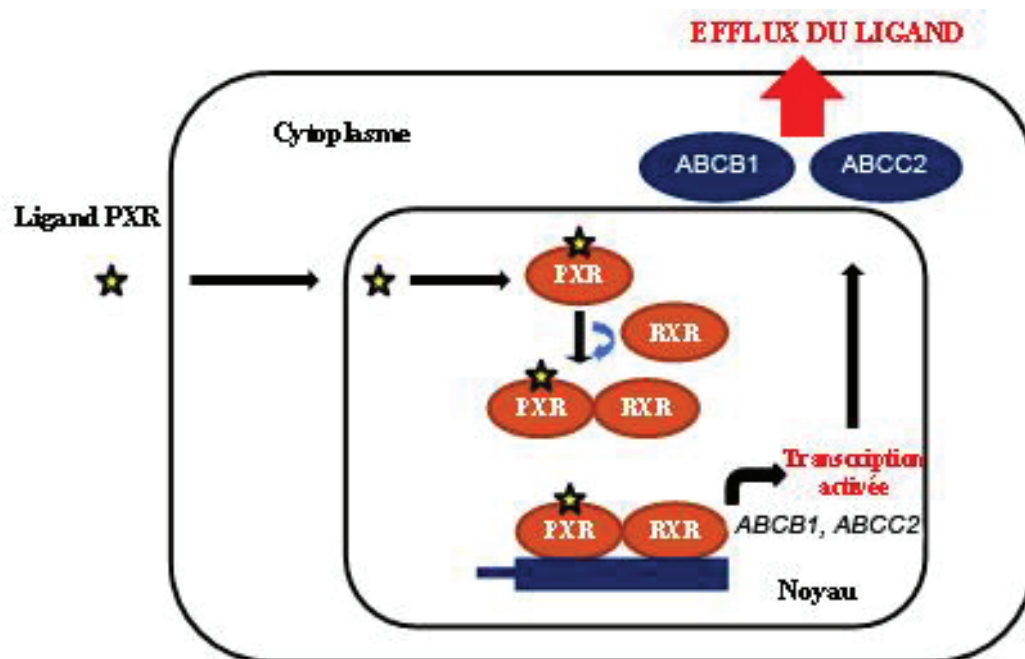


Figure 30. Régulation d'ABCB1 et ABCC2 via PXR. Le ligand se fixe sur le récepteur nucléaire PXR, le complexe formé se fixe sur RXR. Le dimère formé se fixe sur les promoteurs des gènes cibles (*ABCB1* et *ABCC2*) et active leurs transcriptions.

Le gène codant pour ABCB1 est co-régulé avec celui du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) par l'intermédiaire de PXR (Ott et al., 2009, Nagaoka et al., 2006). Nagaoka et al. (2006) ont montré que le tamoxifène active PXR dans les cellules cancéreuses mammaires humaines, ce qui induit l'expression d'ABCB1 (Figure 30) (Nagaoka et al., 2006). Deux autres études montrent que les ligands de PXR comme la rifampicine induisent également l'expression d'ABCB1 dans la lignée humaine d'un carcinome du colon LS174T, et dans les capillaires endothéliaux de cerveaux humains et porcins (Geick et al., 2001, Ott et al., 2009). CAR intervient également dans la régulation d'ABCB1 comme le prouve une étude sur les cellules de l'intestin grêle humain (Burk et al., 2005). Une récente étude réalisée sur la lignée cellulaire humaine d'un choriocarcinome placentaire JAR, et une lignée cellulaire surexprimant ABCB1 (NCI-ADR-RES), toutes deux ESR1 positives, indique qu'une exposition de ces cellules à E2 et à la progestérone est à l'origine d'une induction de l'expression de l'ARNm et de la protéine du gène *ABCB1* (Coles et al., 2009). D'autres études suggèrent également une régulation hormonale des niveaux d'expression d'ABCB1. En effet, les gènes codant pour ABCB1 chez l'homme et les rongeurs (*Abcb1a-b*) sont régulés par la progestérone et les œstrogènes à la fois *in vivo* et *in vitro* (Arceci et al., 1990, Coles et al., 2009, Vore and Leggas, 2008, Evseenko et al., 2007). Toutefois, une étude réalisée sur les cellules mammaires cancéreuses humaines MCF-7 et les cellules T-47D exprimant la protéine ABCB1, montre que les œstrogènes (œstradiol, estrone et DES) inhibent l'expression de la protéine selon un mécanisme post-transcriptionnel ESR1 dépendant (Mutoh et al., 2006). L'inflammation jouerait également un rôle dans la modulation de l'expression d'ABCB1. Gibson et al. (2012) montrent que le lipopolysaccharide intervient dans la modulation de l'expression d'ABCB1 (et d'autres transporteurs ABC comprenant ABCG2, ABCC1 et ABCC4-5) dans des cellules de la microglie murine. Les auteurs suggèrent que cette modulation serait NFκB dépendante (Gibson et al., 2012). Une autre étude montre également que des cytokines pro-inflammatoires inhibent l'expression d'ABCB1 dans la BHE chez le cochon d'inde (Iqbal et al., 2012). Récemment, l'implication d'un autre RN a été mise en évidence. En effet, Chow et al. (2011) ont montré que la 1-alpha, 25-dihydroxy-vitamine D3 induit l'expression d'ABCB1 dans les reins et le cerveau du rat par activation du récepteur de la vitamine D.

Contrairement à la plupart des membres des ABCCs dont l'expression peut être modulée en présence de xénobiotiques, l'induction d'ABCC1 dans des cellules exposées à des composés exogènes n'est pas clairement démontrée, et ne ferait pas intervenir les RNs (Tep, 2008). Toutefois, une récente étude montre que les ligands du Liver X Receptor (LXR) induisent l'expression d'ABCC1 dans les capillaires cérébraux de la souris (Elali and Hermann, 2012). Des études réalisées sur certains types cellulaires montrent que l'expression de ABCC1 peut être induite par des composés redox actifs comme la quercétine et le pyrrolidine dithiocarbamate (Dean, 2009, Yamane et al., 1998, Kurz et al., 2001, Kauffmann et al., 2002).

Les ligands de PXR (Figure 30), CAR et du Farnesoid X Receptor (FXR) sont capables d'activer l'expression d'ABCC2 dans les hépatocytes humains et du rat (Kast et al., 2002). D'autres études montrent que les ligands de AhR induisent aussi l'expression d'ABCC2 (Aleksunes and Klaassen, 2012, Maher et al., 2005a), alors que les ligands PPAR α diminuent l'expression protéique d'ABCC2 mais pas son ARNm (Hirai et al., 2007, Johnson and Klaassen, 2002). Comme ABCB1, Abcc2 subit également une régulation hormonale. En effet, Simon et al. (2006) montrent chez le rat une plus forte expression d'Abcc2 chez les femelles que chez les males. Chez les males, les œstrogènes induisent l'expression du transporteur (ARNm et protéine), alors que la testostérone l'inhibe. Chez les femelles, aucun effet significatif n'est relevé. D'après les résultats d'une hypophysectomie (diminution de l'expression d'Abcc2 et prévention des effets des œstrogènes et de la testostérone), les auteurs suggèrent l'implication des hormones de la glande pituitaire dans la régulation de l'expression hépatique d'Abcc2. Une autre étude chez le rat montre que l'éthinylestradiol inhibe selon un mécanisme post-transcriptionnel l'expression d'Abcc2 dans le foie (Arias et al., 2009), et une étude chez l'homme montre une induction de son expression dans le placenta avec l'avancement de la gestation (Meyer zu Schwabedissen et al., 2005b).

Borst et al. (2007) rapportent que l'expression d'ABCC3 dans le foie est fortement inductible. En effet, chez l'homme (Scheffer et al., 2002, Zollner et al., 2003) et le rat (Donner and Keppler, 2001, Hirohashi et al., 1998, Ogawa et al., 2000) l'expression d'ABCC3 est induite au cours d'une cholestase. Le mécanisme d'induction de l'expression d'ABCC3 dans le foie semble impliquer les RNs (Ghanem et al., 2005, Hitzl et al., 2003, Maher et al., 2005a, Xiong et al., 2002).

Maher et al. (2005a) montrent chez la souris que l'expression de son ARNm est induite par les ligands d'AhR, CAR, PXR et PPAR α dans le foie. Parmi ces RNs, PXR semble jouer un rôle important. En effet, l'induction provoquée par les ligands activateurs de PXR est absente chez les souris knock out pour PXR (Teng et al., 2003, Aleksunes and Klaassen, 2012).

L'induction d'ABCC3 n'est pas limitée au foie puisque de nombreux acides biliaires induisent son expression dans la lignée intestinale humaine Caco-2 et dans le colon des souris (Inokuchi et al., 2001). Quelques études suggèrent l'existence d'une régulation hormonale via les RNs ESRs. En effet, chez le rat, le gène codant pour Abcc3 est inhibé selon un mécanisme transcriptionnel durant la gestation, et le gène humain est inhibé dans la lignée cancéreuse mammaire MVLN par E2 selon un mécanisme ESRs dépendant (Cao et al., 2002, Vendrell et al., 2004). Alors que plus récemment, Yacovino et al. (2012) montrent chez la souris une augmentation de son expression dans le rein au cours de la gestation. Maher et al. (2006a), montrent qu'il existe chez la souris une régulation hormonale (E2 et 5-alpha-dihydroxytestostérone (DHT) entre autres) responsable d'une différence sexe dépendante dans les niveaux d'expression d'ABCC3.

Il n'existe que peu de données concernant la régulation d'ABCC4 et ABCC5. Deux études montrent la régulation d'ABCC4 par les ligands d'AhR, CAR et PPAR α (Aleksunes and Klaassen, 2012, Maher et al., 2005a). L'expression d'ABCC4 est également régulée au niveau du foie par PPAR α (Moffit et al., 2006) et celle d'ABCC5 par AhR également dans le foie (Maher et al., 2006b). Une étude montre l'implication de la cyclo-oxygénase 1 (COX-1) dans la régulation négative d'ABCC4. En effet, Radilova et al. (2009) montrent que la suppression de COX-1 dans une lignée humaine de carcinome du col utérin induit l'expression du transporteur. Il existe très peu d'études sur la régulation d'ABCC5. Une étude montre que les inducteurs des enzymes microsomales comme le PCB126, le phénobarbital, et le PCB99 inhibent très modérément l'expression d'ABCC5 (Maher et al., 2006b). Aucune classe définie d'agonistes de RNs n'a clairement induit ou inhibé l'expression d'ABCC5 (Maher et al., 2006b). Cai et al. (2007) et Ho et al. (2008) montrent *in vitro* (cellules LNCaP) que le gène d'ABCC4 est régulé via le récepteur aux androgènes par molécules androgéniques (Cai et al., 2007, Ho et al., 2008). Des études chez la souris montrent une forte inhibition de l'expression d'ABCC4 durant la gestation et la lactation (Yacovino et al., 2012), et une régulation hormonale notamment par le DHT et E2 (Maher et al., 2006a).

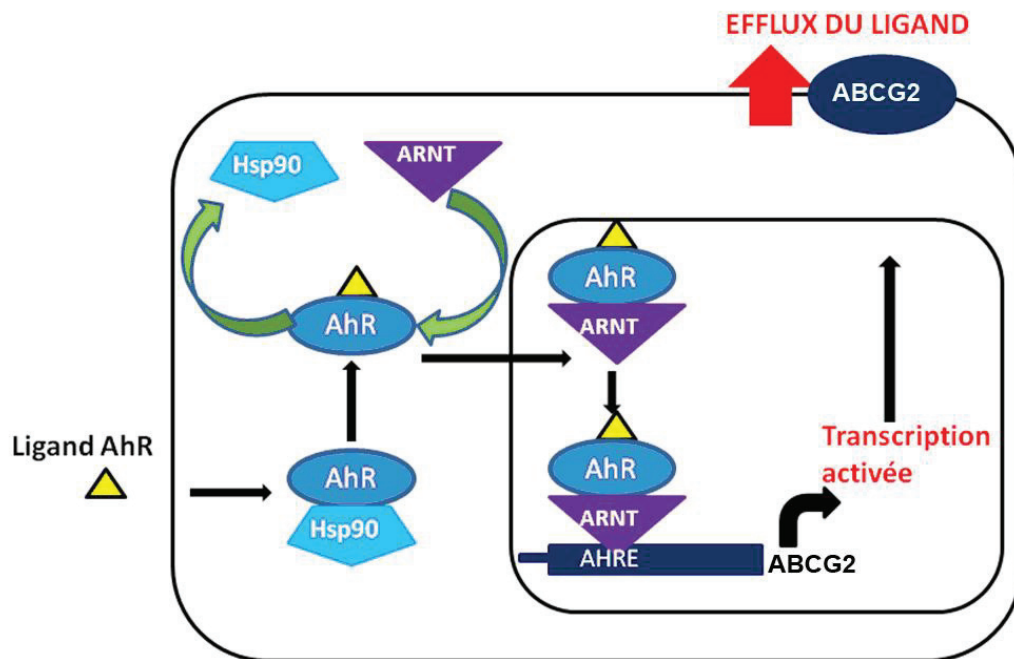


Figure 31. Induction d'ABCG2 via AhR. A l'état natif, AhR est couplé à une protéine de choc thermique Hsp90. La liaison d'un ligand d'AhR libère le récepteur. Le complexe ligand-récepteur se lie à la protéine translocatrice ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator), et le dimère est transloqué dans le noyau, où il se fixe sur un élément de réponse à AhR du gène *ABCG2*. Ce qui induit la transcription et la synthèse protéique d'ABCG2.

ABCG2 est le transporteur ABC dont les mécanismes de régulation sont les plus largement étudiés. Des études suggèrent la régulation de ce transporteur via AhR (Tompkins et al., 2010, Ebert et al., 2005, Robey et al., 2009) (Figure 31). En effet, Ebert et al. (2005) ont montré que le traitement de la lignée cellulaire Caco-2 par des agonistes de ce récepteur (benzo[a]pyrène, 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine, indolo[3,2-*b*]carbazole et le benzo[*k*]fluoranthène) induit à la fois l'expression de l'ARNm et de la protéine du gène *ABCG2*.

D'après Robey et al. (2009) et Szatmari et al. (2006), l'activation de PPAR γ au niveau des cellules dendritiques humaines, induit l'expression du messenger et de la protéine du gène *ABCG2*. Le Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), facteur de transcription redox qui régule des gènes impliqués dans l'équilibre d'oxydo-réduction, du métabolisme du glutathion et de la détoxification des xénobiotiques est également impliqué dans la régulation de l'expression d'*ABCG2* (Adachi et al., 2007, Hagiya et al., 2008, Singh et al., 2010, Jigorel et al., 2006). Jigorel et al. (2006) rapportent que l'oltipraz (OPZ) (activateur de Nrf2) induit l'expression d'*ABCG2* (et *ABCC2-3*) dans des cellules primaires hépatiques humaines.

Des études réalisées *in vivo* mettent en évidence une régulation hormonale de l'expression d'*ABCG2* (Mao, 2008, Tanaka et al., 2005, Vlaming et al., 2009, Wang et al., 2006a, Yasuda et al., 2005). Wang et al. (2006a) montrent par exemple que l'expression de cette protéine est modulée par la gestation, et que ses niveaux d'expression dans les différents tissus des souris varient en fonction du stade gestationnel. L'étude de Tanaka et al. (2005) illustre également bien l'implication des hormones dans la régulation de l'expression de ce transporteur. En effet, les auteurs montrent qu'il existe une différence sexe dépendante dans l'expression d'*ABCG2* chez la souris. Cette expression est plus importante chez les mâles dans le rein et le foie par rapport aux femelles. Des expériences de gonadectomie et d'hypophysectomie montrent que la prédominance masculine de l'expression dans le rein est liée à l'effet inhibiteur de l'œstradiol chez les femelles, alors que celle au niveau du foie semble être due à l'effet inducteur de la testostérone (Tanaka et al., 2005).

De nombreuses études réalisées *in vitro* démontrent également la régulation d'*ABCG2* par des hormones stéroïdiennes via les ESRs et PGRs (Ee et al., 2004, Mao, 2008, Robey et al., 2009, Zhang et al., 2006).

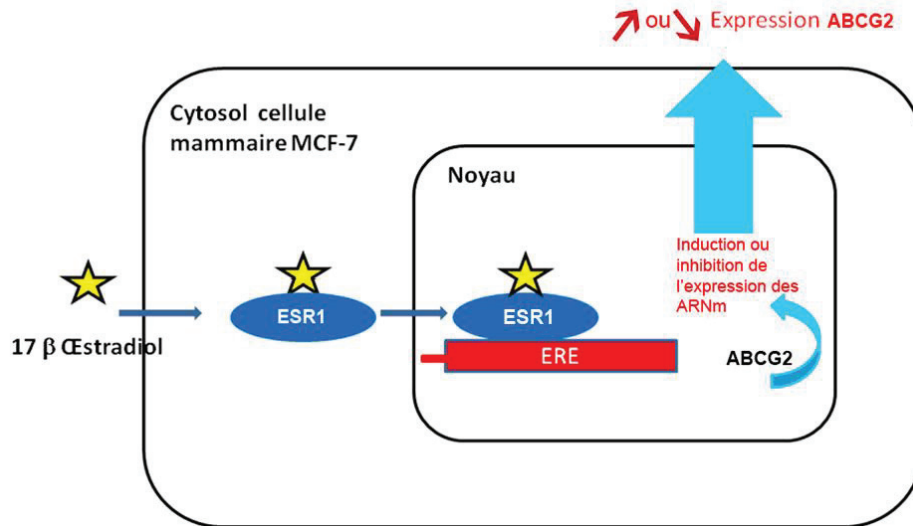


Figure 32. Induction ou inhibition d'ABCG2 dans les cellules MCF-7 par le 17 β-Œstradiol. Le 17 β-Œstradiol se fixe sur le récepteur cytosolique ESR1, le complexe formé est transloqué dans le noyau, se fixe sur un élément de réponse aux œstrogènes au niveau du promoteur du gène codant pour BCRP, et induit son activation ou son inhibition (Mao, 2008, Zhang et al., 2006, Wang et al., 2006b, Ee et al., 2004).

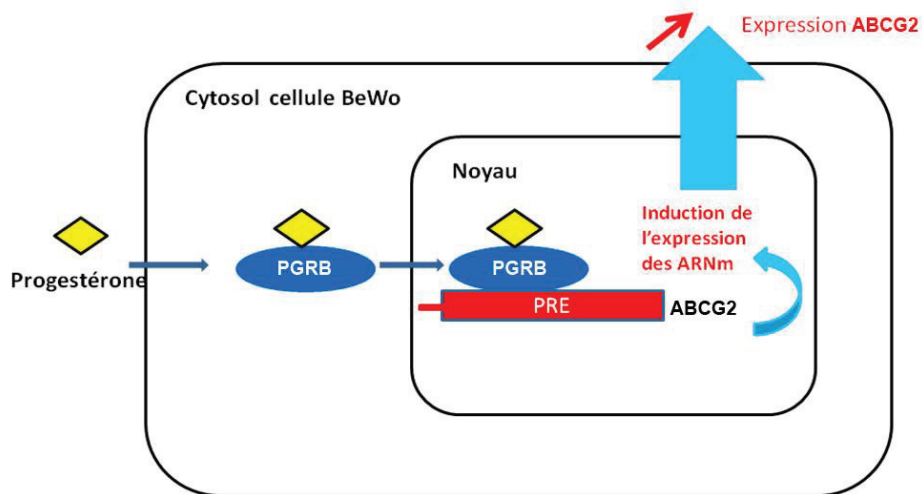


Figure 33. Induction d'ABCG2 via PGRB. La progestérone se fixe sur le récepteur cytosolique PGRB, le complexe formé est transloqué dans le noyau, se fixe sur un élément de réponse à la progestérone au niveau du promoteur du gène codant pour ABCG2, et induit son activation (Mao, 2008).

Une étude réalisée sur des cellules T47D: A18 et les cellules PA-1 surexprimant ESR1, montre que l'activation de ce récepteur par les œstrogènes induit l'expression de l'ARNm d'ABCG2 (Ee et al., 2004). De même une étude réalisée sur les cellules mammaires MCF-7 surexprimant ESR1, montre une induction de l'expression de l'ARNm et de la protéine du gène *ABCG2*, après activation du récepteur par E2 (Zhang et al., 2006) (Figure 32). Toutefois, les résultats de Wang et al. (2006b) contredisent ces deux études suggérant que c'est plutôt une inhibition d'ABCG2 qui est provoquée par l'exposition des cellules à E2. De plus, les effets d'E2 sur l'expression d'ABCG2 ne seraient pas exclusivement transcriptionnels. En effet une récente étude réalisé *ex vivo* sur des capillaires cérébraux de rat et de souris (mimant la BHE), montre que E2 est capable d'inhiber l'expression d'ABCG2 selon un mécanisme non génomique ESRs dépendant (Hartz et al., 2010).

Une autre étude montre que l'expression ainsi que l'activité de BCRP sont induites par la progestérone via le récepteur à la progestérone B (PGRB) au niveau des cellules placentaires BeWo (Figure 33) (Mao, 2008, Wang et al., 2008). Il a été récemment montré que l'expression d'ABCG2 peut être inhibée par la progestérone par interaction directe du complexe progestérone-PGR sur l'élément de réponse à la progestérone (PRE) du promoteur du gène *ABCG2* (Wu et al., 2012). Honorat et al (2008), montrent que la dexaméthasone est capable de réguler l'expression de BCRP par activation des voies de signalisation de PGRs, de PXR, et/ou du GR (Honorat et al., 2008).

**PARTIE B. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE
THESE**

Tableau 10. Estrogéno-modulation des transporteurs ABC.

Transporteur	Molécules	ESRs	Modèle expérimental	Effet sur l'expression	Référence(s)
ABCB1/Abcb1a-b	E2	?	Utérus murin	↗	Arceci et al. (1990)
	E2	ESR1	Cellules JAR et NCI-ADR-RES	↗	Coles et al. (2009)
	Estradiol	?	culture primaire de trophoblastes	↗	Evseenko et al. (2007)
	Estradiol	ESR1	MCF-7 et T-47D	↘	Mutoh et al. (2006)
	Ethinyl Estradiol	?	Intestin de rat	↘	Arias et al. (2009)
ABCC2/Abcc2	Hormones gestationnelles	?	Placenta humain	↗	Meyer zy Schwabedissen et al. (2005b)
	Oestrogènes	ESR1 et 2	Foie de rats mâles	↗	Simon et al. (2006)
ABCC3/Abcc3	Hormones gestationnelles	?	Foie de ratte gestante	↘	Cao et al. (2002)
	E2	ESR1 et 2	Rein de souris femelles	↗	Maher et al. (2006a)
	E2	ESR1 et 2	Cellules MVLN	↘	Vendrell et al. (2004)
	Hormones gestationnelles	?	Reins de souris femelles	↗	Yacovino et al. (2012)
	E2	?	Reins de souris femelles	↗	Maher et al. (2006a)
ABCC4/Abcc4	Hormones gestationnelles	?	Reins de souris femelles	↘	Yacovino et al. (2012)
	E2	ESR1 et 2	cellules MVLN	↘	Vendrell et al. (2004)
ABCC5/Abcc5	Oestrogènes	ESR1	Cellules T47D:A18	↗	Ee et al. (2004)
	E2	ESR1 et 2	capillaires cérébraux (rat et souris)	↘	Hartz et al. (2010)
	Estradiol	?	Reins de rattes	↘	Tanaka et al. (2005)
	Hormones gestationnelles	ESR2	placenta de souris	↗	Wang et al. (2006a)
	E2	ESR1 et 2	Cellules BeWo	↘	Wang et al. (2006b)
ABCG2/Abcg2	E2	?	Cellules MCF-7/P-BCRP	↘	Wu et al. (2012)
	E2	ESR1 et 2	Cellules MCF-7	↗	Zhang et al. (2006)

? Non déterminé

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au devenir de la ZEN dans diverses conditions physiologiques et au risque d'exposition du fœtus et du nouveau né par l'intermédiaire de la mère, puis à la modulation de l'expression des ARNm et des protéines de transporteurs ABC majeurs chez la mère, le fœtus et le jeune adulte exposé en période néonatale.

Comme mentionné dans la synthèse bibliographique, la ZEN est capable d'activer PXR, CAR et AhR (Ayed-Boussema et al., 2011, Ding et al., 2006, Duca et al., 2012, Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007, Mnif et al., 2007, Kast et al., 2002). Or, ces RNs sont impliqués dans la régulation de certains transporteurs ABC de cette étude. En effet, PXR intervient dans la régulation d'ABCB1, ABCC2, et ABCC3. CAR régule l'expression d'ABCB1, ABCC2-4. Les ligands d'AhR quant à eux régulent l'expression d'ABCC2-5 et d'ABCG2 (

7). De plus, l'expression des gènes codant pour les transporteurs ABC est fortement régulée par les hormones stéroïdiennes notamment par l'intermédiaire des ESRs (Tableau 10). Des études *in vivo* et *in vitro* montrent une régulation de l'expression d'ABCB1/Abcb1a-b par E2 selon un mécanisme ESRs dépendant (Arceci 1990, Coles 2009, Vore and Leggas 2008, Evseenko 2007, Mutoh 2006). ABCG2/Abcg2 est le transporteur ABC dont la régulation hormonale est la plus étudiée. De très nombreuses études *in vivo* et *in vitro* démontrent l'hormono-régulation et en particulier l'oestrogéno-régulation d'ABCG2 (Wang et al., 2006a). Les études *in vitro* montrent l'existence d'éléments de réponse aux œstrogènes fonctionnels au niveau du promoteur du gène ABCG2, et une régulation par des œstrogènes ESRs dépendante. (Zhang et al. 2006, Wang et al. (2008, 2006b). Quelques études rapportent l'hormono-régulation d'ABCC2, ABCC3 et d'ABCC4 et une régulation par E2 ESRs dépendante d'ABCC2, ABCC3, et ABCC5 (Cao et al, 2002; Vendrell et al, 2004). Enfin, Beaucoup de molécules endogènes et exogènes sont à la fois substrats et régulateurs des transporteurs qui les prennent en charge (Fujita-Hamabe et al., 2012). C'est le cas par exemple de l'interaction entre les ABCCs et les œstrogènes et leurs conjugués (Vendrell et al., 2004). Or, nous avons précédemment montré dans notre laboratoire que la ZEN et ses métabolites réduits (α et β -ZEL) sont activement transportés par les pompes d'efflux ABCC1/MRP1, ABCC2/MRP2 et ABCC3/MRP2 dans la lignée intestinale humaine Caco-2 (Videmann et al., 2009). De plus, une récente étude montre que la ZEN induit *in vivo* chez le rat l'expression des messagers d'Abcb1. Les auteurs suggèrent que ce transporteur serait impliqué dans sa détoxification (Duca et al., 2012).

En résumé, la ZEN est un agoniste de RNs (CAR, PXR, AhR et ESR1-2) impliqués dans la régulation de l'expression des transporteurs ABC d'intérêt de ce travail. Elle est également activement prise en charge par ces mêmes transporteurs. Tous ces arguments sont donc en faveur d'une potentielle implication de la ZEN dans la modulation de leur expression, et nous ont amené à nous intéresser à l'effet de ce mycoestrogène sur le niveau d'expression des ARNm et des protéines de la superfamille des transporteurs membranaires ABC.

Avant de déterminer l'effet de la ZEN sur la modulation de l'expression des transporteurs ABC, nous avons d'abord caractérisé le comportement toxicocinétique de la ZEN en fonction du genre et du statut hormonal dans notre modèle animal: le rat. Cette première partie du travail de thèse est importante dans la mesure où la ZEN et ses métabolites, et en particulier les métabolites réduits α et β -ZEL, n'ont pas les mêmes potentiels oestrogéniques. Ainsi, des différences dans le métabolisme de la ZEN entre adulte, fœtus et nouveau né, ou entre mâles et femelles, pourraient moduler les conséquences biologiques d'une exposition à la ZEN. Dans cette partie du travail de thèse, nous avons choisi une dose d'exposition de 1 mg/kg. Bien que relativement élevée, cette dose représente la plus faible dose permettant d'obtenir des teneurs tissulaires supérieures au seuil de détection de notre méthode analytique (suite à des essais doses préliminaires).

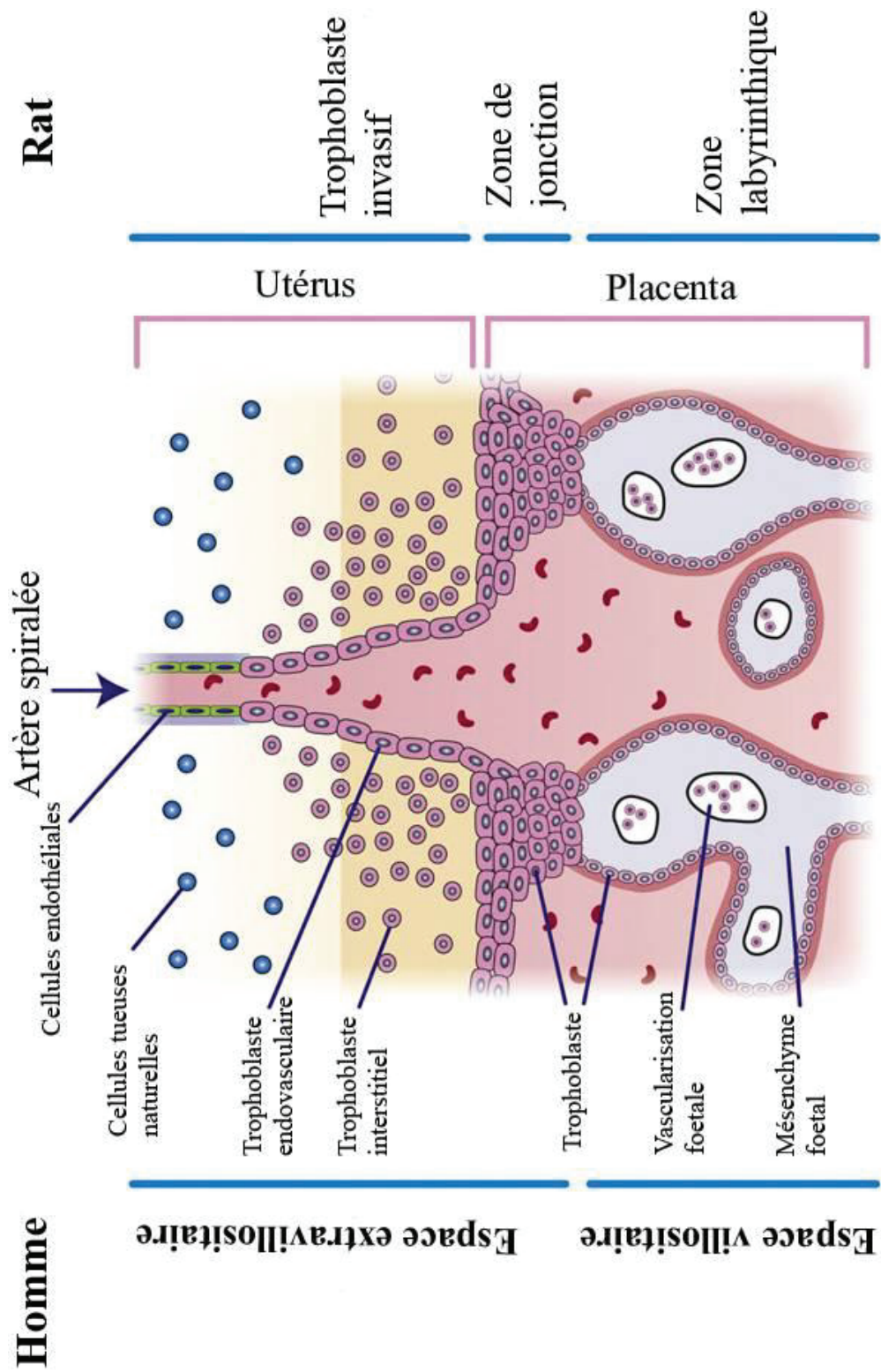


Figure 34. Homologie de structures des sites de placentation hemochoriale entre l'homme et le rat. D'après Soares et al. (2012)

Pour répondre à la question d'une potentielle modulation de l'expression de transporteurs ABC majeurs par la ZEN, nous avons choisi d'utiliser une approche *in vivo*, plus descriptive, et une approche *in vitro*, plus explicative. La ZEN étant un PE, et sachant que ces composés produisent leurs effets les plus délétères au cours d'expositions survenant durant des phases critiques du développement, nous avons choisi d'évaluer ses effets au cours de deux fenêtres de vulnérabilité: la gestation et la période néonatale.

Au cours de la gestation, nous avons évalué l'effet de la ZEN sur des transporteurs ABC exprimés dans des organes maternels et dans le foie fœtal, tenté de corrélérer ces effets avec les teneurs tissulaires en ZEN et métabolites, et déterminé la persistance des effets observés. Le choix du modèle *in vivo* de ce travail a été orienté par deux considérations. La première est en lien avec le cadre global de cette thèse qui vise à déterminer les potentiels effets transgénérationnels de la ZEN. Les rongeurs, possédant une vitesse de reproduction rapide, représentent donc un bon modèle dans ce contexte. La deuxième considération concerne la proximité entre l'homme et notre modèle expérimental. L'exposition se déroulant durant la gestation, nous avons, parmi les rongeurs, choisi de travailler sur un modèle rat puisque son type placentaire est celui qui se rapproche le plus du placenta humain qui est hémochorial (Figure 34) (Soares et al., 2012). L'approche *in vitro* des effets de la ZEN a été évaluée sur les cellules placentaires humaines BeWo. La lignée cellulaire BeWo, développée à partir d'un choriocarcinome placentaire humain, possède les caractéristiques morphologiques et biochimiques des trophoblastes. Ces cellules sont stables et capables de sécrétion hormonale (hCG, progestérone, l'hormone lactogène placentaire), et sont largement utilisées comme modèle d'étude de la différenciation du trophoblaste, des processus de fusion au cours de la formation de syncytium, du métabolisme placentaire et de la distribution des nutriments et des xénobiotiques à travers la barrière placentaire. Les transporteurs ABC de notre étude (ABCB1, ABCC1-3 et ABCG2) sont exprimés dans les cellules BeWo avec des profils d'expression similaires à ceux de syncytiotrophoblastes isolés à partir de placentas humains. Ces caractéristiques font de cette lignée un très bon modèle *in vitro* pour l'étude des effets des xénobiotiques au niveau placentaire.

Concernant l'exposition en période néonatale, l'objectif était d'évaluer, à l'âge adulte, l'effet dose de la ZEN sur le niveau d'expression de transporteurs ABC intervenant de façon majoritaire dans la barrière hémato-testiculaire. Les rats mâles nouveaux nés ont été exposés à trois doses de ZEN (faible, moyenne et forte). Bien que non inférieure à la DJA humaine de 0.25 µg/kg/jour, la plus faible dose de ZEN (50µg/kg/jour) est considérée comme une dose faible chez le rat après suppression des facteurs de sécurité.

Afin d'évaluer l'implication du caractère oestrogénique de la ZEN dans cette modulation, nous avons comparé ses effets *in vitro* avec ceux produits par un œstrogène pur (EB), couplé ou non à l'utilisation d'un anti-œstrogènes (ICI 182.780) dans un modèle de cellules de Sertoli de rat. Notre choix s'est porté sur ce type cellulaire en raison de ses divers rôles dans le testicule, allant du soutien mécanique des tubes séminifères à la régulation fonctionnelle de la spermatogenèse, mais surtout parce qu'elles représentent la composante principale de la barrière hémato-testiculaire et jouent un rôle clé dans sa fonction de protection. De plus, les transporteurs ABC présents dans ces cellules contribuent activement à ce rôle de protection en effluant leurs substrats nocifs hors du testicule. Nous avons plus précisément choisi d'évaluer les effets de la ZEN dans la lignée SerW3. Ces cellules ont approximativement le même profil d'expression des transporteurs ABC qu'*in vivo* (Leslie et al., 2005). En outre, cette lignée non transformée conserve les caractéristiques des cellules de Sertoli *in vivo* et constitue un très bon modèle d'exposition néonatale. En effet, elles sont issues de testicules de rats mâles de 17 jours, ce qui représente le plus jeune âge permettant un isolement et une culture réussis des cellules de Sertoli (Pognan et al., 1997).

En résumé, nous avons tenté de répondre aux problématiques suivantes:

- 1) Déterminer le métabolisme et la distribution tissulaire de la ZEN en fonction du sexe, du stade physiologique, sous diverses conditions d'exposition, et évaluer les niveaux d'exposition fœtale et néonatale résultant de l'exposition de femelles gestantes et allaitantes.
- 2) Evaluer l'effet de la ZEN sur le niveau d'expression de transporteurs ABC et de récepteurs nucléaires dans les organes maternels et le foie fœtal au cours d'une exposition gestationnelle, le corrélérer aux teneurs tissulaires en ZEN et métabolites, et étudier l'effet de la ZEN et de ses métabolites *in vitro* dans une lignée placentaire humaine: BeWo.
- 3) Evaluer l'effet de la ZEN sur l'expression de transporteurs ABC testiculaires à l'âge adulte après une exposition néonatale ainsi qu'*in vitro* dans une lignée de cellules de Sertoli immatures, et déterminer l'implication des propriétés oestrogéniques de la ZEN dans cette modulation.

PARTIE C. RESULTATS

I. ETUDE DE LA DISTRIBUTION DE LA ZEARALENONE *IN VIVO* CHEZ LE RAT

I.1. CONTEXTE DE L'ETUDE

Avant d'élucider les mécanismes qui gouvernent les effets de la ZEN sur les organes cibles, il était essentiel de clarifier son métabolisme, sa distribution et son élimination. Quelques études réalisées chez les mammifères décrivaient la toxicocinétique de la ZEN, mais la variabilité des protocoles expérimentaux rendait difficile la comparaison des données obtenues sur mâles et femelles à différents stades hormonaux. Par ailleurs nous avons identifié un manque de données toxicocinétiques relatives à cette mycotoxine en particulier durant les phases de gestation et néonatale: quels sont les métabolites qui vont préférentiellement être transférés vers le fœtus et dans le lait, et dans quelles proportions? Ces données sont d'autant plus importantes qu'elles concernent des stades de développement particulièrement sensibles aux effets des PEs. Par ailleurs, très peu de données concernant une administration répétée étaient disponibles, nous avons donc entrepris une première étude *in vivo* chez le rat visant à déterminer le métabolisme et la distribution tissulaire de la ZEN dans diverses conditions: comparaison mâles/femelles, nullipares/femelles gestantes en situation d'exposition unique, femelles gestantes et allaitantes en situation d'exposition répétée.

I.2. OBJECTIFS

Le but de notre étude a été de (1) comparer le métabolisme et la distribution tissulaire de la ZEN chez les mâles, les femelles nullipares et en phase de gestation, sous diverses conditions d'exposition et (2) déterminer les niveaux d'exposition fœtale et néonatale résultant d'une exposition unique ou répétée de femelles gestantes et allaitantes à la ZEN.

I.3. RESULTATS: PUBLICATION 1

Effect of gender, pregnancy and exposure conditions on metabolism and distribution of zearalenone in rats

Videmann, B., **Koraichi, F.**, Mazallon, M., Lecoecur, S. 2012

World Mycotoxin Journal, 5, 57-69

Effect of gender, pregnancy and exposure conditions on metabolism and distribution of zearalenone in rats

B. Videmann, F. Koraichi, M. Mazallon and S. Lecoeur

UMR 1233 INRA-VetAgroSup, National Institute for Agronomic Research, Campus Vétérinaire de Lyon, 1 av. Bourgelat, 69 280 Marcy l'Etoile, France; sylvaine.lecoeur@lyon.inra.fr

Received: 16 June 2011 / Accepted: 23 September 2011

© 2011 Wageningen Academic Publishers

Abstract

The mycotoxin zearalenone (ZEA) is produced by a variety of *Fusarium* fungi and contaminates numerous cereals, fruits and vegetables. Interacting with the oestrogen receptors, ZEA and reduced metabolites zearalenols (ZOLs) cause hormonal effects in animals, such as abnormalities in the development of the reproductive tract and mammary gland in female offspring. Limited information is available on the pharmacokinetics of ZEA and its metabolites, particularly in pregnant females, foetuses and newborns. Our study was conducted to characterise the tissue distribution and metabolism of ZEA in male and female rats in various physiological states (virgin female, pregnant female) and exposure conditions (subcutaneous versus oral exposure, single versus repeated exposure to 1 mg/kg ZEA). Respective placental and mammary transfer to foetuses and newborns was evaluated. In all states and exposure conditions, α -ZOL and the glucuronides of ZEA and α -ZOL were the predominant metabolites, mostly concentrated in the intestine, the liver and the urine. Toxins were very low or undetectable in most of the tissues 24 h after ZEA exposure, except in foetal livers. Absorption and intestinal glucuronidation of ZEA were higher in males than females. α -ZOL concentration was significantly higher in the intestine and liver of males and pregnant females, compared to virgin females. ZEA and all its metabolites easily crossed the placental barrier and transferred into the milk. ZEA was metabolised in the foetal and neonatal stages, glucuronides being the main form detected in all organs. Metabolite elimination was slower in foetal tissues than in maternal tissues. All toxin concentrations in the foetal and neonatal tissues strongly increased in cases of repeated maternal exposure. A better knowledge of the metabolism and transfer of ZEA in foetuses and newborns will help to evaluate the health risk that such endocrine disruptors represent in these stages.

Keywords: zearalenone, oestrogenomimetic, pharmacokinetics, rat, pregnancy

1. Introduction

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin mainly produced by a variety of *Fusarium* fungi that contaminates numerous cereals (wheat, barley, maize, oat, rye, rice), fruits and vegetables. The production of ZEA is facilitated by a fresh and wet climate, and the mycotoxin is particularly prevalent in Europe (North, East and West), at variable concentrations according to the cereal (40-11,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Cereal crop contamination is estimated at 30-70% of samples (Zinedine *et al.*, 2007). Thermostable and resistant to food processing, the toxin is present in finished products:

bread, pastas, breakfast cereals. The occurrence of ZEA as a food contaminant and the inevitable exposure of the population and children to these toxins with probable adverse outcomes need to be scientifically assessed. ZEA is structurally homologous to oestradiol. ZEA and its major metabolites α - and β -zearalenols are capable of interacting with the oestrogen receptors (ER) ER α (agonist activity) and ER β (agonist-antagonist activity) (Kuiper *et al.*, 1998). The binding of complex ZEA-ER on the promoter of the target genes stimulates the transcriptional activity of ERs, such an effect being driven at a concentration of 1-10 nM (Kuiper *et al.*, 1998; Parveen *et al.*, 2009).

Adverse effects of ZEA and its metabolites have been identified. The prolonged administration of ZEA leads to pituitary and hepatocellular adenomas in mice at doses of 7-20 mg/kg bodyweight, (National Toxicology Program, 1982), doses which are considerably higher than the concentrations leading to hormonal effects (0.2-500 µg/kg bodyweight; Belli *et al.*, 2010; Nikaido *et al.*, 2004). The effects of ZEA exposure include early thelarche, decreased ovulation rate and decreased litter size in small ruminant females, and penis abnormalities and degenerating sperm in males (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2007). In humans, a Polish study performed on 49 women (Tomaszewski *et al.*, 1998) found a strong correlation between blood ZEA content and the presence of uterine pathology (adenocarcinoma and hyperplasia of the endometrium). More recently ZEA was suspected to be a triggering factor for central precocious puberty in girls (Massart *et al.*, 2008). An increased exposure to oestrogen-like molecules at critical periods, like during the foetal and neonatal stages, has been suspected to be the cause of the increased incidence of the diseases observed in hormone-dependent organs in humans (Davies and Norman, 2002; Herbst *et al.*, 1971). Humans and rodents are very sensitive to oestrogen exposure for the development of testis, prostate and mammary glands (Hess, 2000), and this has been confirmed by abnormalities in the development of the reproductive tract and mammary gland in female mouse offspring exposed to ZEA (Collins *et al.*, 2006; Nikaido *et al.*, 2004).

To further elucidate the mechanisms governing the detrimental effects of ZEA on target organs, it is essential to clarify its metabolism, distribution and elimination within the body. A few studies have investigated the tissue distribution of ZEA and its metabolites in mammals, reporting liver, bile, urine and plasma analyses (Olsen *et al.*, 1985; Ueno *et al.*, 1977). Two studies (Shin *et al.*, 2009a,b) recently described ZEA pharmacokinetics in male rats, with the aim of developing physiologically based pharmacokinetic models, but data on pharmacokinetics in females, particularly pregnant females, and data on the transfer of toxins to offspring via maternal exposure are scarce. Bernhoft *et al.* (2001) reported a placental transfer of ZEA and its metabolites to the foetus, after one administration to females on day 12 or 18 of pregnancy. These studies used varying experimental protocols so it is not possible to compare ZEA metabolism and distribution between males and females of different hormonal states. Both hydroxysteroid dehydrogenases, involved in the formation of reduced α - and β -zearelenols (Malekinejad *et al.*, 2006; Videmann et al, 2008), and glucuronidation enzymes present a sexual dimorphism (Aste *et al.*, 2008; Rush *et al.*, 1983), potentially leading to metabolic differences. However, very little information is available on ZEA disposition after repeated exposure. Given that exposure of pregnant and nursing females can adversely

affect the foetal and neonatal stages, it is critical that further work be carried out to determine the fate of ZEA and its metabolites in both physiological states.

Our study was undertaken (1) to compare the metabolism and the tissue distribution of ZEA in males, virgin females and pregnant females, using different exposure conditions, and (2) to determine the level of foetal and neonatal exposure resulting from single and repeated exposure of pregnant and nursing females to ZEA.

2. Materials and methods

Chemicals

ZEA was purchased from COGER (Morillons, France). α -zearelenol (α -ZOL), β -zearelenol (β -ZOL) and β -glucuronidase were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Dimethyl sulfoxide (DMSO), acetonitrile, methanol and chloroform were obtained from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Sodium pentobarbital was purchased from CEVA Santé Animale, (Libourne, France). HPLC grade water, prepared using a milli-Q plus system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was used for preparation of HPLC eluents.

Animals

Male, virgin female and pregnant female Wistar rats (10 wk old, weight 230-290 g) were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and kept in plastic rat cages with free access to water and standard rat diet. The absence of ZEA in the rat diet was checked by the HPLC method. The rats were maintained in the animal facility at a temperature of 21 ± 2 °C with a 12/12 h light/dark cycle for one week before experimentation. All procedures were conducted in accordance with the regulations of the ethics committee of the Veterinary campus of Lyon, France. Seven groups of 5 males, 5 virgin females and 5 pregnant females at gestation day (GD) 20 were orally administered 1 mg/kg ZEA (ZEA dissolved in maize oil with 5% DMSO). The metabolism and distribution of ZEA was studied at 0.3, 0.5, 0.7, 1, 4, 8 and 24 h after exposure. We chose GD20 in order to be able to perform HPLC dosage on foetal tissues at the end of organogenesis and histogenesis, and in order to compare the tissue content and distribution after subcutaneous (SC) and oral exposure at the same stage of pregnancy. The doses were chosen in order to detect and quantify α -ZOL and its glucuronide in the foetal and neonatal tissues. For the repeated exposure and placental transfer studies, pregnant females were given 1 mg/kg ZEA by SC injection (dosing vehicle DMSO: saline 1:1, v/v, injected volume of 1 µl/5 g animal), at GD20 or daily from GD7 to GD20 (5 females for each condition). The animals were anaesthetised by intraperitoneal (IP) injection of sodium pentobarbital (0.5 ml/kg), and the organs (liver, kidney, small intestine,

colon, uterus, ovaries, testes, prostate, mammary gland, muscle, abdominal fat, placenta, whole foetus and foetal liver) were dissected and weighed. For mammary transfer studies, nursing females were given 1 or 15 mg/kg ZEA by SC injection, at day 15 or daily from day 15 to 17 after rat birth (3 females for each condition). The young rats (6 for each condition, randomly chosen among the 3 females) were allowed to suckle for 4 h, were then anaesthetised by IP injection of sodium pentobarbital (0.5 ml/kg), and the organs (intestine, liver and kidney) were dissected and weighed. Stomach contents were sampled by dissection, and urine and blood were sampled by puncture of the bladder and heart, respectively. Serum samples were harvested by centrifugation at 3,500×g. All samples were kept at -20 °C until analysis.

Tissue distribution study

The samples (0.2 to 4 g of tissue) were homogenised using an ultra thurax for 1 min, then extracted with 40 ml of 30% methanol/70% water/0.25% H₃PO₄, using an ultra thurax for 1 min. The extract was centrifuged at 3,000×g for 5 min. The supernatant was transferred to a flask and evaporated at 50 °C with a rotary evaporator (Buchi; Verre Labo Mula, Vourles, France) under reduced pressure until only 5 ml of residual water remained. The pH was adjusted to 6.8 with 1N NaOH. The sample was exactly divided into two tubes and adjusted to 8 ml with 50 mM phosphate buffer pH 6.8. One tube was incubated with β-glucuronidase (200 U) at 37 °C overnight to cleave the conjugates. Each sample was extracted twice with chloroform. The chloroform layer was evaporated with a rotary evaporator at 50 °C under reduced pressure. The flask was rinsed three times with 1 ml of methanol and transferred to a tube. The residue was evaporated to dryness under a gentle nitrogen flow. The final purified sample was dissolved in 200 μl of methanol and 50 μl were injected into HPLC.

Urine and plasma analysis

An aliquot (0.2-2 ml) of sample was placed in a tube with 10 ml of 50 mM phosphate buffer pH 6.8. The sample was exactly divided into two tubes and all subsequent steps were carried out as described above for the organs samples.

Quantification of zearalenone and its metabolites by the HPLC method

The concentration of ZEA and its metabolites was determined by HPLC according to Videmann *et al.* (2008) with modifications. Excitation and emission wavelengths were 275 and 465 nm, respectively. A gradient elution system was used: from 75% water (acidified with 0.2% H₃PO₄ and adjusted to pH=3 with 5N NaOH), 25% acetonitrile at time zero, isocratic for 0.2 min, to 35% water, 65% acetonitrile at 13 min. The duration of a total cycle was 24 min. The flow

rate was set at 1.4 ml/min. The retention times of β-ZOL, α-ZOL and ZEA were 8.3, 9.7 and 12.2 min, respectively. The fluorescence detection limit and the quantification limit were 12, 0.6, 1.1 ng/g and 30, 1.5, 2.7 ng/g for β-ZOL, α-ZOL and ZEA, respectively. The 5 mg/ml stock solutions were prepared in methanol and stored at -20 °C. The standard solutions were made up in methanol at 1000 ng/ml for β-ZOL and 100 ng/ml for α-ZOL and ZEA.

The specificity of the analytical method was determined by the extraction of three different blank samples of each organ collected from 3 control rats. The method appeared selective for ZEA, β-ZOL and α-ZOL. The noise level was estimated for each organ and the mean value plus three standard deviations or ten standard deviations were used to calculate the limit of detection and the limit of quantification, respectively. Spiked samples with decreasing concentrations were used to determine those limits chromatographically.

The linearity and accuracy of the method were determined by using spiked liver and plasma samples. Three series of seven spiked samples were prepared (each one on a different day), then extracted and analysed. The linear regression equations of spiked samples were compared to standard calibration curves ($r > 0.99$). The recoveries of ZEA, β-ZOL and α-ZOL from the extraction procedure varied from 72 to 82% with a coefficient of variation below 10%. The glucuronides were analysed after deconjugation by the β-glucuronidase. The efficiency of deconjugation was tested using different concentrations of β-glucuronidase (100 U to 2,000 U) on glucuronide solutions (prepared as described in Videmann *et al.*, 2008). The 200 U concentration was used for the analysis, allowing 100% deconjugation efficiency. The glucuronide concentration was calculated assuming that 1 mole of ZEA, β-ZOL and α-ZOL, respectively, produces 1 mole of ZEA, β-ZOL and α-ZOL glucuronide.

Data analysis

Tissue toxins were given as the concentration in fresh samples by considering their dry matter content. The foetal/maternal ratio was calculated as follows: foetal/maternal ratio = toxin concentration in the foetal sample (ng/g) / toxin concentration in the maternal sample (ng/g).

Area under the curve (AUC) was calculated using GraphPad Prism 5 (GraphPad software; La Jolla, CA, USA). AUC comparisons of ZEA and its metabolites in males, virgin females and pregnant females were made by the one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. For the comparison of the toxin concentrations between the tissues, the symbol > indicated a significant difference, and the symbol ~ indicated no significant difference. Comparison of tissue levels between

single and repeated exposure was made by the Student's t-test. A *P*-value of 0.05 was taken to be significant.

3. Results

Kinetics of zearalenone and its metabolites in various animal tissues

ZEA and its metabolites were measured over 24 h after oral administration of 1 mg/kg ZEA (Figures 1-3). The reduced metabolite α -ZOL and the glucuronides of ZEA and α -ZOL were the only metabolites detected in our study, ZEA-glucuronide being the predominant form. For all the toxins, the shape of the kinetics was similar, showing a dip in the concentrations between 30 and 40 min after exposure, then reaching a maximum (i.e. second peak) around 4 h after exposure, as shown by toxin concentrations in the plasma (Figure 1AB), and intestine (Figure 1CDEF). The concentrations rapidly decreased after 4 h, being very low or undetectable in most of the tissues 24 h after exposure. The

glucuronide concentration in the tissues was higher than the respective free forms, except in the colon. The highest concentrations were measured in the small intestine and urine (Figures 1DF, 2DF). α -ZOL and its glucuronide form were only detected in the small intestine, urine and liver (Figures 1EF, 2EF, 3EF), and in trace amounts in the colon.

Kinetics of zearalenone and its metabolites in relation to gender and pregnancy

The comparison of toxin concentrations in the various tissues led to the following ranking:

- In males: urine > small intestine > colon > liver ~ kidney ~ plasma > testis ~ prostate for ZEA; urine ~ small intestine > liver > kidney ~ plasma ~ prostate > colon > testis for ZEA-glucuronide.
- In virgin females: urine > uterus ~ colon > small intestine ~ kidney > ovaries ~ liver ~ plasma > mammary gland for ZEA; urine ~ uterus ~ small intestine > liver > plasma

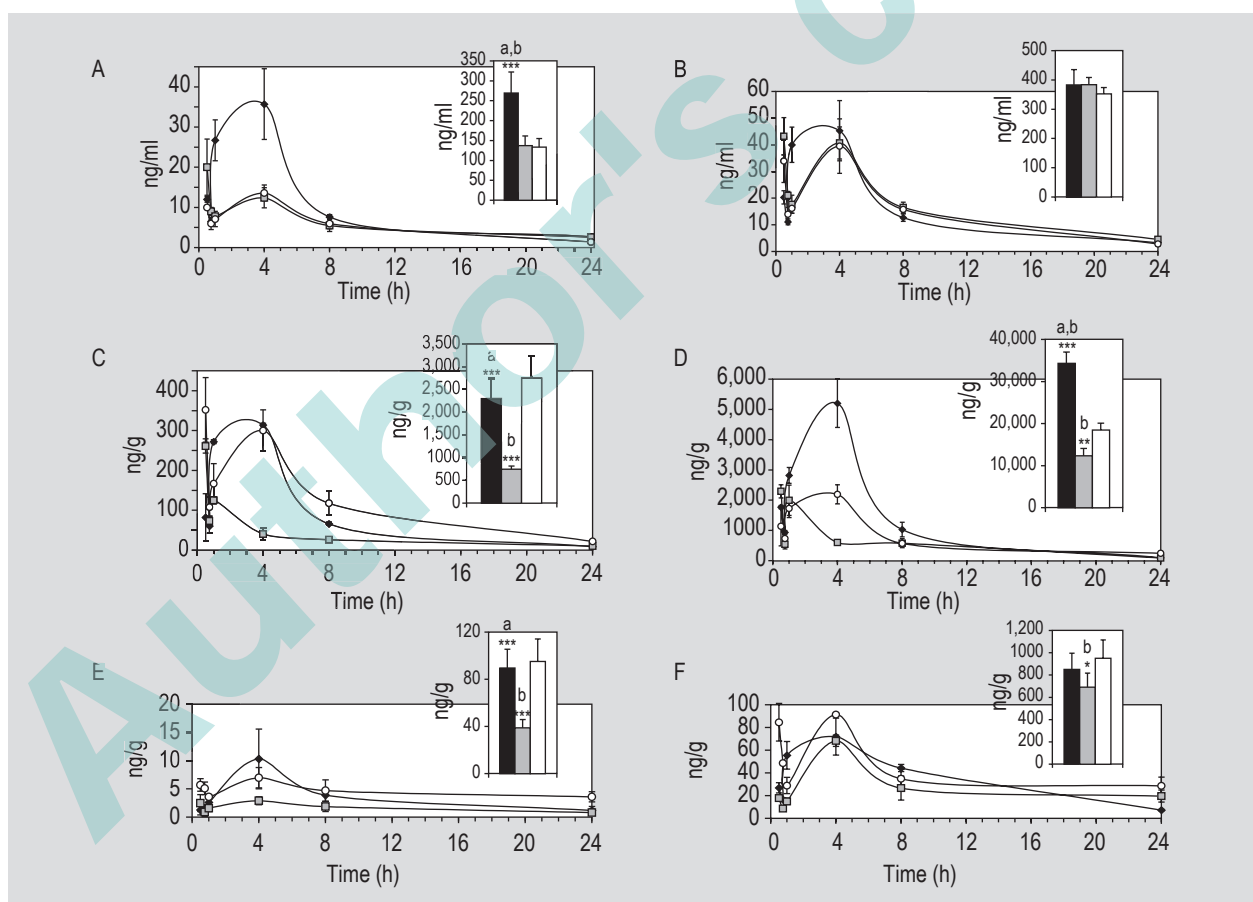


Figure 1. Kinetics of zearalenone (ZEA) (A, C) and its metabolites ZEA-glucuronide (B, D), α -zearalenol (α -ZOL) (E), α -ZOL-glucuronide (F) in the plasma (A, B) and small intestine (C, D, E, F): effect of gender and pregnancy. Male rats (black symbols), virgin females (grey symbols) and pregnant females (white symbols) were orally administered 1 mg/kg ZEA. Area under the curve represented in the inset. Mean \pm SD, n=5. * *P*<0.05; ** *P*<0.01; *** *P*<0.001.

^a Significantly different from virgin female.

^b Significantly different from pregnant female.

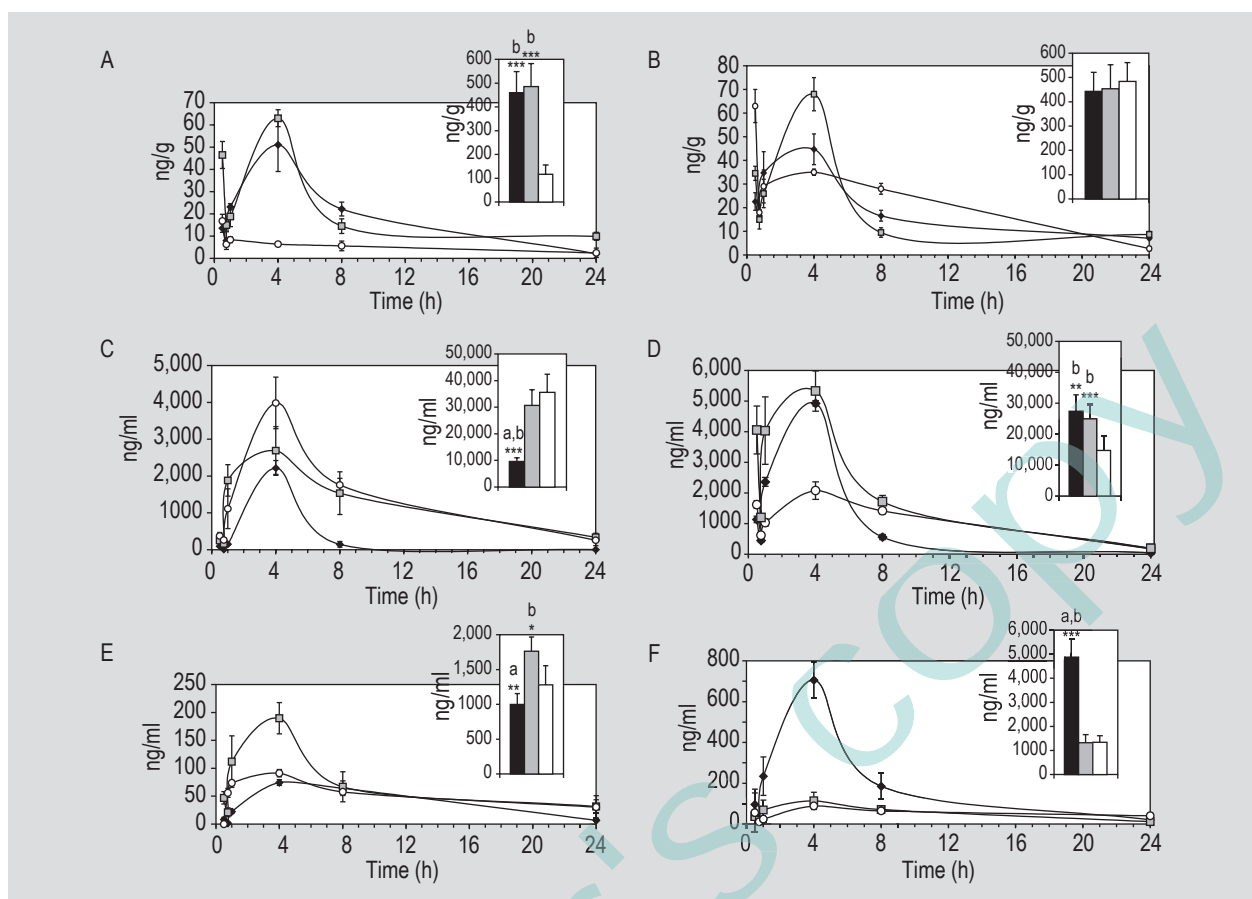


Figure 2. Kinetics of zearalenone (ZEA) (A, C) and its metabolites ZEA-glucuronide (B, D), α -zearalenol (α -ZOL) (E), α -ZOL-glucuronide (F) in the kidney (A, B) and urine (C, D, E, F): effect of gender and pregnancy. Male rats (black symbols), virgin females (grey symbols) and pregnant females (white symbols) were orally administered 1 mg/kg ZEA. Area under the curve represented in the inset. Mean \pm SD, $n=5$. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

^a Significantly different from virgin female.

^b Significantly different from pregnant female.

~ kidney > mammary gland ~ colon > ovaries for ZEA-glucuronide.

- In pregnant females: urine > small intestine > colon > liver ~ ovaries ~ uterus > kidney ~ plasma > foetal liver ~ mammary gland for ZEA; urine ~ small intestine > liver > colon ~ uterus ~ kidney ~ plasma > ovaries > placenta ~ foetal liver > mammary gland ~ foetus for ZEA-glucuronide.

The AUC for ZEA was significantly higher in the plasma, liver and intestine of males (Figures 1AC and 3C), and significantly lower in the urine and colon (Figures 2C and 3A) compared to both female states. The AUC in kidneys was also significantly higher in males compared to pregnant females (Figure 2A). ZEA-glucuronide was more concentrated in the small intestine, colon and liver of males (Figures 1D and 3BD) compared to virgin females, and in the small intestine, compared to pregnant females (Figure 1D). The α -ZOL AUC was higher in the intestine and liver of males compared to virgin females (Figures 1E

and 3E), and the α -ZOL-glucuronide AUC was higher in the urine and liver of males (Figures 2F and 3F).

The AUC comparison of pregnant and virgin females showed some differences: ZEA and ZEA-glucuronide concentrations were significantly higher in the uterus of virgin females compared to pregnant females (Figure 4AB), as were ZEA-glucuronide concentrations in the mammary gland and the urine (Figures 2D and 4D). Conversely, ZEA and its glucuronide were more concentrated in the small intestine, the liver and the ovaries of pregnant females (Figures 1CD, 3CD and 4AB), as was ZEA in the mammary gland (Figure 4C) and ZEA-glucuronide in the colon (Figure 3B). α -ZOL was less concentrated in the urine and more concentrated in the small intestine and liver of pregnant females (Figures 1E, 2E and 3E), while α -ZOL-glucuronide concentration was slightly increased or unchanged.

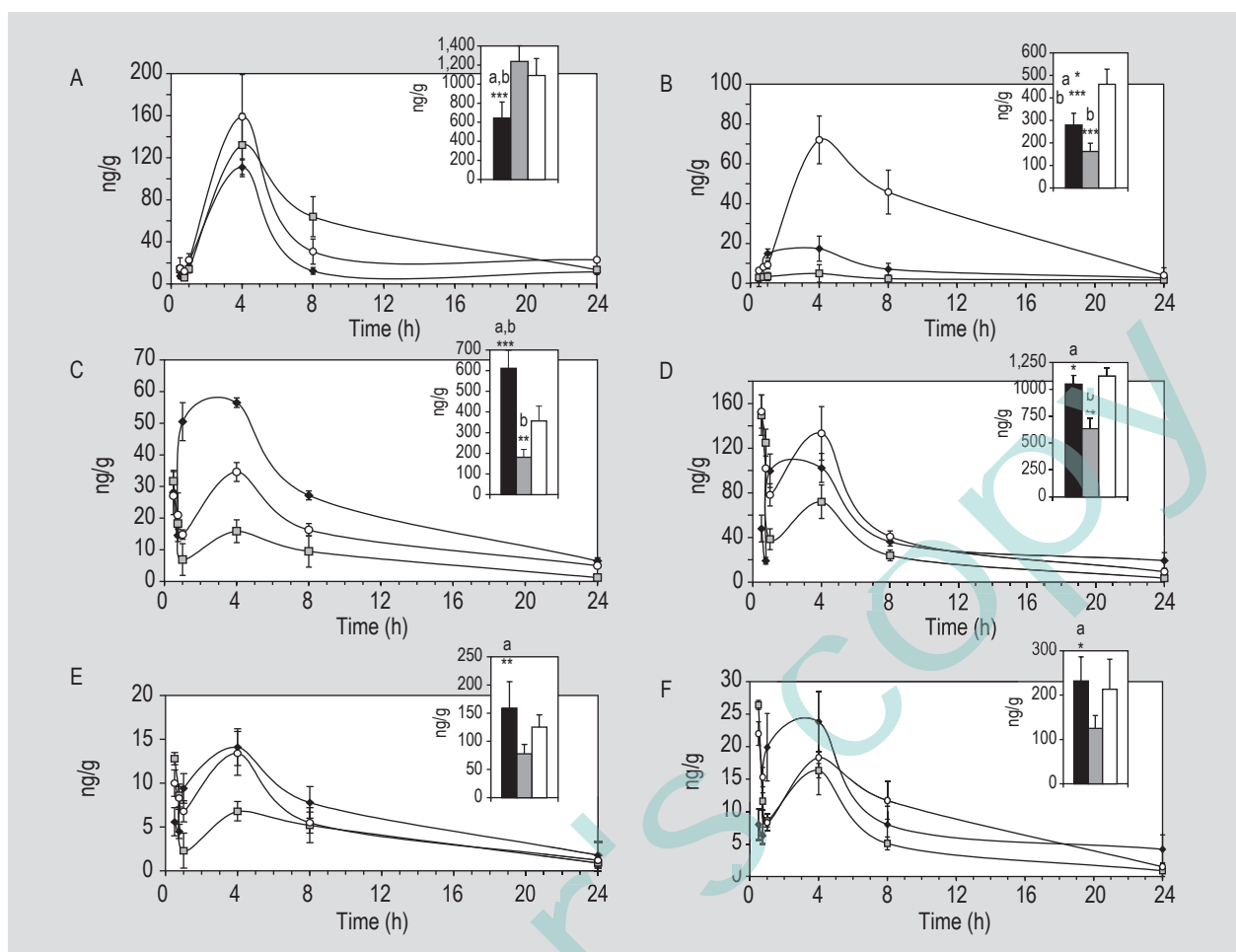


Figure 3. Kinetics of zearalenone (ZEA) (A, C) and its metabolites ZEA-glucuronide (B, D), α -zearalenol (α -ZOL) (E), α -ZOL-glucuronide (F) in the colon (A, B) and liver (C, D, E, F): effect of gender and pregnancy. Male rats (black symbols), virgin females (grey symbols) and pregnant females (white symbols) were orally administered 1 mg/kg ZEA. Area under the curve represented in the inset. Mean \pm SD, n=5. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.001$.**

^a Significantly different from virgin female.

^b Significantly different from pregnant female.

Kinetics of foetal exposure

ZEA was only detectable in the foetal liver (Figure 5) whereas ZEA-glucuronide was found in the placenta and the foetus. The elimination of the toxins was far slower in the foetal liver than in maternal organs: 24 h after exposure, this tissue still showed contamination levels close to those encountered at 8 h. The foetal/maternal ratio increased 4- and 10-fold at 24 h, for ZEA and ZEA-glucuronide, respectively (Table 1).

Kinetics of zearalenone and its metabolites in relation to the administration route

Tissue concentrations of ZEA and its metabolites were compared in pregnant females exposed to 1 mg/kg ZEA, either SC or orally (Table 2). After SC administration, in all organs except the colon, a peak concentration appeared

at 4 h, and ZEA concentrations decreased from short times to long exposure times. The sampling times did not allow us to observe the dip that was shown after oral administration. In most organs, except the small intestine, the tissue concentrations of ZEA and its metabolites were higher after SC administration.

Kinetics of zearalenone and its metabolites in relation to the duration of exposure

In order to evaluate the influence of repeated exposure on tissue concentrations, we compared the toxin concentrations in the pregnant females after a single exposure on GD20 with daily exposure from GD7 to GD20 (Figure 6). We chose SC administration since ZEA values were below the limits of detection in the placenta and whole foetus after oral exposure. No difference in bodyweight gain was observed between the two exposure conditions. After repeated

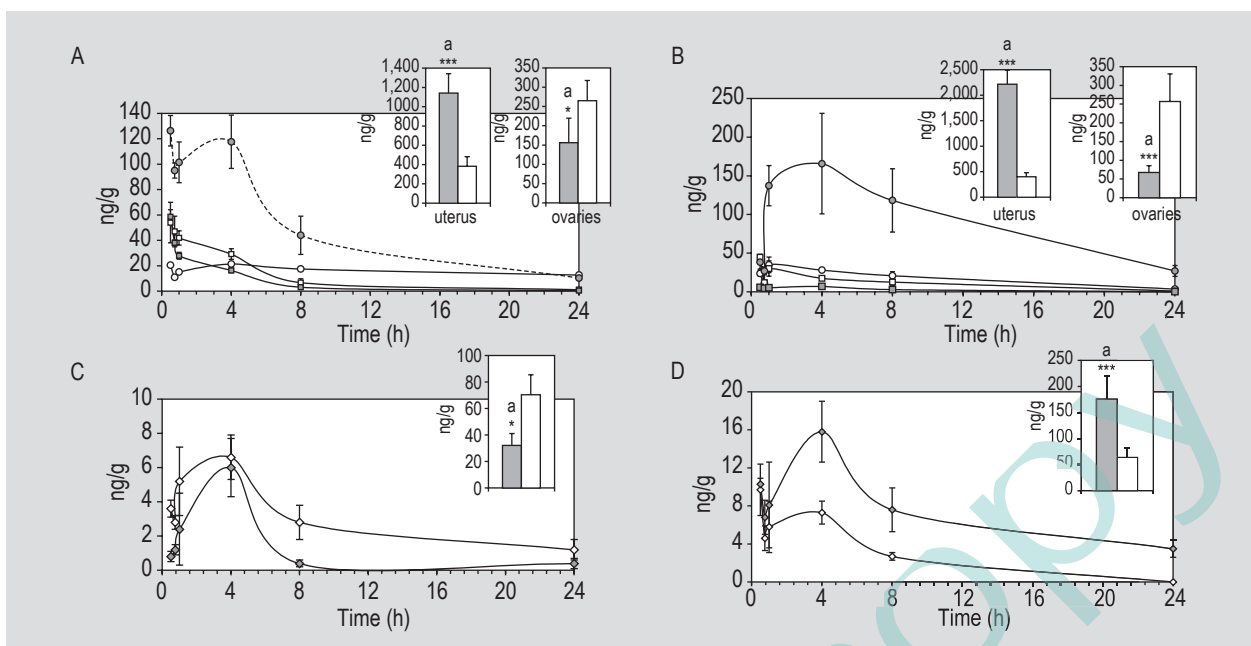


Figure 4. Kinetics of zearalenone (ZEA) (A, C) and its metabolites ZEA-glucuronide (B, D) in the uterus, ovaries (A, B) and mammary gland (C, D): effect of pregnancy. Virgin females (grey symbols) and pregnant females (white symbols) were orally administered 1 mg/kg ZEA. Area under the curve represented in the inset. Mean \pm SD, n=5. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

^a Significantly different from pregnant female.

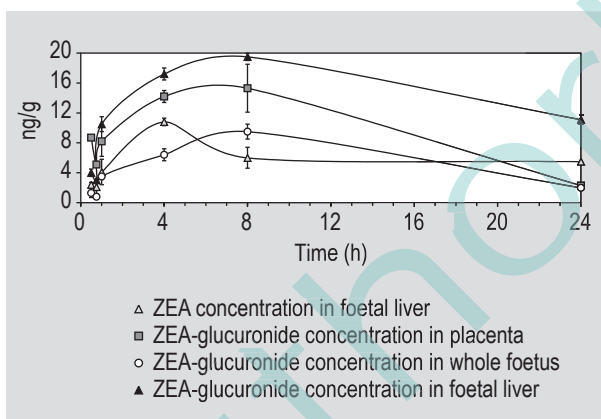


Figure 5. Kinetics of zearalenone (ZEA) and its metabolite ZEA-glucuronide in the placenta, whole foetus and foetal liver. The pregnant females were orally exposed to ZEA (1 mg/kg) at GD20. Concentrations of ZEA were below the detection limit in the placenta and the whole foetus. Mean \pm SD, n=5.

exposure of the females, all the toxins were significantly increased in the foetal liver. ZEA and α -ZOL increased in the whole foetus. The ZEA concentration increased 2.4- and 3.5-fold in the liver of the pregnant females and the whole foetus, respectively. α -ZOL concentration increased 2- and 2.5-fold in the liver of the pregnant females and the foetus, respectively. ZEA concentration also increased in the small intestine (2.3-fold) and the urine (2.2-fold), but decreased 2-fold in the plasma of pregnant females. α -ZOL concentration decreased 4-fold in the colon, and

Table 1. Foetal/maternal ratio¹ of zearalenone (ZEA) and ZEA-glucuronide. Pregnant females were orally administered 1 mg/kg ZEA at GD20.

Time after exposure (h)	ZEA	ZEA-glucuronide
1	0.28	0.12
4	0.31	0.08
8	0.37	0.48
24	1.1	1.2

¹ Ratios using liver concentrations in the foetus and the mother were calculated as described in the data analysis section of the materials and methods.

its glucuronide increased 5- and 4-fold in the colon and urine, respectively.

We also compared the exposure of suckling rats after a single or repeated exposure of the nursing females (Table 3), as an approach to mammary transfer. The toxins were undetectable after a single exposure to 1 mg/kg ZEA but we could detect low doses of ZEA and its glucuronide in the intestine and urine of young rats after a single exposure of mothers to 15 mg/kg ZEA, ZEA-glucuronide being the major form. After repeated exposure of the females over 3 days, the concentration of ZEA, α -ZOL and both glucuronides was significantly increased in the stomach contents and the tissues of young rats compared to a single

Table 2. Concentration of zearalenone and its metabolites in tissues of pregnant females: comparison of oral and subcutaneous exposure.^{a,b}

	time (h)	ZEA		ZEA-glucuronide		α-ZOL		α-ZOL-glucuronide	
		oral	sc	oral	sc	oral	sc	oral	sc
small intestine	0.5	352.4±162.2	61.4±4.6 ^c	3,903.6±1,377.1	621.8±117.2 ^c	5.7±2.2	<LOD ^c	84.6±37.3	22.1±8.3 ^c
	1	167.9±99.3	58.2±5.4 ^c	1,730.1±613.8	1,339.6±268.2 ^c	3.6±0.4	<LOD ^c	28.9±14.5	37.9±17.3 ^c
	4	300.1±104.3	52.8±16.1 ^c	2,193.4±643.2	1,148.5±392.7 ^c	7.0±3.8	2.9±2.6 ^c	91.4±1.9	32.5±14.8 ^c
	8	118.4±62.1	6.9±3.4 ^c	570.7±82.3	155.7±53.1 ^c	4.7±3.7	<LOD ^c	34.9±18.2	13.0±6.9 ^c
colon	0.5	14.9±10.1	17.5±1.4	6.4±0.5	12.7±7.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	1	22.7±13.0	26.5±20.3	9.3±4.2	18.1±8.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4	159.6±80.2	155.4±18.7	72.3±24.2	32.5±16.8	1.8±1.0	<LOD	3.6±1.2	<LOD
	8	30.8±18.1	56.6±7.4	45.8±22.5	14.9±8.2	6.4±3.2	6.2±3.1	3.8±1.7	<LOD
liver	0.5	27.1±5.9	28.8±9.1	152.8±30.6	122.9±14.0	10.0±4.5	14.1±9.6	22.1±1.8	19.1±7.6
	1	14.8±9.1	22.4±5.0	78.2±41.7	94.4±39.9	6.8±2.4	12.3±1.3	8.3±2.5	10.9±2.1
	4	34.6±7.3	17.7±7.1	133.2±49.3	49.8±22.4	13.4±8.3	10.2±3.0	18.3±11.4	8.4±3.1
	8	16.3±10.0	4.0±2.8	40.9±10.4	2.7±1.4	5.5±2.4	1.4±0.9	11.7±5.8	2.7±1.3
kidney	0.5	16.8±6.0	37.3±3.1 ^c	63.5±14.5	55.3±4.7	<LOD	1.3±0.7	<LOD	2.1±0.2
	1	8.4±1.4	21.4±2.3 ^c	28.5±14.8	26.4±7.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4	6.4±0.8	10.6±5.5 ^c	35.2±2.6	21.6±5.0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	8	5.6±2.2	4.1±1.3 ^c	27.5±7.4	2.5±0.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
mammary gland	0.5	3.6±1.1	85.6±26.4 ^c	9.7±5.2	59.5±36.3 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	1	6.6±3.9	59.7±26.1 ^c	7.3±5.4	17.8±3.7 ^c	<LOD	3.6±2.4	<LOD	2.9±2.7
	4	5.2±2.6	36.3±9.1 ^c	5.8±2.4	6.8±5.3 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	8	2.8±2.1	8.5±3.2 ^c	2.7±0.8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
uterus	0.5	20.5±9.0	18.1±8.4	23.9±7.4	31.6±5.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	1	15.1±5.6	13.5±2.5	34.9±17.5	26.8±13.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4	21.4±4.2	8.6±2.8	28.3±4.6	23.6±4.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	8	17.5±3.1	7.0±1.7	20.9±11.0	6.9±2.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
ovaries	0.5	54.2±9.3	45.6±6.9	51.8±5.7	67.5±19.7	<LOD	<LOD	<LOD	16.1±7.3 ^c
	1	41.9±14.3	38.9±1.7	30.1±2.9	59.8±27.9	<LOD	<LOD	<LOD	12.5±6.5 ^c
	4	29.2±11.7	24.0±9.7	17.6±1.1	26.9±16.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	8	6.7±6.8	15.4±6.1	12.7±2.9	15.3±13.0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
placenta	0.5	<LOD	13.4±5.3 ^c	8.7±0.4	18.2±4.6 ^c	<LOD	2.3±1.6	<LOD	1.4±0.9
	1	<LOD	9.0±3.2 ^c	8.2±4.5	21.6±2.7 ^c	<LOD	1.5±0.2	<LOD	1.5±0.3
	4	<LOD	7.2±1.5 ^c	14.2±1.6	30.3±11.4 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	1.5±1.2
	8	<LOD	<LOD ^c	15.3±8.5	6.8±4.5 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
foetus	0.5	<LOD	9.7±5.8 ^c	<LOD	25.9±4.2 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	1	<LOD	8.4±2.7 ^c	3.5±1.9	37.8±11.8 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	4	<LOD	6.4±1.3 ^c	6.4±1.7	73.4±33.1 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	4.7±2.2
	8	<LOD	4.3±2.1 ^c	58±3.8	6.3±2.4 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
foetus liver	0.5	2.4±0.6	28.5±3.8 ^c	4.0±0.5	54.9±21.4 ^c	<LOD	2.6±1.8	<LOD	6.1±0.9 ^c
	1	4.1±1.8	29.5±2.4 ^c	10.5±3.8	77.5±6.7 ^c	<LOD	3.2±0.9	<LOD	3.0±2.8 ^c
	4	10.8±3.4	8.2±3.7 ^c	11.2±1.7	43.9±7.6 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	2.8±1.5 ^c
	8	6.0±0.5	5.2±2.3 ^c	19.5±3.3	7.9±3.3 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD ^c

^a Abbreviations used: ZEA = zearalenone; ZOL = zearalenol; LOD = limit of detection; AUC = area under the curve; GD = gestation day; sc = subcutaneous.

^b Pregnant females were orally or subcutaneously administered 1 mg/kg ZEA at GD20. Tissue samples were withdrawn 0.5, 1, 4 and 8 h after exposure. Values are mean ± SD, n=5.

^c AUC significantly different from the AUC consecutive to oral exposure to 1 mg/kg ZEA, *P*<0.05.

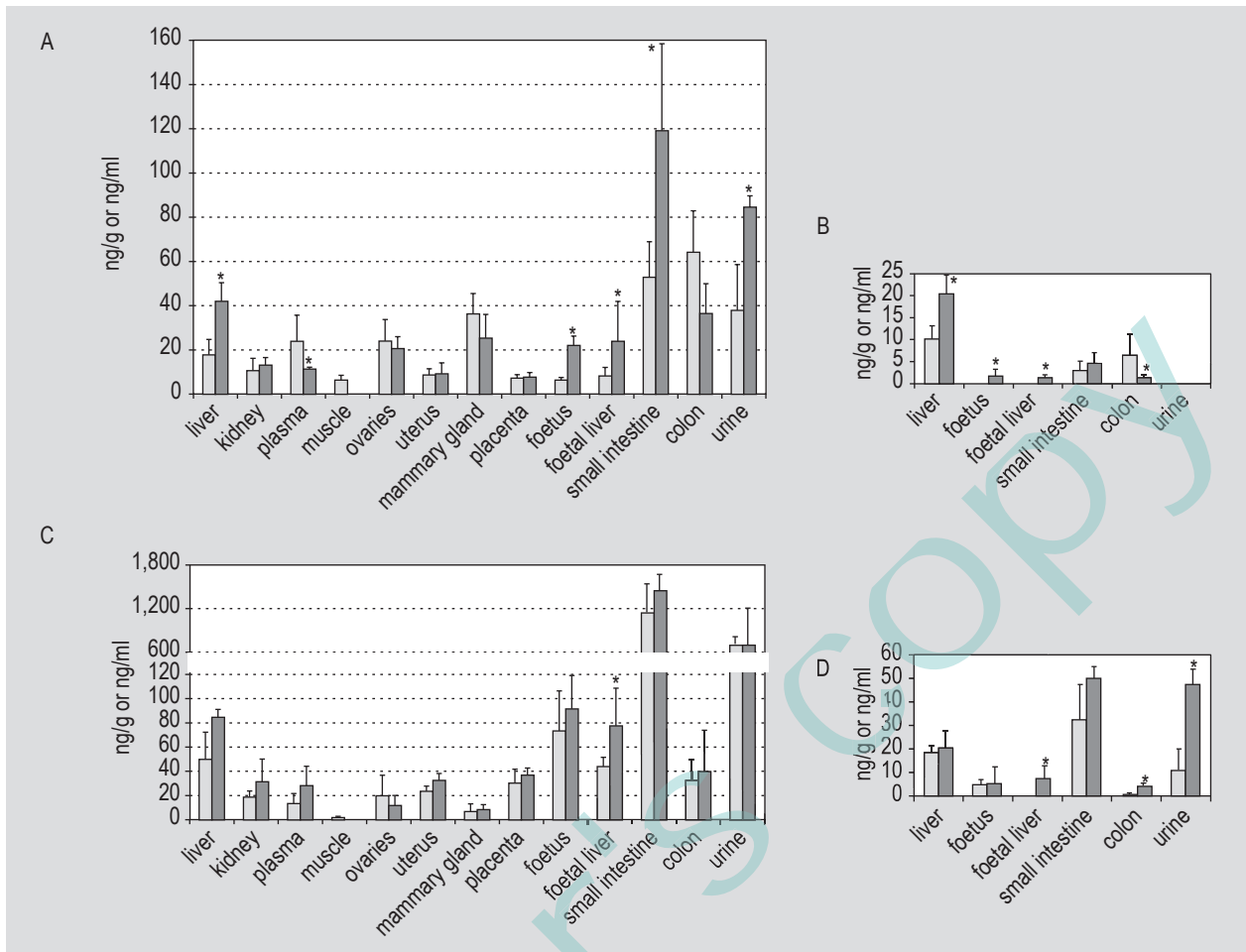


Figure 6. Tissue concentrations of zearalenone (ZEA) (A) and its metabolites α -zearalenol (α -ZOL) (B), ZEA-glucuronide (C) and α -ZOL-glucuronide (D) in pregnant females: comparison of single and repeated exposure. Females were exposed (1 mg/kg ZEA, subcutaneous) either at GD20 (grey bars) or daily from GD7 to GD20 (black bars). Concentrations were measured 4 h after the last exposure. Mean \pm SD, n=5. * Significantly different from toxin concentration after single exposure, $P < 0.05$.

exposure. The percentage of the maternal dose found in the young rats was 0.028 and 0.34% after repeated exposure to 1 and 15 mg/kg ZEA, respectively.

4. Discussion

This study was undertaken to clarify the metabolism, distribution and elimination of ZEA within the body, and evaluate the influence of gender and physiological status on the pharmacokinetics of the toxin. There is increasing evidence that ZEA can act as an endocrine disruptor (Frizzell *et al.*, 2011; Massart *et al.*, 2008; Metzler *et al.*, 2010). Given that exposure of pregnant and nursing females can adversely affect the foetal and neonatal stages, we also determined the fate of ZEA and its metabolites in both stages as a result of maternal exposure.

Our findings confirmed that ZEA was rapidly absorbed, metabolised, and widely distributed in accordance with previous observations in rodents (Appelgren *et al.*, 1982;

Ueno *et al.*, 1977). The reduced metabolite α -ZOL and the glucuronides of ZEA and α -ZOL were the main metabolites detected in our models. ZEA-glucuronide was the predominant form, in agreement with Mirocha *et al.* (1981) and was detected in all organs. α -ZOL and its corresponding conjugate were detected in the small intestine, liver and urine. Data on the *in vivo* production of α -ZOL and β -ZOL in rats are scarce. As in our results, Fitzpatrick *et al.* (1988) reported the production of α -ZOL as a major reduced metabolite in young female rats that were orally dosed with either 1 or 100 mg ZEA/kg bw. Mirocha *et al.* (1981) reported a weak production of both reduced metabolites in rats following a dietary administration of 5 mg ZEA. The absence of detection of β -ZOL and its glucuronide in our study may be due to the use of lower doses to expose the animals, and due to higher detection limits for β -ZOL than for α -ZOL. However, β -ZOL has been shown to be produced to a lesser extent than α -ZOL (Mirocha *et al.*, 1981).

Table 3. Concentration of zearalenone and its metabolites in tissues of suckling young rats: comparison of single and repeated exposure.^{a,b}

ZEA dose (mg/kg)	Exposure	Stomach contents	Intestine	Plasma	Urine	Liver	Kidney
ZEA							
1	single	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	repeated	40.6±9.7 ^c	8.2±5.8 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15	single	173.9±62.2	16.6±2.3	<LOD	16.5±2.1	<LOD	<LOD
	repeated	6,816.2±3,751.7 ^c	431.0±173.8 ^c	13.4±1.0 ^c	83.4±19.8 ^c	24.2±9.0 ^c	22.9±9.1 ^c
ZEA-glucuronide							
1	single	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	repeated	8.6±5.2 ^c	82.2±43.6 ^c	<LOD	188.4±58.3 ^c	<LOD	<LOD
15	single	38.4±2.2	179.9±21.4	<LOD	547.9±60.3	<LOD	<LOD
	repeated	887.3±454.1 ^c	3,175.5±1,160.7 ^c	173.1±45.7 ^c	6,244.4±1,153.4 ^c	89.3±21.7 ^c	384.7±163.0 ^c
α -ZOL							
1	single	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	repeated	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15	single	<LOD	2.0±1.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	repeated	7.4±4.1 ^c	12.7±8.4 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
α -ZOL-glucuronide							
1	single	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	repeated	<LOD	3.8±1.1 ^c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15	single	<LOD	6.8±2.1	<LOD	15.3±3.3	<LOD	<LOD
	repeated	4.2±3.2 ^c	93.5±25.8 ^c	<LOD	158.6±33.1 ^c	<LOD	<LOD

^a Abbreviations used: ZEA = zearalenone; ZOL = zearalenol; sc = subcutaneous; LOD = limit of detection.

^b Nursing females were daily administered 1 or 15 mg/kg ZEA (sc) from day 15 to day 17 after rats birth, or exposed to a single administration of 1 or 15 mg/kg ZEA at day 17 after rats birth. Tissue and liquid samples of the suckling young rats were withdrawn 4 h after the last exposure of the mothers to ZEA. Values are mean ± SD, n=5.

^c Significantly different from the tissue concentration consecutive to a single exposure, $P < 0.05$.

Our results on the kinetics were in agreement with other recent studies (oral exposure of male rats to ZEA, Shin *et al.*, 2009b). The second peak phenomenon has been reported in pigs after oral administration (Biehl *et al.*, 1993), and in rats after oral administration (Mallis *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2009a). As shown by Shin *et al.* (2009a) and Dänicke *et al.* (2005) the biliary excretion of ZEA and its glucuronide conjugates, then hydrolysed in the gut and subsequently reabsorbed, may produce this second peak. High concentrations of ZEA and its glucuronide in the small intestine and, to a lesser extent, in the colon could be associated to the enterohepatic recirculation of ZEA. The greatest toxin concentrations were measured in the small intestine and the urine, in accordance with previous studies reporting that both faeces and urine were major routes of elimination (Biehl *et al.*, 1993; Fitzpatrick *et al.*, 1988; Olsen *et al.*, 1985; Ueno *et al.*, 1977). The detection of α -ZOL and its glucuronide in the small intestine and the liver were consistent since both organs are mainly involved in the production of reduced metabolites and their conjugates (Olsen *et al.*, 1987; Videmann *et al.*, 2008).

The concentration of ZEA and its conjugate in the ovaries and uterus was similar or higher than the liver concentration (in agreement with Appelgren *et al.*, 1982; Ueno *et al.*, 1977), suggesting a particular affinity of both organs for the toxin and/or the presence of glucuronidation enzymes. In fact, it has been shown that these extrahepatic steroid target tissues express steroid glucuronidation enzymes (Becedas *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 2007).

Significantly higher concentrations of ZEA in the plasma and the small intestine of males suggested a higher absorption capacity. Consecutively, ZEA-conjugate and α -ZOL concentrations were higher in the small intestine and the liver. A higher glucuronidation potential in the male intestine could be attributed to different isoenzymes responsible for ZEA metabolism (Rush *et al.*, 1983). Indeed, Shelby *et al.* (2003) showed gender differences in mRNA levels of UGT2 isoenzymes in rat liver, and Pfeiffer *et al.* (2010) recently demonstrated the involvement of different isoforms of UGT1A and UGT2B in ZEA glucuronidation. Differences were also observed between the kinetics of non-pregnant and pregnant rats. As suggested by Inoue *et*

al. (2004), the glucuronidation of bisphenol A by UGT2B1 in the liver was decreased during pregnancy, as well as biliary excretion of glucuronides, and the venous excretion of the conjugates was facilitated. In our study, intestinal and hepatic glucuronidation seemed higher in pregnant females. It is possible that the isoforms of UGT1A, involved in ZEA glucuronidation, were differentially regulated. In addition, Cao *et al.* (2002) reported that the hepatic MRP2 and MRP3 membrane transporters, involved in glucuronide canalicular efflux, decreased by 50% in pregnant rats. This decrease in glucuronide transport was associated with an increase in the toxins in the organs. Conversely, ZEA and ZEA-glucuronide were significantly more concentrated in the uterus of virgin females. Since it has been shown that the rat uterus is able to efficiently conjugate oestrogenic xenobiotics (Matsumoto *et al.*, 2007), we can hypothesise that pregnancy decreased the glucuronidation ability in the uterus. Besides enzymatic properties suggesting metabolic differences in both female states, the physiological changes during pregnancy (in particular the increase in blood volume and the increase in renal clearance, Fujitani and Baldisseri, 2005) may significantly affect the kinetics in pregnant rats. In this way, the lower concentration of ZEA in the kidneys of pregnant females, compared to males and virgin females, could be the result of an increase of renal clearance.

The significant difference in α -ZOL concentration between virgin and pregnant females was unexpected. Our results suggested a higher potential of α -ZOL production and a lower elimination in pregnant females while α -ZOL glucuronidation was slightly increased or unchanged. This might enhance the susceptibility of pregnant females to the adverse effects of the toxin, since α -ZOL possesses the highest biological activity.

ZEA easily crossed the placenta during pregnancy, as previously shown in rats (Bernhoft *et al.*, 2001) and pigs (Dänicke *et al.*, 2007). In our work, toxin concentrations (sum of ZEA and its glucuronide) in the placenta were about 2.2 times higher than toxin concentrations in the whole foetus 4 h after oral administration. Bernhoft *et al.* (2001) showed that placental levels were approximately 6.7- and 10-fold higher than those of the foetus 4 h after intravenous and intragastric administration, respectively. In their study, the animals were exposed at GD18, whereas our rats were exposed at GD20, suggesting that at the very end of the gestation, morphological changes in the placenta may make it more permeable to the toxins. Indeed changes in permeability and transporter expression occur throughout pregnancy (Wang *et al.*, 2006).

We chose to compare the metabolism and distribution of ZEA after oral and SC administration, since many *in vivo* studies used this latter method of exposure to evaluate ZEA effects (Mehmood *et al.*, 2000; Nikaido *et al.*, 2005;

Takemura *et al.*, 2007; Yuri *et al.*, 2004). In most organs, except the small intestine, the tissue concentrations of ZEA and its metabolites were higher after SC administration, in agreement with other studies (Mallis *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2009a) that reported a lower oral bioavailability and a greater systemic absorption in rats. The elimination of the toxins from the tissues was slower after oral exposure, in agreement with Shin *et al.* (2009a) who showed that the half-life of ZEA was significantly prolonged after oral administration. The small intestine was the only tissue showing higher toxin concentrations after oral exposure. This suggests that ZEA could have been trapped in the intestinal cells. Indeed ZEA is highly insoluble in water (solubility 20 μ g/100 ml, Kuiper-Goodman *et al.*, 1987) and might precipitate and accumulate in the intestinal cells.

After repeated exposure of the pregnant females, ZEA and α -ZOL, but not their glucuronides, were accumulated in the major organs involved in ZEA metabolism, i.e. small intestine and liver. This suggests that the amount of ZEA entering the cells exceeded the capacity of conjugating enzymes. Indeed it has been shown that the UGT(s) involved in ZEA-glucuronide formation are not only saturated but also inhibited by high substrate concentrations in human intestinal cells (Videmann *et al.*, 2008). This saturation occurred with ZEA concentrations of 20 μ M, far higher than the concentrations used in this study. However, differences in species and cell environment may influence enzymatic activities.

Since our results on foetal kinetics showed a slower elimination of the toxins, the significant increase in toxin concentrations in foetal liver suggests that the toxins, which easily crossed the placenta, were accumulated in foetal tissues. The increase in glucuronide concentration was higher in foetal liver than in maternal tissues, suggesting the ability of the foetus to conjugate ZEA (UGT2B isoforms are present in foetus, Matsumoto *et al.*, 2002).

Determination of ZEA and metabolite concentrations in the stomach content of suckling rats was a first approach to mammary transfer. After repeated exposure of the nursing females over 3 days, the concentration of ZEA, α -ZOL and both glucuronides was significantly higher in the stomach contents and the tissues of young rats, when compared to a single exposure. Previous studies have reported higher transmission in cow milk after repeated exposure than after single exposure (Mirocha *et al.*, 1981; Prelusky *et al.*, 1990), but these studies only showed milk contamination and did not analyse tissue impregnation in the newborn. In our work, ZEA strongly predominated in the stomach of young rats, as well as in the maternal mammary gland, but not in the other tissues of young animals. This suggests that ZEA glucuronide was mostly produced by newborn metabolism, and not only transferred with the milk. After repeated exposure, α -ZOL-glucuronide was strongly detected in the

intestine and urine of young rats, confirming the ability of the newborn to metabolise ZEA.

5. Conclusions

Our results highlighted the influence of gender and pregnancy in the metabolism and distribution of the mycotoxin ZEA. In particular we suggested a higher absorption capacity and higher glucuronidation potential of ZEA in the male intestine. The reduced metabolite α -ZOL, which possesses the higher biological activity, was produced significantly more in males and pregnant females than in virgin females. Our study on placental and mammary transfer showed that in cases of repeated exposure of the mother to ZEA, the foetus and newborn were more exposed to ZEA and its metabolites, the foetus also concentrating the toxins by slower elimination. This might enhance the susceptibility of such vulnerable stages to the adverse effects of the toxin. As glucuronides are the main forms detected in all organs, further work needs to be carried out to evaluate the potential biological activity of such conjugates and the health risk that these metabolites may present.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from ANR (Grant 415 178C). This funding had no involvement in study design, collection, analysis and interpretation of data.

References

- Appelgren, L.E., Arora, R.G. and Larsson, P., 1982. Autoradiographic studies of [3 H] zearalenone in mice. *Toxicology* 25: 243-253.
- Aste, N., Watanabe, Y., Shimada, K. and Saito, N., 2008. Sex- and age-related variation in neurosteroidogenic enzyme mRNA levels during quail embryonic development. *Brain Research* 1201: 15-22.
- Becedas, L., Lundgren, B. and De Pierre, J.W., 1998. Characterization of the UDP-glucuronosyl-transferase isoenzyme expressed in rat ovary and its regulation by gonadotropins. *Biochemical Journal* 332: 51-55.
- Belli, P., Bellaton, C., Durand, J., Balleydier, S., Milhau, N., Mure, M., Mornex, J.F., Benahmed, M. and Le Jan, C., 2010. Fetal and neonatal exposure to the mycotoxin zearalenone induces phenotypic alterations in adult rat mammary gland. *Food and Chemical Toxicology* 48: 2818-2826.
- Bernhoft, A., Behrens, G.S., Ingebrigtsen, K., Langseth, W., Berndt, S., Haugen, T.B. and Grotmol, T., 2001. Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. *Reproductive Toxicology* 15: 545-550.
- Biehl, M.L., Prelusky, D.B., Koritz, G.D., Hartin, K.E., Buck, W.B. and Trenholm, H.L., 1993. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 121: 152-159.
- Cao, J., Stieger, B., Meier, P.J. and Vore, M., 2002. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anions transporters in pregnancy. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 83: 757-766.
- Collins, T.F., Sprando, R.L., Black, T.N., Olejnik, N., Eppley, R.M., Alam, H.Z., Rorie, J. and Ruggles, D.I., 2006. Effects of zearalenone on *in utero* development in rats. *Food and Chemical Toxicology* 44: 455-465.
- Dänicke, S., Brüßow, K.P., Goyarts, T., Valenta, H., Ueberschär, K.H. and Tiemann, U., 2007. On the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1565-1574.
- Dänicke, S., Swiech, E., Buraczewska, L. and Ueberschär, K.H., 2005. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89: 268-276.
- Davies, M.J. and Norman, R.J., 2002. Programming and reproductive functioning. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13: 386-392.
- Fitzpatrick, D.W., Arbuckle, L.D. and Hasen, A.M., 1988. Zearalenone metabolism and excretion in the rat: effect of different doses. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 23: 343-354.
- Fujitani, S. and Baldisseri, M.R., 2005. Hemodynamic assessment in a pregnant and peripartum patient. *Critical Care Medicine* 33: 354-361.
- Frizzell, C., Ndossi, D., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G., Sorlie, M., Muller, M., Elliott, C.T. and Connolly, L., 2011. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters* 206: 210-217.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H. and Poskanzer, D.C., 1971. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England Journal of Medicine* 284: 878-881.
- Hess, R.A., 2000. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Reviews of Reproduction* 5: 84-92.
- Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S., Ishii, T., Fukushima, Y., Iwano, H., Yokota, H. and Kato, S., 2004. Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and non pregnant female rats. *Drug Metabolism and Disposition* 33: 55-59.
- Kuiper, G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B.O., 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 β . *Endocrinology* 139: 4252-4263.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. and Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7: 253-306.
- Malekinejad, H., Van Tol, H.T.A., Colenbrander, B. and Fink-Gremmels, J., 2006. Expression of 3 α - and 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in COCs and granulosa cells determines zearalenone biotransformation. *Toxicology in Vitro* 20: 458-63.
- Mallis, L.M., Sarkahian, A.B., Harris, H.A., Zhang, M.Y. and McConnel, O.J., 2003. Determination of rat oral bioavailability of soy-derived phytoestrogens using an automated on-column extraction procedure and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 796: 71-86.
- Massart, F., Meucci, V., Saggese, G. and Soldani, G., 2008. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *Journal of Pediatrics* 152: 690-695.

I.4. RESULTATS-DISCUSSION

Nos résultats ont d'abord confirmé que la ZEN était rapidement absorbée, métabolisée, et largement distribuée. Les formes conjuguées à l'acide glucuronique de la ZEN et de l' α -ZEL prédominent. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. Nous avons ensuite mis en évidence des différences de distribution et de métabolisme des molécules entre les mâles, les femelles nullipares et les femelles gestantes. En particulier, une plus forte capacité d'absorption de la ZEN et un plus fort potentiel de conjugaison aux glucuronides chez les mâles, tandis que la gestation semble diminuer le potentiel de glucuronidation dans l'utérus. L'originalité de notre étude a concerné l'exposition du fœtus durant la gestation et l'exposition du nouveau-né via le lait maternel, que nous avons quantifiées. Nous avons montré que les tissus fœtaux, dans lesquels la vitesse d'élimination des toxines est plus faible, accumulent ces molécules qui traversent aisément le placenta, et que le foie fœtal est capable de conjuguer la ZEN. Après exposition réitérée des femelles allaitantes, la ZEN et ses métabolites sont préférentiellement retrouvés dans l'estomac des nouveaux-nés, ceux-ci étant également capables de conjuguer la molécule mère.

I.5. CONCLUSION

Ces premiers résultats ont mis en évidence des différences de comportement toxicocinétique de la ZEN en fonction du genre et du statut hormonal. Ils ont également mis en lumière l'exposition fœtale et néonatale qui résulte de l'exposition maternelle. Cette dernière augmente en situation d'exposition réitérée, ce qui pourrait accentuer la vulnérabilité des stades fœtaux et néonataux, particulièrement sensibles aux effets indésirables des toxines aux propriétés de PEs.

II. EVALUATION DE L'EFFET DE LA ZEARALENONE SUR L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC MAJEURS

II.1. DANS LE CONTEXTE D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE

II.1.1. *In Vivo*

II.1.1.a. CONTEXTE DE L'ETUDE

Par l'activité oestrogénique qui résulte de son affinité pour les ESRs, la ZEN régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la croissance cellulaire, le développement, et la régulation du cycle cellulaire. Les effets hormonaux de la ZEN affectent principalement le fonctionnement de l'appareil reproducteur, et de récentes données indiquent qu'une exposition *in utero* induit des anomalies dans le développement de l'appareil reproducteur et les glandes mammaires des petits. Les transporteurs ABC membranaires sont responsables de l'efflux actif de nombreux xénobiotiques et sont impliqués dans la protection cellulaire contre la toxicité consécutive à l'accumulation des xénobiotiques. Une modification de leur expression pourrait moduler l'exposition des cellules et des organes aux différents substrats, endogènes et exogènes, pris en charge par les transporteurs. L'expression des ABC étant en partie régulée par les hormones via l'activation des ESRs et PGR, nous avons choisi d'explorer *in vivo* la capacité de la ZEN à moduler l'expression des transporteurs ABC. Le choix d'un modèle de ratte gestante exposée durant les deux derniers tiers de gestation a permis d'étudier les modulations d'expression dans les organes maternels et fœtaux.

II.1.1.b. OBJECTIFS

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de la ZEN sur l'expression des transporteurs ABC (Abcb1a/b, Abcg2, Abcc1, Abcc2, Abcc3) et des récepteurs nucléaires aux estrogènes (Esr1, Esr2) et à la progestérone (PgrA/B) dans un modèle de ratte gestante. Les tissus maternels (utérus, ovaires, placenta, glande mammaire, foie, intestin grêle) et fœtaux (foie) ont été choisis en raison de leur potentiel de réponse aux estrogènes. En parallèle nous avons quantifié la ZEN et ses métabolites majeurs dans les tissus en fin de gestation.

II.1.1.c. RESULTATS: PUBLICATION 2

Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver

Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Benahmed, M., Prouillac, C., Lecoœur, S. 2012
Toxicol Lett, 211, 246-56



Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver

Farah Koraichi^{a,b}, Bernadette Videmann^a, Michelle Mazallon^a, Mohamed Benahmed^b,
Caroline Prouillac^a, Sylvaine Lecoecur^{c,*}

^a Université de Lyon, VetAgro Sup, USC 1233 INRA-VetAgro Sup, Métabolisme et Toxicologie Comparée des Xénobiotiques, F-69280 MARCY L'ETOILE, France

^b U895 INSERM-Université de Nice-Sophia Antipolis, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, 151 route de Ginestière, 06204 Nice, France

^c CarMeN, INRA 1235/INSERM 1060/UCBL1/INSA Lyon/HCL, Faculté de Médecine LYON SUD-BP 12, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69921 Oullins Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2011

Received in revised form 29 March 2012

Accepted 2 April 2012

Available online 11 April 2012

Keywords:

ABC transporters

Nuclear receptors

Estrogenic mycotoxin

In vivo

Pregnancy

Zearalenone

ABSTRACT

The mycotoxin zearalenone (ZEN) is produced by a variety of *Fusarium* fungi and contaminates numerous cereals, fruits and vegetables. Interacting with the estrogen receptors, ZEN and reduced metabolites zearalenols cause hormonal effects in animals. Few data are available on the effects of repeated exposure to ZEN, particularly during pregnancy. The aim of our work was to assess the impact of this toxin on the expression of ABC transporters and nuclear receptors in fetal liver and pregnant rats that were exposed daily (gestation day 7–20) to 1 mg/kg ZEN. Significant variations were observed, depending on the tissue type, the tissue origin (maternal or fetal), and the time of analysis after the last exposure to ZEN (4 h or 24 h). The modulations of expression were independent of the magnitude of tissue impregnation by ZEN and its metabolites. The maternal uterus was the most sensitive tissue: *Abcb1a*, *Abcb1b* and *Abcg2* mRNA and protein expressions were induced at both times, while *Abcc1*, *Abcc3* and *Esr1* mRNA and protein expressions were inhibited then induced 4 h and 24 h after exposure, respectively. In the fetal liver, *Abcb1a* and *Esr1* protein expression was inhibited at both times, while mRNA expression was induced 24 h after the last exposure to ZEN. These results suggested that ZEN exposure could impact maternal and fetal exposure to ABC transporters substrates, and influence fetus development through nuclear receptor modulation.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Zearalenone (ZEN) is produced by various *Fusarium* fungi species and is a non steroidal estrogenic mycotoxin that commonly contaminates cereal crops worldwide (Bennett and Klich, 2003; Zinedine et al., 2007). Animals and humans are exposed to ZEN via consumption of cereals and by-products. After oral or subcutaneous administration, ZEN is rapidly absorbed and reduced via intestinal and hepatic metabolism to α - and β -zearalenol (α -ZEL and β -ZEL). All the resulting compounds are conjugated with glucuronic acid (Appelgren et al., 1982; Malekinejad et al., 2006; Ueno

et al., 1977). ZEN and metabolites are widely distributed and mainly excreted in urine and feces in rodents, being barely detectable in the plasma 24 h after exposure (Biehl et al., 1993; Fitzpatrick et al., 1988; Olsen et al., 1985; Ueno et al., 1977; Videmann et al., 2012). Several *in vivo* studies report the toxicological effect of ZEN on the reproductive system, including alterations in the reproductive tract, uterus enlargement, decreased fertility, increased embryolethal resorptions, reduced litter size, and changes in the serum levels of progesterone and estradiol in laboratory animals (Bacha et al., 1993; Collins et al., 2006; D'Mello et al., 1999; Kuiper-Goodman et al., 1987). In humans, a few studies show a relationship between central precocious puberty or the incidence of endometrial adenocarcinomas and ZEN concentration in serum, tissue and foodstuffs (Massart et al., 2008; Szuetsz et al., 1997; Tomaszewski et al., 1998). The estrogenic activity of ZEN and its reduced metabolites stems from their binding to estrogen receptors (ESRs). ZEN compounds can easily adopt a 17 β estradiol (E2)-like conformation; this structural flexibility enables them to bind to these ESRs as natural estrogens (Shier et al., 2001). The receptor–ZEN complex is then transferred to the nucleus where it binds to estrogen response elements (ERE), thus activating target gene transcription. *In vitro* studies have demonstrated that ZEN acts as a full agonist

Abbreviations: ABC, ATP binding cassette; Abcb1a–b, ATP binding cassette, subfamily B, member 1A–B; Abcc1–3, ATP binding cassette, subfamily C, member 1–3; Abcg2, ATP binding cassette, subfamily G, member 2; Actb, actin, beta; Cq, cycle of quantification; E2, 17 β estradiol; ERE, estrogen response elements; ESR/Esr, estrogen receptor; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GD, gestation day; ND, not detectable; PGR/Pgr, progesterone receptor; SLC, solute carrier; ZEN, zearalenone; α -ZEL, alpha zearalenol; β -ZEL, beta zearalenol.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 26 23 59 28; fax: +33 4 26 23 59 16.

E-mail addresses: sylvaine.lecoeur@lyon.inra.fr, s.lecoeur@vet-lyon.fr (S. Lecoecur).

of ESR1 and a partial agonist of ESR2 (Bovee et al., 2004; Kuiper et al., 1998). ZEN was shown to regulate a panel of genes involved in cell growth and development, cell cycle regulation, signaling, metabolism and transport in the MCF-7 and the Ishikawa Plus cell lines, as endogenous estrogens did. In particular, some solute carrier transporter (SLC) genes (SLC7A5, SLC6A6, SLC1A4, SLC12A2, etc.) and ATP-binding cassette (ABC) transporter genes (ABCC3) have been shown to be modulated by ZEN (Boehme et al., 2009; Parveen et al., 2009).

The ABC transporter superfamily is among the most broadly expressed protein superfamilies known. Members of this superfamily are efflux pumps responsible for the active transport of a wide variety of compounds including nutrients, endogenous molecules, drugs and other xenobiotics across biological membranes in a large amount of tissues where they modulate the bioavailability of their substrates (Fig. 1). Among these transporters, ABCB1/MDR1, ABCG2/BCRP and ABCC1–3/MRP1–3 (see nomenclature in <http://www.genenames.org/genefamily/abc.php>) are involved in protecting tissues against xenobiotic accumulation and resulting toxicity. ABCC1 and ABCC3 are expressed throughout the body and are localized in most of them on the basolateral cellular side, resulting in the efflux of their substrates into the blood (Borst et al., 2000). ABCB1, ABCG2 and ABCC2 are localized at the apical surface of epithelial cells in the barriers of the organism (liver, intestine, uterine barrier, blood, etc.), (Borst et al., 2000; Fromm, 2004; Fukuda et al., 2006; Haimeur et al., 2004; Huls et al., 2009; Marín et al., 2005; Sarkadi et al., 2004; Vähäkangas and Myllynen, 2009). Recent data have reported a direct transport of ZEN and its metabolites by ABCC1–3 in the intestinal Caco2 cell line (Videmann et al., 2009), suggesting that transporters could modulate the bioavailability of ZEN.

Gene expression of ABC transporters is highly regulated by hormones (Scotto, 2003) through the activation of ESRs and progesterone receptors (PGR) (see nomenclature in http://www.genenames.org/cgi-bin/quick_search.pl). Indeed, Wang et al. (2008, 2006b) showed that the human ABCG2 gene was up- and down-regulated in placental BeWo cells by E2 and progesterone, respectively, possibly through PGRB and ESR2 activation.

Hormones modulated the expression of the murine *Abcg2* gene during pregnancy, probably through *Esr1*, *Esr2* and *Pgr* activation (Wang et al., 2006a). In addition, Zhang et al. (2006) reported the induction of ABCG2 mRNA by E2 in the ESR1 positive MCF-7 cells. Human ABCB1 and rodent *Abcb1a–b* genes were shown to be transcriptionally regulated by progesterone and estrogens *in vivo* and *in vitro* (Arceji et al., 1990; Coles et al., 2009; Evseenko et al., 2007; Vore and Leggas, 2008). *Abcc3* gene was transcriptionally down-regulated in rat liver during pregnancy, and human ABCB3 gene was inhibited by E2 through an ESR-dependent mechanism, in the human breast cancer MVLN cell line (Cao et al., 2002; Vendrell et al., 2004).

Evidence of the hormonal responsiveness of ABC transporter genes led us to consider the transcriptional modulation of these genes by ZEN. In the present study, we evaluated the *in vivo* effect of ZEN exposure on the expression of ABC transporters in a pregnant rat model. We also evaluated ZEN effect on the nuclear receptors *Esr1*, *Esr2* and *Pgr* expression since they are ZEN targets and estrogen-regulated genes (Diel et al., 2000; Höfer et al., 2010). The tissues of maternal (uterus, ovary, placenta, mammary gland, liver, small intestine) and fetal (liver) origin were chosen because of their estrogeno-sensitive properties. In the meantime, we quantified ZEN and its major metabolites in maternal and fetal liver at the end of pregnancy.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

ZEN was purchased from COGER (Morillons, France). α -ZEL and β -ZEL were ordered from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). DMSO, acetonitrile, methanol and chloroform were obtained from VWR International (Fontenay sous bois, France). Sodium pentobarbital came from the CEVA Santé Animale Laboratory (Libourne, France). The Rneasy® Mini kit, Rneasy® Lipid Tissue kit, Rneasy® Micro kit, RNAlater®, All tissue Protect® and the QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR kit were provided by Qiagen (Courtaboeuf, France). The QuantiTect™ RiboGreen® RNA Reagent and kit was obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). HPLC grade water prepared using a milli-Q plus system (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) was used for preparing HPLC eluents.

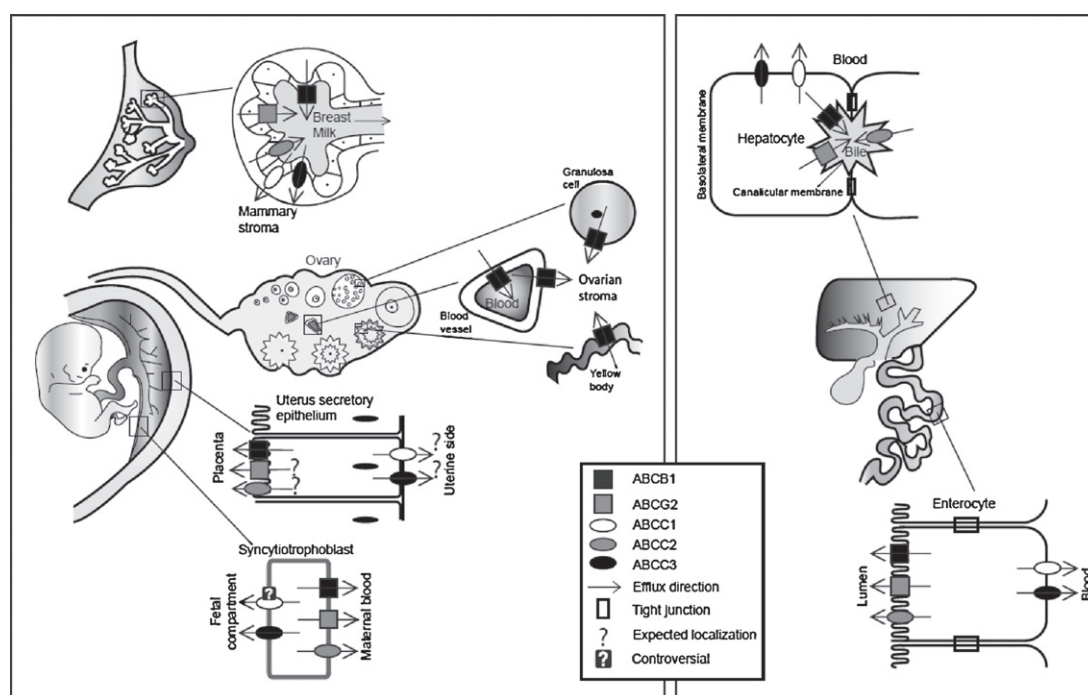


Fig. 1. Tissue distribution of ABC transporters and efflux direction.

Table 1
Sequences and concentrations of oligonucleotide primers and amplicon length.

Gene (GenBank™ accession number)	Primer sequence (5'–3')	Primer concentrations (nM)	Amplicon length (bp)
<i>Gapdh</i> (NM017008)	NP (Rn.Gapd.1.SG QuantiTect Primer Assay ^a)	FP 500 RP 500	149
<i>Actb</i> (NM031144)	NP (Rn.Actb.1.SG QuantiTect Primer Assay ^a)	FP 500 RP 500	145
<i>Abcb1a</i> (NM133401)	NP (Rn.Abcb1.2.SG QuantiTect Primer Assay ^a)	FP 500 RP 500	112
<i>Abcb1b</i> (NM012623)	FP ATGAAACTGCCCAAAATT RP CTTTCTGTGCAAGCTGA	FP 500 RP 500	155
<i>Abcg2</i> (NM181381)	NP (Rn.Abcg2.1.SG QuantiTect Primer Assay ^a)	FP 500 RP 500	87
<i>Abcc1</i> (NM022281) ^b	FP CGAATGTCCTCTGAGATGGAGAC RP CTCTACACGGCTGAATGGG	FP 400 RP 400	138
<i>Abcc2</i> (NM012833) ^c	FP CCAATGTTTTGAATGCGGAG RP AGGATCGATGAGTCCACCATG	FP 500 RP 500	100
<i>Abcc3</i> (NM080581) ^d	FP AAATGCGGTGCTATCGGAG RP AGCCTTACGGAGGTGTTGTTC	FP 500 RP 500	93
<i>Esr1</i> (NM012689) ^e	FP CAAA GCCTCGAATGG RP AGCTGCGGGCATTGAG	FP 250 RP 450	73
<i>Esr2</i> (NM012754) ^e	FP TTGGTGTAAGCAAGATCACTAGAG RP AACAGGGCTGGCAACTG	FP 500 RP 900	94
<i>Pgr</i> (NM022847) ^e	FP GCAATTGGCTTAA GACAGAAAGG RP ACAAGATCATGCAAGCTGTCAAG	FP 500 RP 900	89

NP, not provided by the manufacturer.

^a Qiagen product designation, FP, forward primer; RP, reverse primer.

^b St-Pierre et al. (2004).

^c Nishimura et al. (2005).

^d Nishimura et al. (2006).

^e Ceccatelli et al. (2006).

2.2. Animals

Pregnant female Wistar rats (10 wk old, weight 230–290 g) from Janvier Centre Elevage (Le Genet St Isle, France) were kept in plastic rat cages, and had free access to food and water. They were maintained on a 12/12 h light/dark cycle at 21 ± 2 °C. All the procedures were conducted in accordance with the regulations of the Ethics Committee of VetAgro Sup, Lyon. Animals were randomly allotted to four groups: groups 1 and 2, each consisting of 6 pregnant rats treated with ZEN, and groups 3 and 4 (negative controls) including 5 pregnant rats treated with vehicle (DMSO). The rats were received on gestation day (GD) 5 and treated from GD7 to GD20 by a daily subcutaneous (SC) injection of 1 mg/kg ZEN for groups 1 and 2, and 0.2 µl/kg DMSO for groups 3 and 4. The SC route was chosen to avoid variability due to intestinal microflora (Kuiper–Goodman et al., 1987). The dose of 1 mg/kg was determined after a preliminary range dosing study. It represented the lowest dose allowing ZEN and metabolites quantification in the tissues. The animals were sacrificed after anesthesia by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (0.5 ml/kg) 4 h (groups 1 and 3) and 24 h (groups 2 and 4) after the last exposure to ZEN. Fragments of maternal organs (small intestine ≈ 10 cm from the duodenum, placenta, mammary gland, ovary, uterus, liver) and fetal liver were quickly removed, then incubated overnight in the RNAlater[®] and the All Tissue Protect[®] at 4 °C and stored at –20 °C for mRNA and protein expression analysis, respectively, or directly stored at –20 °C, for HPLC analysis.

2.3. Quantification of ZEN and its metabolites

The samples (0.2–4 g of tissue) were extracted with 40 ml of methanol/water/0.25% H₃PO₄ by using a Ultra Turrax[®] T25 basic (IKA, Staufen, Germany) for 1 min. The extract was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to a flask and evaporated at 50 °C with a rotary evaporator under reduced pressure until 5 ml of residual water remained. pH was adjusted to 6.8 with NaOH 1 N. The sample was exactly divided in two tubes and adjusted to 8 ml with 50 mM phosphate buffer, pH 6.8. One tube was incubated with β glucuronidase (200 U) at 37 °C overnight to cleave the conjugates. Each sample was extracted twice with chloroform. The chloroform layer was evaporated with a rotary evaporator at 50 °C under reduced pressure. The flask was rinsed three times with 1 ml of methanol which was evaporated to dryness under a gentle nitrogen flow. The final purified sample was dissolved in 200 µl methanol and 50 µl was injected in the HPLC.

ZEN and metabolites concentrations were determined by HPLC according to Videmann et al. (2008) with modifications. A gradient elution system was used: from 75% water (acidified with 0.2% H₃PO₄ and adjusted to pH 3 with 5 N NaOH), 25% acetonitrile at time zero, isocratic for 0.2 min, to 35% water, 65% acetonitrile at 13 min. The flow rate was set at 1.4 ml/min. The retention times of β-ZEL, α-ZEL and ZEN were 8.3, 9.7 and 12.2 min, respectively. The fluorescence detection limit and the quantification limit were 12, 0.6, 1.1 ng/g and 30, 1.5, 2.7 ng/g for β-ZEL, α-ZEL and ZEN, respectively. The recoveries of ZEN, β-ZEL and α-ZEL from the

extraction procedure varied from 72% to 82% with a coefficient of variation below 10%. The efficiency of deconjugation was tested using different concentrations of β glucuronidase (100–2000 U) on glucuronides solutions (Videmann et al., 2008). 100% efficiency of deconjugation was obtained with a β glucuronidase concentration of 200 U. The concentration of glucuronides was calculated assuming that 1 mole of ZEN, β-ZEL and α-ZEL, respectively, produces 1 mol of ZEN, β-ZEL, and α-ZEL glucuronide.

2.4. Total RNA isolation, integrity and quantification

Rat tissue was ground with the TissueRuptor[®] (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Total tissue RNA was isolated and purified by using the Rneasy[®] Mini Kit for liver, intestine and placenta, the Rneasy[®] Micro Kit for ovary and uterus, and the Rneasy[®] Lipid Tissue Kit for mammary gland. All extractions were performed with a DNA elimination step. RNA integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis. Total RNA was quantified with the Quant-it[™] RiboGreen[®] RNA Reagent and kit according to the manufacturer's protocol.

2.5. Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)

Assays were carried out a few days (≤1 week) following total tissue RNA isolation and quantification. RT-qPCR was performed in an Mx3000 cyclor (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), using the SybrGreen dye (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), and the One Step[®] protocol of the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit. mRNA levels of each test gene were normalized to two reference genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), and Actin, beta (*Actb*). Specific primers for *Gapdh*, *Actb*, *Abcb1a* and *Abcg2* were provided by Qiagen (confidential sequences). Published primer sequences were used for *Abcc1*, *Abcc2*, *Abcc3*, *Esr1*, *Esr2* and *Pgr* (Table 1) (Ceccatelli et al., 2006; Nishimura et al., 2005, 2006; St-Pierre et al., 2004). *Abcb1b* forward and reverse primers were designed with Primer3 (v. 0.4.0)[®] software. Sequences were chosen to span exon–exon boundaries in order to avoid amplification from possible DNA contamination. *Pgr* primers were designed to amplify the *PgrA* and *PgrB* isoforms without discrimination. Reactions were carried out in duplicate. 10 ng (20 ng for ovary and uterus) of total RNA for ABC transporters, and 32 ng for nuclear receptors were converted to cDNA, and amplified in a final reaction volume of 20 µl according to the One Step[®] protocol. Primer sequences, concentrations and product size are indicated in Table 1. The cycling parameters were as follows: reverse transcription for 30 min at 50 °C (48 °C for *Abcc2* and *Abcc3*); PCR activation during 15 min at 95 °C; denaturing 15 s at 95 °C; annealing 30 s at 55 °C (*Gapdh*, *Actin β*, *Abcb1a*, *Abcb1b* and *Abcg2*), at 59 °C for *Abcc1* and 60 °C for *Abcc2* and *Abcc3*. For *Esr1*, *Esr2* and *Pgr*, the annealing step lasted 60 s at 60 °C (40 cycles for all genes). The extending step lasted 30 s at 72 °C.

Primer pair specificity was tested at the end of every run by melting curve analysis, and amplification specificity was confirmed by electrophoresis in a 2% agarose gel. After GelRed[™] (Biotium, Hayward, USA) staining, visualization under Ultra Violet light showed a single band with the expected size for each gene. RT-qPCR

Table 2
Standard curve efficiencies and correlation coefficient R^2 .

Gene	Efficiency	R^2
<i>Gapdh</i>	1.90	0.997
<i>Actb</i>	1.98	0.991
<i>Abcb1a</i>	1.90	0.997
<i>Abcb1b</i>	2.10	0.988
<i>Abcg2</i>	2.04	0.999
<i>Abcc1</i>	1.91	0.993
<i>Abcc2</i>	2.10	0.984
<i>Abcc3</i>	2.10	0.996
<i>Esr1</i>	1.90	0.991
<i>Esr2</i>	2.00	0.964
<i>Pgr</i>	1.94	0.980

conditions were optimized. PCR efficiency and the correlation coefficient (R^2) were calculated for each gene from standard curves (Table 2).

2.6. Western blot analysis

Fragments of maternal uterus and fetal liver were homogenized with the TissueRuptor[®] in ice cold SLB buffer (Tris 20 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, MgCl₂ 1 mM, Glycerol 1 mM, Nonidet 1%, pH 8), supplemented with protease inhibitor cocktail, complete Ultra Tablets, Mini, EASY PACK (1 tablet/10 ml) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Extracts were incubated 30 min on ice, then centrifuged at 12,000 × g during 30 min at 4 °C. Supernatants were removed and protein concentrations were determined by colorimetric method using the bicinchoninic acid (Smith et al., 1985). Lysates were diluted in lysis buffer, and then loading buffer was added and heated at 70 °C for 10 min. 100–400 µg of each sample was resolved on 8% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane in transfer buffer (Tris–Glycine 1 ×, pH 8.5, containing 20% methanol). The transfer was performed at a constant voltage of 100 V for 1 h for low molecular weight proteins and 2 h for high molecular weight ones. Membranes were blocked in TBS 0.05% Tween supplemented with 5% non fat milk on a rocker at room temperature. Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4 °C raised against Abcb1 (Calbiochem C219, 517310/1:100, Darmstadt, Germany), Abcc1 (Santa Cruz sc-13960/1:400, Santa Cruz, CA, USA), Abcc3 (Santa Cruz sc-13960/1:50, Santa Cruz, CA, USA), Abcg2 (Santa Cruz sc-25822/1:400), Esr1 (Abcam ab2746/1:200, Cambridge, MA, USA), Pgr (Abcam ab16661/1:400), Actb (SIGMA–ALDRICH A5060/1:10,000, Lyon, France). Then, membranes were incubated with secondary horse-radish peroxidase labeled antibodies: Rabbit polyclonal anti Mouse (Abcam ab97046/1:10,000),

Goat anti rabbit (Santa Cruz sc-2004/1:10,000) and Rabbit polyclonal anti goat (Abcam ab6741/1:5000). The bands were detected by a chemiluminescence Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate kit (Thermo Scientific, Saint Herblain, France). Bands were visualized by the Molecular Imager[®] ChemiDac[™] XRS+ imaging system (Bio-RAD, and quantitation was carried out with Image Lab[™] software (Bio-RAD, Marnes-la-Coquette, France). Protein expression was normalized to Actb.

2.7. Data analysis

Comparisons of tissue concentrations at 4 h and 24 h and protein expression were made by the Student's *t* test. A *p* value of 0.05 was taken to be significant. The MxPro[™] q PCR Software version 4.10 was used to analyze the mRNA expression data. The relative expression ratios of the target genes were calculated based on the efficiencies and quantification cycle (Cq) deviations of unknown samples versus controls, and expressed in comparison to reference genes according to Pfaffl (2001). The relative gene expression software tool REST-MCS β version 2 was used to perform those calculations (Pfaffl et al., 2002). Differences in mRNA expression between controls and exposed samples were tested for statistical significance by the Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (REST-MCS β version 2 Software) (Pfaffl et al., 2002). A *p* value of 0.05 was taken to be significant.

3. Results

3.1. Concentrations of ZEN and its metabolites in maternal and fetal tissues (Fig. 2)

ZEN and its glucuronide were detected in all maternal tissues, the conjugate being the predominant form. Among fetal tissues, liver was the only one allowing HPLC detection of ZEN and metabolites because of detection limit. Neither β-ZEL nor its glucuronide were detectable in the tissues.

For all toxins, the small intestine was by far the most impregnated tissue. In all tissues except uterus for ZEN and mammary gland for ZEN glucuronide, the toxins concentrations were significantly higher 4 h after the last administration of ZEN, and fell dramatically at 24 h. ZEN concentration ranking at 4 h was as follows: small intestine ≫ maternal liver > mammary gland > fetal liver > ovary > plasma ≈ uterus ≈ placenta. Concentration ranking at 24 h was: mammary gland > small intestine ≈ uterus > maternal

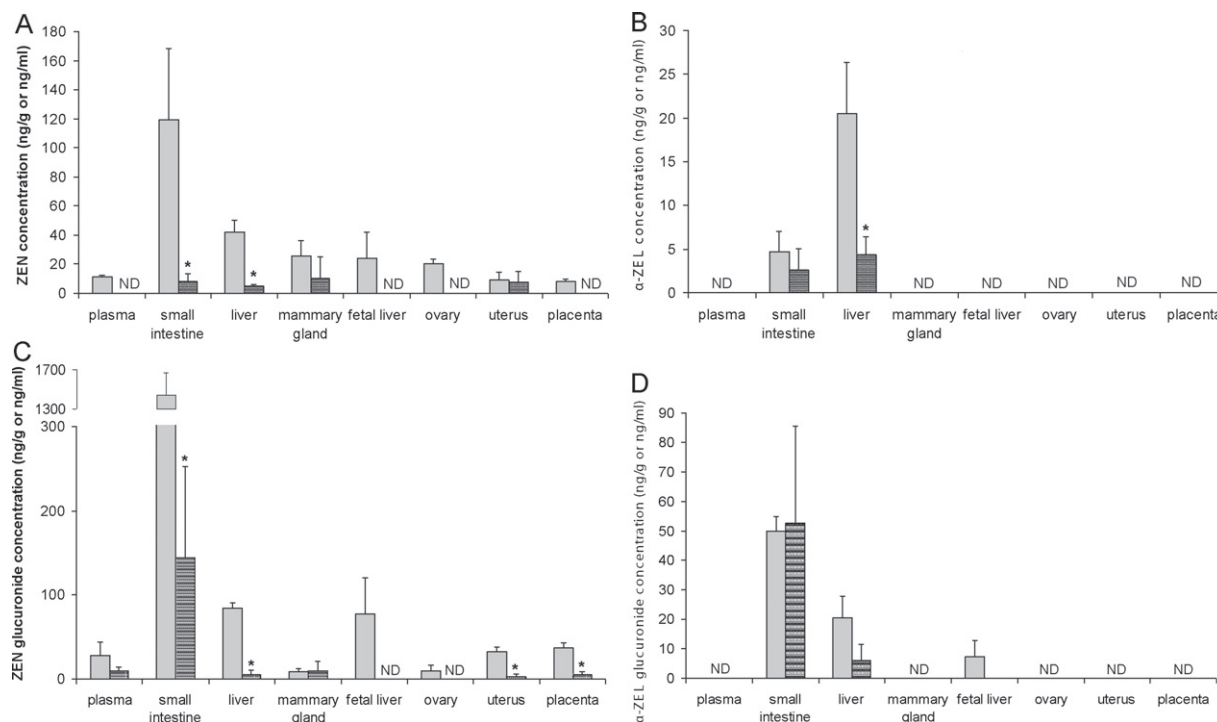


Fig. 2. Concentrations of ZEN, α-ZEL, β-ZEL, ZEN glucuronide and α-ZEL glucuronide in the pregnant rat tissues and fetal liver. Rats were given ZEN (1 mg/kg/day SC) for 14 days. Concentrations (□ 4 h, ■ 24 h after the last administration of ZEN) were measured by HPLC, $n = 6 \pm$ S.D. *Significantly different from 4 h concentration ($p < 0.05$). ND = not detectable.

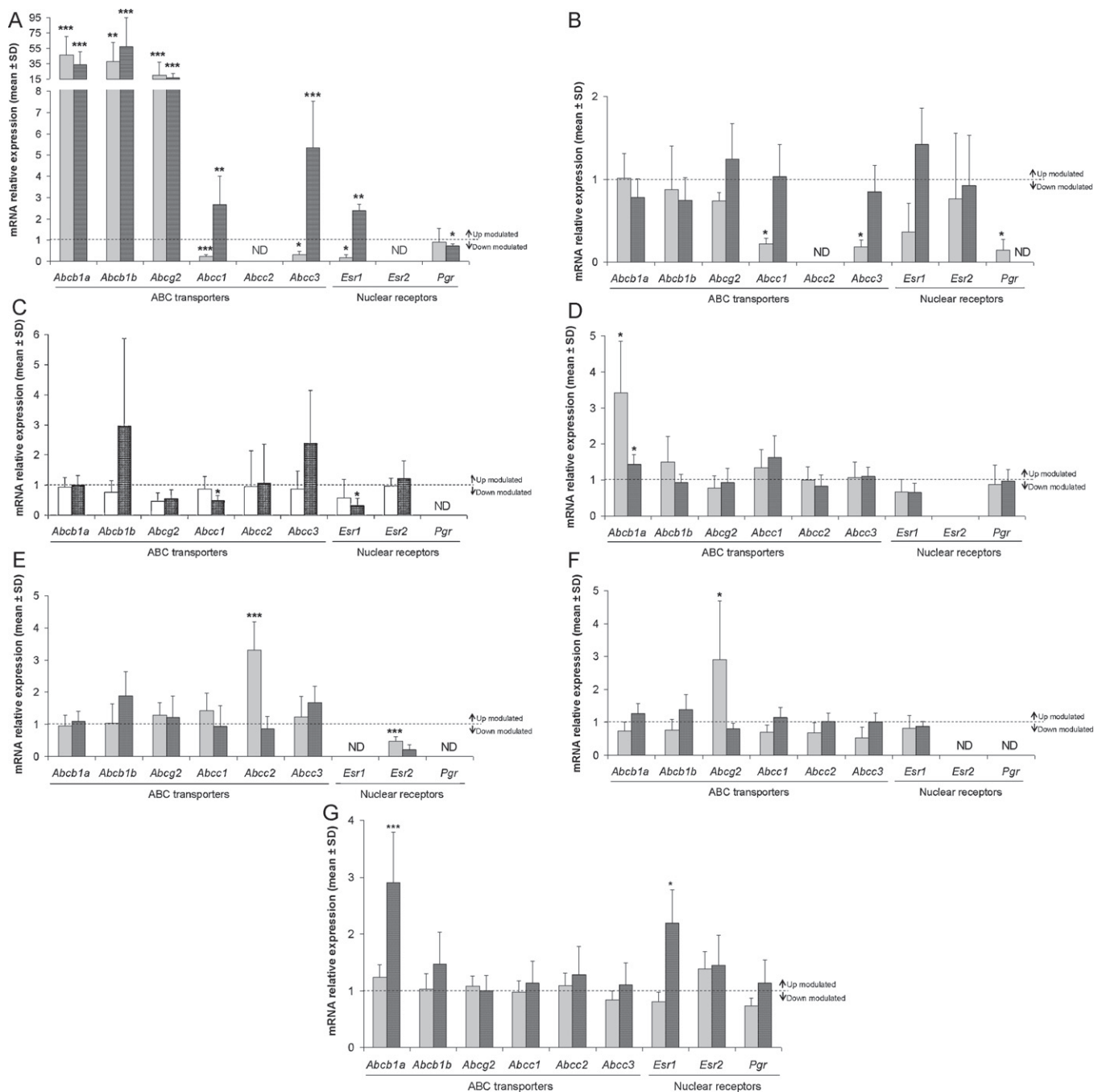


Fig. 3. Effect of ZEN on mRNA expression of ABC transporters and nuclear receptors in the pregnant rat tissues and fetal liver. The mRNA expression of the target genes, determined by RT-qPCR, was normalized to the level of *Actb* and *Gapdh* and expressed relative to controls. Controls were set 1 (dotted line). A, uterus; B, ovary; C, placenta; D, mammary gland; E, small intestine; F, liver; G, fetal liver. Statistically significant * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$. Data are means \pm S.D. ($n = 5-6$). □ 4 h, ■ 24 h after the last administration of ZEN. ND = not detectable.

liver (Fig. 2A). No detectable ZEN was found in the plasma, ovary, placenta or fetal liver. At 4 h and 24 h, α -ZEL was only detected in the small intestine and the liver (Fig. 2B).

ZEN glucuronide concentrations ranking 4 h after the last injection of ZEN was: small intestine \gg maternal liver > fetal liver > placenta > uterus \approx plasma > ovary \approx mammary gland. 24 h after the last mycotoxin administration, ZEN glucuronide concentration ranking was: small intestine \gg mammary gland \approx plasma > maternal liver \approx placenta > uterus (Fig. 2C).

α -ZEL glucuronide concentration ranking at 4 h was: small intestine > maternal liver > fetal liver. 24 h after the last toxin intake, α -ZEL glucuronide level ranking was as follows: small

intestine \gg maternal liver (Fig. 2D). The toxin was undetectable in the fetal liver and the plasma.

3.2. Effects of ZEN on the mRNA expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rat tissues and fetal liver

In the uterus, a highly significant induction of *Abcb1a*, *Abcb1b* and *Abcg2* mRNA (approximately 16-fold higher for the lowest induction and 57-fold for the highest) was observed at 4 h and 24 h after the last ZEN exposure (Fig. 3A). Significant down-modulation was observed for *Abcc1* and *Abcc3* mRNAs 4 h after the last ZEN injection (3 and 4.5-fold decrease, respectively), whereas

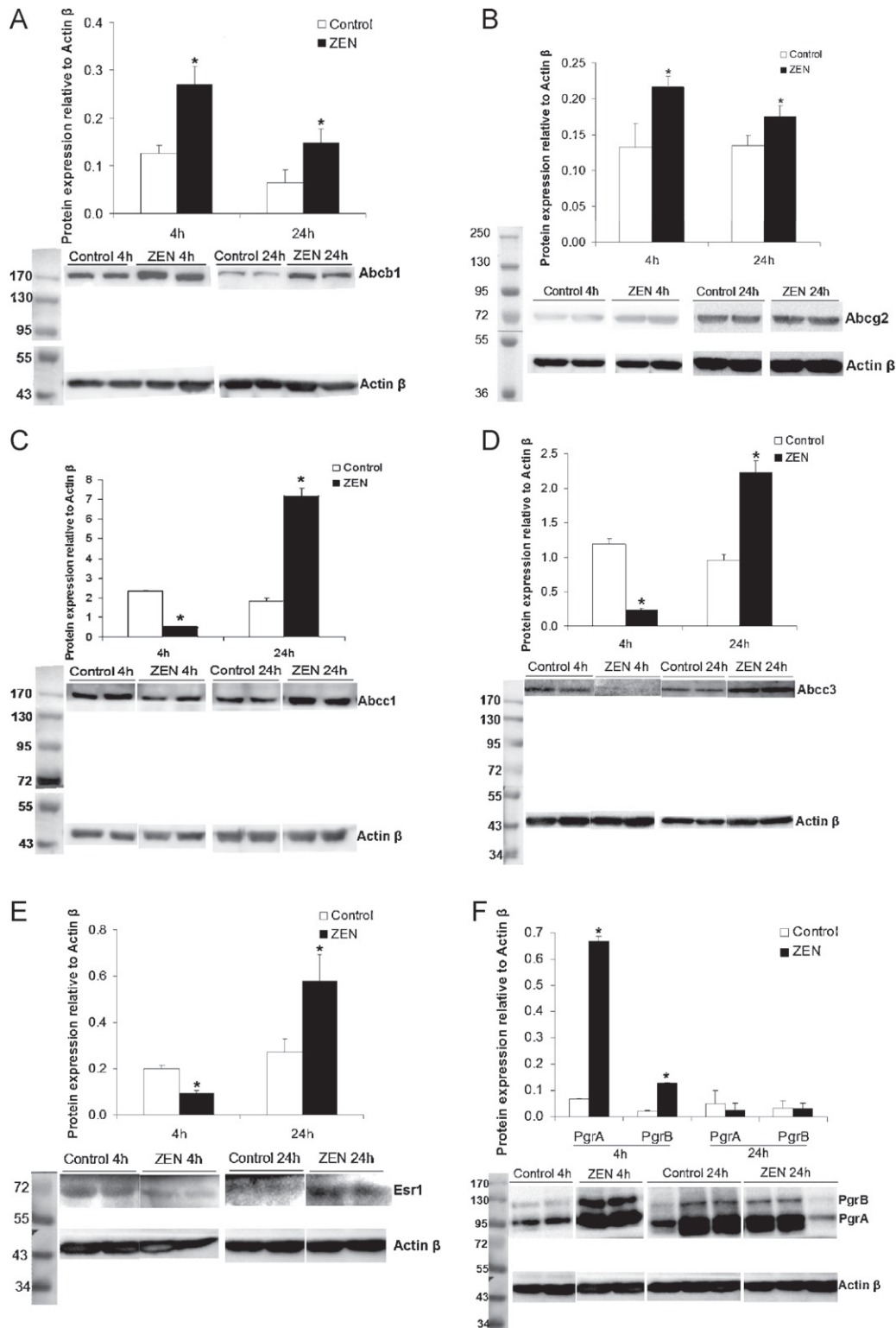


Fig. 4. Effect of ZEN on protein expression of ABC transporters, Esr1 and PgrA/B in the pregnant rat uterus. The protein expression of the target genes, determined by western blotting, was normalized to the level of Actb. *Significantly different from control group ($p < 0.05$). Data are means \pm S.D. ($n = 5-6$). A, Abcb1; B, Abcg2; C, Abcc1; D, Abcc3; E, Esr1; F, PgrA/B.

meaningful up modulation was observed at 24h (more than 2- and 5-fold, respectively). A significant 5-fold inhibition of *Esr1* mRNA was observed 4h after the last ZEN exposure, whereas 24h afterwards, a 2-fold induction was noted. For *Pgr* mRNA, while no meaningful effect was observed 4h after the last injection, a slightly significant down modulation was found 24h later. In the ovary,

a significant inhibition of *Abcc1*, *Abcc3* and *Pgr* mRNA expression (4.5, 5.5 and 7-fold, respectively) was observed 4h after the last ZEN administration (Fig. 3B). This inhibition was totally reversed at 24h for ABC transporters. Conversely, *Pgr* mRNA expression was undetectable 24h after the last mycotoxin injection. In the placenta, no significant effect was observed for *Abcc1* and *Esr1* mRNA 4h

after the last administration of ZEN, whereas a significant down-modulation for both genes was highlighted 24 h later (2 and 3-fold, respectively, Fig. 3C). In the mammary gland, a significant induction was noted for *Abcb1a* mRNA at both experimental times, with a 3.4-fold and a 1.4-fold increase (Fig. 3D). In the small intestine, a significant 3.3-fold induction of *Abcc2* mRNA was observed 4 h after the last ZEN administration (Fig. 3E). This induction was completely reversed at 24 h. 4 h after the last ZEN administration, *Esr2* mRNA exhibited an almost 2-fold inhibition. In the maternal liver a significant induction of *Abcg2* mRNA (2.9-fold) was noted 4 h after the last administration of ZEN (Fig. 3F). This induction was completely reversed 24 h after the last ZEN injection. In the fetal liver, a late significant up-modulation was noted for *Abcb1a* and *Esr1* mRNAs (2.9 and 2.2-fold, respectively), while no effect was found earlier (Fig. 3G).

3.3. Effects of ZEN on protein expression of *Abcb1*, *Abcg2*, *Abcc1*, *Abcc3*, *Esr1* and *Pgr A/B* in the pregnant rat uterus and *Abcb1* and *Esr1* in fetal liver

Western blotting experiments were performed on the uterus, since it was the most responsive maternal tissue for mRNA modulation, and on the fetal liver. Except for *Pgr*, the modulation of protein expression followed mRNA modulation in the maternal uterus (Fig. 4). *Abcb1* protein expression was 2.1- and 2.3-fold induced at 4 h and 24 h after the last administration, respectively (Fig. 4A). *Abcg2* protein expression was slightly induced at both experimental times (respectively, 1.6 and 1.3-fold induction) (Fig. 4B). *Abcc1* and *Abcc3* protein expression was first inhibited (by 4.2 and 5.1 times, respectively) 4 h after the last ZEN administration, then was 4-fold and 2.3-fold induced 24 h after the last administration of ZEN (Fig. 4C and D). Similarly to *Abcc1* and *Abcc3*, *Esr1* protein expression was firstly 2.1-fold inhibited 4 h after ZEN last administration, then 2.1-fold induced 24 h after (Fig. 4E). *PgrA* and *PgrB* were both induced 4 h after the last exposure to ZEN (respectively, 9.9- and 5.9-fold), but no significant effect was noted for both isoforms at the 24 h experimental time (Fig. 4F).

In the fetal liver, *Abcb1* and *Esr1* protein expression was inhibited at both 4 h (1.7- and 2.4-fold inhibition, respectively) and 24 h (2.1- and 1.5-fold inhibition, respectively) after the last exposure to ZEN (Fig. 5A and B).

4. Discussion

In the present study ZEN was able to modulate the expression of various ABC transporters and nuclear receptors in the tissues of female rats repeatedly exposed during pregnancy, and in the fetal liver.

The dose chosen for exposure (1 mg/kg bw) allowed HPLC quantification of ZEN and its metabolites in the tissues analyzed for mRNA modulation. It enabled to study the potential correlation between molecules present in the tissues and the observed effect on gene and protein. Lower doses of ZEN led to undetectable levels of toxins. The chosen dose was high compared to human exposure by food ingestion (Tolerable Daily Intake of 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw, EFSA, 2011), but our results provided new insight on ZEN effect during the particular state of pregnancy. Preliminary results on the tissue distribution of ZEN and its metabolites in rats showed that the toxin concentrations were the highest 4 h after the last ZEN injection, and that concentrations decreased dramatically afterwards (Videmann et al., 2012). Hence, we chose a 4 h time-period to evaluate the effects of ZEN at its highest tissue concentration and a 24 h time-period to explore the persistence of potential effects. Differences were observed according to the tissue type, the maternal or fetal origin, the target gene, the nature and extent of modulation.

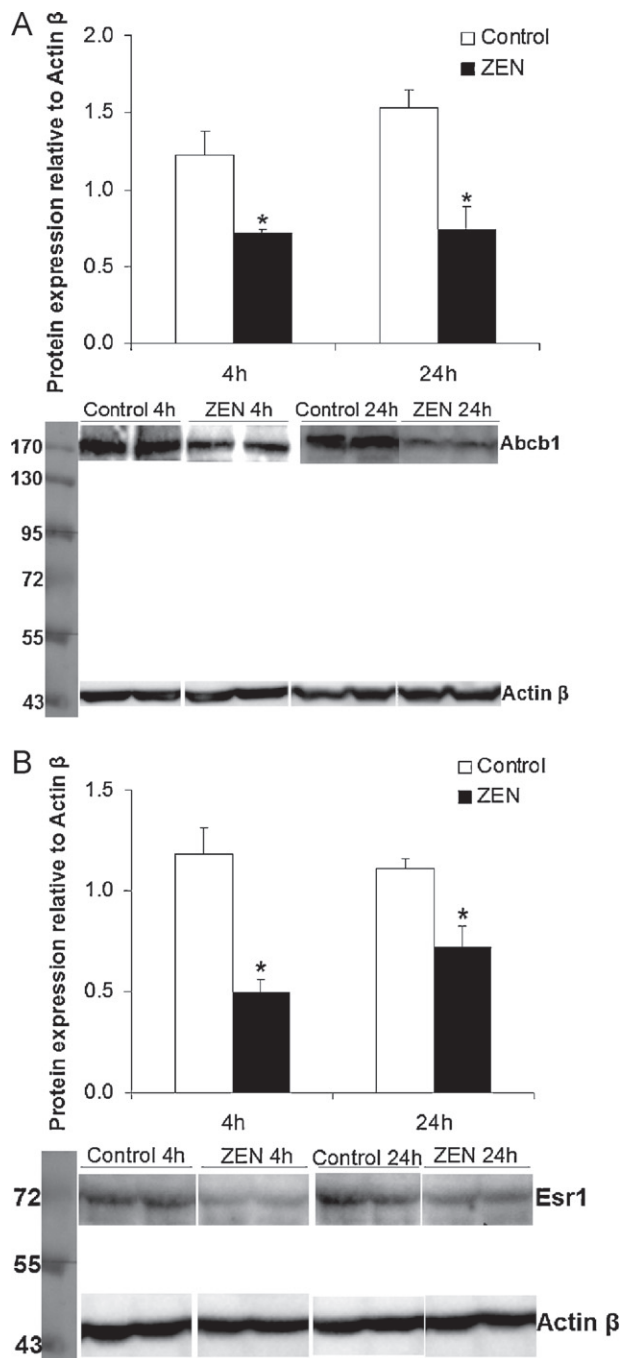


Fig. 5. Effect of ZEN on protein expression of *Abcb1* and *Esr1* in the fetal liver. The protein expression of the target genes, determined by western blotting, was normalized to the level of Actb. *Significantly different from control group ($p < 0.05$); Data are means \pm S.D. ($n = 5-6$). A, *Abcb1*; B, *Esr1*.

Highest concentrations of ZEN and its glucuronide were found in the small intestine, due to the enterohepatic recirculation of ZEN, as reported in other studies (Bernhoft et al., 2001; Dänicke et al., 2005; Shin et al., 2009). Reduced and conjugated metabolites were mainly present in the liver and small intestine since both organs are involved in the production of the reduced metabolites of ZEN (α -ZEL being the major metabolite) and their glucuronides (Olsen et al., 1987; Videmann et al., 2008). In our work, the production of α -ZEL glucuronide was high compared to these previous data. We showed in a recent work (Videmann et al., 2012) that in most organs the concentrations of ZEN and metabolites were higher after sc administration when compared with the oral one, this could explain the

relative high levels found in our work. Despite their high impregnation, maternal small intestine and liver were the least responsive organs. We could not establish any relationship between the tissue concentrations of ZEN or its metabolites and the modulation of ABC transporters mRNAs. As other endocrine disruptors, ZEN may act at very low doses and may not follow a monotonic dose–response curve (Marmugi et al., 2012).

The uterus was the most responsive tissue of the study. A significant effect for all ABC transporter genes was observed, except for *Abcc2* which was undetectable in the uterus under our experimental conditions. Absence of *Abcc2* mRNA in the uterus was reported in Matsumoto et al. (2007). In our work, the magnitude of *Abcb1a* and *Abcb1b* mRNA induction was comparable to that described in Arceji et al. (1990) who demonstrated that *Abcb1a* mRNA was highly induced (more than 15 fold induction) in the mouse uterine secretory epithelium by a combination of estrogen and progesterone. Indeed the uterus is a major estrogen-responsive organ used in reference assays of estrogenic activity (Heneweer et al., 2007; Owens and Ashby, 2002). We showed that the modulations of protein expression were in good agreement with those of mRNA expression even though amplitudes of modulation were overall lower. As shown by Yagüe et al. (2003) in leukemic cells, the increase of *ABCB1* mRNA following xenobiotic exposure was partly due to stabilization of mRNA, which does not result in increased expression of the protein. Posttranscriptional mechanisms controlling the protein translation rate and the half-lives of specific proteins could be involved in the difference of induction between mRNA and protein expression (Beyer et al., 2004; Guo et al., 2008; Nie et al., 2006). *Abcb1* is implicated in the uteroplacental transport of substrates necessary to the implantation process and early embryo–endometrial interactions, such as progesterone (Axiotis et al., 1991a, 1991b). Higher levels of *Abcb1* in the luminal cells of the endometrium of gravid uterus may prevent fetal progesterone from entering the maternal circulation or alternatively enhance secretion of maternal progesterone (Yang et al., 1989).

Abcg2 mRNA and protein expression in the uterus was also induced by ZEN exposure. Data on *Abcg2* modulation in the uterus are scarce. *Abcg2* transports numerous substrates including steroid metabolites and phytoestrogens (Enokizono et al., 2007). Even slight, the induction of *Abcg2*, expressed on the luminal side of the secretory epithelium of the uterus, could enhance the transport of these substrates toward the placenta and consequently the fetus.

Conversely, *Abcc1* and *Abcc3* mRNA and protein expression were significantly inhibited in the uterus and the ovary. Vendrell et al. (2004) reported an inhibition of the human *ABCC3* mRNA by E2 in the MVLN cell line (ESR1 positive and hormone-responsive human breast carcinoma cell line). Since *ABCC3* transports endogenous estrogen glucuronides, the authors suggested that E2 down regulated *ABCC3* to maintain high intracellular estrogen level, and thus amplified its own pharmacological action. A similar mechanism of action could occur for ZEN, since we previously demonstrated in our laboratory that *ABCC1–3* transporters were implicated in the transport of ZEN and its metabolites in the human Caco-2 cell line (Videmann et al., 2009).

Besides the study on major ABC transporters, we explored the effects of ZEN exposure on mRNA expression of *Esr1*, *Esr2* and *Pgr*. Attention was paid to these nuclear receptors because they are known to be estrogen-regulated genes (Diel et al., 2000; Höfer et al., 2010). In addition, ESRs are known to be ZEN targets (Bovee et al., 2004; Kuiper et al., 1998), and cross-talk in the signaling pathways of *Esr*s and *Pgr* exists (Bradshaw et al., 1991). Recently, Frizzell et al. (2011) suggested an interaction between ZEN and *Pgr*. In our work, ZEN modulated the transcription of the nuclear receptors *Esr1*, *Esr2* and *Pgr* genes in most tissues investigated herein. In the uterus, the effect of ZEN on mRNA expression of *Esr1* was in agreement with Nephew et al. (2000) and Reed et al. (2005) who reported early

down-modulation (4 h) and late up-modulation (24 h) of *Esr1* by E2 in the rat uterus. Interestingly, this effect was similar to that noted for *Abcc1* and *Abcc3* mRNAs, suggesting a common mechanism of action of ZEN on these three genes, or an effect of the level of *Esr1* expression on *Abcc1* and *Abcc3* mRNAs expression in the maternal uterus. Indeed in the current work, *Esr1* protein modulation of expression followed modulation of the mRNA, supporting the latter hypothesis. As previously suggested by Grünfeld and Bonefeld-Jorgensen (2004), changes in the level of expression of *Esr* could significantly impact the signal amplification mediated via the *Esr*s, thus causing a disruption of the functions they regulate. The effect of ZEN on *Pgr* mRNA appeared to be different from that noted for endogenous estrogens. In our work, ZEN had no effect then slightly inhibited *Pgr* mRNA expression, respectively, 4 h and 24 h after the last administration, whereas previous studies showed that estrogens induced *Pgr* mRNA expression in the rat uterus (Kraus and Katzenellenbogen, 1993; Murata and Higuchi, 2003). However, our investigation was performed on total tissue homogenates, and the effect of ZEN on *Pgr* mRNA expression could differ depending on cell type, as suggested by Parczyk et al. (1997) and Sahlin et al. (2006) for E2. Furthermore, the effect of ZEN could differ between the two isoforms of *Pgr* (*PgrA* and *B*), a difference that we were unable to evaluate with the primers used in this study. Conversely to mRNA modulation results, our results on protein expression showed a significant induction of both *PgrA* and *PgrB* isoforms 4 h after the last administration of ZEN. No significant effect was observed at 24 h, probably due to the high inter-individual variability. The contribution of both isoforms in the mRNA expression of *Pgr* could explain the discrepancies between the mRNA and the protein modulations of expression. Recently, Frizzell et al. (2011) showed that ZEN and its reduced metabolites led to an increase in *PGR* expression in human mammary cell lines, this response being estrogen regulated. As suggested for *Esr1*, *PgrA/B* expression levels could influence the modulation of ABC transporters expression. Indeed, Piekarz et al. (1993) showed that progesterone was able to up-regulate the expression of the *Abcb1b* gene in the mouse gravid uterus through the *PgrA* isoform of *Pgr*.

In the mammary gland and the maternal liver, only *Abcb1a* and *Abcg2* mRNAs were induced, respectively. Data on the regulation of these two transporter genes in liver and mammary gland are scarce. In the human mammary gland cells, Alcorn et al. (2002) reported a down-regulation of *Abcb1* mRNA expression with lactation, suggesting an adaptive and protective response of the transporter to reduce milk levels of toxic compounds. In our work the induction of *Abcb1a*, which is apically located in the mammary gland, could increase the efflux of xenobiotic substrates in the breast milk during the lactation period. Tanaka et al. (2005) showed that the *Abcg2* gene was regulated by hormones in liver and was undergoing gender variations of expression. In the current work, an induction of *Abcg2* expression in the maternal liver could have a protective role by enhancing the efflux of its substrates into bile. In the placenta, *Abcc1* and *Esr1* mRNAs were inhibited 24 h after the last ZEN exposure. Interestingly, this effect was opposite to that noted in the uterus at the same experimental time. Given the localization and efflux direction of *Abcc1* in uterus and placenta (Fig. 1), this modulation could enhance the protection of fetus from exposition to *Abcc1* substrates. Opposite results were reported by Prouillac et al. (2009) who showed an up-modulation of *Abcc1* mRNA expression in the BeWo choriocarcinoma cell line. This effect was observed at very low dose 24 h after exposure, and was reversed 48 h after. Discrepancies between our current work and these results could be due to the cell origin (human/rat) or differences in the nuclear receptors profile (ESR1, ESR2 and *PGR*) expressed in BeWo cells. In addition, we previously showed that BeWo cells did not produce ZEN metabolites, therefore the effects in this cell line were strictly related to the parent molecule (Prouillac et al., 2009).

Our results highlighted an effect on mRNA and protein expression of Abcb1a and Esr1 in the fetal liver. Abcb1 and Esr1 expressions were inhibited 4 h and 24 h after the last administration of the mycoestrogen. Abcb1 is located in the bile canalicular membrane of adult and fetus hepatocytes and protects them against toxic effects of many xenobiotics by eliminating them into bile. A decrease in its expression could lead to deleterious consequences on fetal development. Unlike the maternal tissues, the modulation of Abcb1 and Esr1 protein expression in the fetal liver did not follow that of mRNA. Indeed, we observed for both genes a delayed mRNA induction 24 h after the last exposure to ZEN. One possible explanation for this phenomenon is that ZEN had an inhibitory post-translational effect on Abcb1 and Esr1. Thus, the late mRNA induction might be due to a positive feedback to compensate the decrease in protein expression.

The effect of ZEN on the mRNA expression of ABC transporters was varying according to the type of tissues. This phenomenon has been widely described for the Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM) (Burger, 2000; Haskell, 2003). As suggested by Haskell (2003), this could be due to the fact that the overall biologic activity of an estrogenic compound reflects the product of its relative agonist/antagonist activity on the two receptors ESR1 and ESR2. It is well known that ESR1 and ESR2 are differentially expressed in most tissues. Our results showed that Esr1 was the Esr dominating subtype in the rat uterus, in agreement with previous studies (Minorics et al., 2004; Wang et al., 1999), whereas a different Esr1/Esr2 balance was found in the other tissues, including the fetal tissue.

5. Conclusion

Our results showed for the first time that ZEN exposure is able to modulate mRNA levels of ABC transporters in fetal liver and maternal tissues during pregnancy, and modulates protein levels in maternal uterus and fetal liver. The nature and magnitude of this effect was tissue dependent, but independent of tissue impregnation levels. However, it is important to keep in mind that the results obtained herein reflect the global tissue response. Thus it was not possible to determine the implication of each cellular type in the whole response of every tissue.

Further investigations are needed to study the consequences of such modulations. An induction of Abcb1a, Abcb1b and Abcg2 in the uterus could enhance the transport of xenobiotic substrates toward the placenta and the fetus. The effect of ZEN in the fetal tissue raises the question of potential permanent modulations of ABC transporter expression at the adulthood. Today, the potential consequences of such modulations on the fetal and neonatal stages, which constitute critical periods of vulnerability to endocrine disruptors, are unknown and need to be addressed. Modulation of Esrs and Pgr mRNA and protein may also impact the expression of genes regulated by these nuclear factors.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

This study was funded by a grant from the ANR (ZENREPROTOX, Grant 415 178C).

We gratefully thank Ms. Justine Jourdain and Ms. Diane Marechal for their kind help in the realization of Fig. 1, and Mr. Keith Hodson for English editing.

References

- Alcorn, J., Lu, X., Moscow, J.A., McNamara, P.J., 2002. Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303 (2), 487–496.
- Appelgren, L.E., Arora, R.G., Larsson, P., 1982. Autoradiographic studies of [³H]zearalenone in mice. *Toxicology* 25 (2–3), 243–253.
- Arceji, R.J., Baas, F., Raponi, R., Horwitz, S.B., Housman, D., Croop, J.M., 1990. Multidrug resistance gene expression is controlled by steroid hormones in the secretory epithelium of the uterus. *Molecular Reproduction and Development* 25 (2), 101–109.
- Axiotis, C.A., Guarch, R., Merino, M.J., Laporte, N., Neumann, R.D., 1991b. P-glycoprotein expression is increased in human secretory and gestational endometrium. *Laboratory Investigation* 65 (5), 577–581.
- Axiotis, C.A., Monteagudo, C., Merino, M.J., LaPorte, N., Neumann, R.D., 1991a. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma. *American Journal of Pathology* 138 (4), 799–806.
- Bacha, H., Chekir, L., Ellouz, F., Hadidane, R., Creppy, E.E., 1993. Effects of zearalenone on fertilization and gestation in rats. In: Scudamore, K.A. (Ed.), *Proceedings of the UK Workshop, Occurrence and Significance of Mycotoxin*. The University of West London, Central Sciences Laboratory, London, pp. 258–262.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16 (3), 497–516.
- Bernhoft, A., Behrens, G.H., Ingebrigtsen, K., Langseth, W., Berndt, S., Haugen, T.B., Grotmol, T., 2001. Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. *Reproductive Toxicology* 15 (5), 545–550.
- Beyer, A., Hollunder, J., Nasheuer, H.P., Wilhelm, T., 2004. Post-transcriptional expression regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a genomic scale. *Molecular and Cellular Proteomics* 3 (11), 1083–1092.
- Biehl, M.L., Prelusky, D.B., Koritz, G.D., Hartin, K.E., Buck, W.B., Trenholm, H.L., 1993. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 121 (1), 152–159.
- Boehme, K., Simon, S., Mueller, S.O., 2009. Gene expression profiling in Ishikawa cells: a fingerprint for estrogen active compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* 236 (1), 85–96.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J.J., 2000. A family of drug transporters, the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 92 (16), 1295–1302.
- Bovee, T.F., Helsdingen, R.J., Rietjens, I.M., Keijer, J., Hoogenboom, R.L., 2004. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors alpha and beta, and green fluorescent protein, a comparison of different compounds with both receptor types. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 91 (3), 99–109.
- Bradshaw, M.S., Tsai, S.Y., Leng, X.H., Dobson, A.D., et al., 1991. Studies on the mechanism of functional cooperativity between progesterone and estrogen receptors. *Journal of Biological Chemistry* 266 (25), 16684–16690.
- Burger, H.G., 2000. Selective oestrogen receptor modulators. *Hormone Research* 53 (Suppl. 3), 25–29.
- Cao, J., Stieger, B., Meier, P.J., Vore, M., 2002. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 283 (3), G757–G766.
- Ceccatelli, R., Faass, O., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., 2006. Gene expression and estrogen sensitivity in rat uterus after developmental exposure to the polybrominated diphenylether PBDE 99 and PCB. *Toxicology* 220 (2–3), 104–116.
- Coles, L.D., Lee, I.J., Voulalas, P.J., Eddington, N.D., 2009. Estradiol and progesterone-mediated modulation of P-gp in P-gp overexpressing cells (NCI-ADR-RES) and placental cells (JAR). *Molecular Pharmaceutics* 6 (6), 1816–1825.
- Collins, T.F., Sprando, R.L., Black, T.N., Olejnik, N., Eppley, R.M., Alam, H.Z., Rorie, J., Ruggles, D.L., 2006. Effects of zearalenone on *in utero* development in rats. *Food and Chemical Toxicology* 44 (9), 1455–1465.
- Dänicke, S., Swiech, E., Buraczewska, L., Ueberschär, K.H., 2005. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89 (7–8), 268–276.
- Diel, P., Schulz, T., Smolnikar, K., Strunck, E., Vollmer, G., Michna, H., 2000. Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 73 (1–2), 1–10.
- D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C., 1999. Fusarium mycotoxins, a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80 (3–4), 183–205.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2011. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal* 9 (6), 2197.
- Enokizono, J., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., 2007. Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Molecular Pharmacology* 72 (4), 967–975.
- Evseenko, D.A., Paxton, J.W., Keelan, J.A., 2007. Independent modulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 35 (4), 595–601.
- Fitzpatrick, D.W., Arbuckle, L.D., Hassen, A.M., 1988. Zearalenone metabolism and excretion in the rat: effect of different doses. *Journal of Environment Science and Health. Part B: Pesticides* 23 (4), 343–354.

- Frizzell, C., Ndossi, D., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G., Sørlie, M., Ropstad, E., Muller, M., Elliott, C.T., Connolly, L., 2011. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters* 206 (2), 210–217.
- Fromm, M.F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (8), 423–429.
- Fukuda, H., Arai, M., Soh, T., Yamauchi, N., Hattori, M.A., 2006. Progesterone regulation of the expression and function of multidrug resistance type I in porcine granulosa cells. *Reproductive Toxicology* 22 (1), 62–68.
- Grünfeld, H.T., Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2004. Effect of *in vitro* estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels. *Toxicology Letters* 151 (3), 467–480.
- Guo, Y., Xiao, P., Lei, S., Deng, F., Xiao, G.G., Liu, Y., Chen, X., Li, L., Wu, S., Chen, Y., Jiang, H., Tan, L., Xie, J., Zhu, X., Liang, S., Deng, H., 2008. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 40 (5), 426–436.
- Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2004. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins, biology, substrate specificity and modulation. *Current Drug Metabolism* 5 (1), 21–53.
- Haskell, S.G., 2003. Selective estrogen receptor modulators. *Southern Medical Journal* 96 (5), 469–476.
- Heneweer, M., Houtman, R., Poortman, J., Groot, M., Maliepaard, C., Peijnenburg, A., 2007. Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology approach. *Toxicological Sciences* 99 (1), 303–314.
- Höfer, N., Diel, P., Wittsiepe, J., Wilhelm, M., Kluxen, F.M., Degen, G.H., 2010. Investigations on the estrogenic activity of the metallo-hormone cadmium in the rat intestine. *Archives of Toxicology* 84 (7), 541–552.
- Huls, M., Russel, F.G., Masereeuw, R.J., 2009. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328 (1), 3–9.
- Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S., 1993. Modulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus, modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132 (6), 2371–2379.
- Kuiper, G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139 (10), 4252–4263.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7 (3), 253–306.
- Malekinejad, H., Maas-Bakker, R., Fink-Gremmels, J., 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Veterinary Journal* 172 (1), 96–102.
- Marín, J.J., Macías, R.L., Briz, O., Pérez, M.J., Serrano, M.A.A., 2005. Molecular bases of the excretion of fetal bile acids and pigments through the fetal liver-placenta-maternal liver pathway. *Annals of Hepatology: Official Journal of the Mexican Association of Hepatology* 4 (2), 70–76.
- Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P.G., Mselli-Lakhal, L., 2012. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 55 (2), 395–407.
- Massart, F., Meucci, V., Saggese, G., Soldani, G., 2008. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *Journal of Pediatrics* 152 (5), 690–695.
- Matsumoto, J., Iwano, H., Inoue, H., Iwano, N., Yamashiki, N., Yokota, H., 2007. Metabolic barrier against bisphenol A in rat uterine endometrium. *Toxicological Sciences* 99 (1), 118–125.
- Minorics, R., Ducza, E., Márki, A., Páldy, E., Falkay, G., 2004. Investigation of estrogen receptor alpha and beta mRNA expression in the pregnant rat uterus. *Molecular Reproduction and Development* 68 (4), 463–468.
- Murata, T., Higuchi, T., 2003. Progesterone receptor mRNA levels during pregnancy, labor, lactation and the estrous cycle in rat uterus. *The Journal of Reproduction and Development* 49 (6), 425–432.
- Nephew, K.P., Long, X., Osborne, E., Burke, K.A., Ahluwalia, A., Bigsby, R.M., 2000. Effect of estradiol on estrogen receptor expression in rat uterine cell types. *Biology of Reproduction* 62 (1), 168–177.
- Nie, L., Wu, G., Zhang, W., 2006. Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis. *Genetics* 174 (4), 2229–2243.
- Nishimura, M., Koeda, A., Suzuki, E., Kawano, Y., Nakayama, M., Satoh, T., Narimatsu, S., Naito, S., 2006. Modulation of mRNA expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21 (4), 297–307.
- Nishimura, M., Yamaguchi, M., Yamauchi, A., Ueda, N., Naito, S., 2005. Role of soybean oil fat emulsion in the prevention of hepatic xenobiotic transporter mRNA up and down-modulation induced by overdose of fat-free total parenteral nutrition in infant rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 20 (1), 46–54.
- Olsen, M.E., Pettersson, H.I., Sandholm, K.A., Kiessling, K.H., 1985. Quantitative liquid chromatographic method using fluorescence detection for determining zearalenone and its metabolites in blood plasma and urine. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 68 (4), 632–635.
- Olsen, M.E., Pettersson, H.I., Sandholm, K., Visconti, A., Kiessling, K.H., 1987. Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology* 25 (9), 681–683.
- Owens, J.W., Ashby, J., 2002. Critical review and evaluation of the uterotrophic bioassay for the identification of possible estrogen agonists and antagonists, in support of the validation of the OECD uterotrophic protocols for the laboratory rodent. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Critical Reviews in Toxicology* 32 (6), 445–520.
- Parczyk, K., Madjno, R., Michna, Y., Nishino, Y., Schneider, M.R., 1997. Progesterone receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 63 (4–6), 309–316.
- Parveen, M., Zhu, Y., Kiyama, R., 2009. Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes. *FEBS Letters* 583 (14), 2377–2384.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30 (9), e36.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9), e45.
- Piekarz, R.L., Cohen, D., Horwitz, S.B., 1993. Progesterone regulates the murine multidrug resistance *mdr1b* gene. *Journal of Biological Chemistry* 268 (11), 7613–7616.
- Prouillac, C., Videmann, B., Mazallon, M., Lecoeur, S., 2009. Induction of cells differentiation and ABC transporters expression by a myco-estrogen, zearalenone, in human choriocarcinoma cell line (BeWo). *Toxicology* 263 (2–3), 100–107.
- Reed, C.A., Berndtson, A.K., Nephew, K.P., 2005. Dose-dependent effects of 4-hydroxytamoxifen, the active metabolite of tamoxifen, on estrogen receptor-alpha expression in the rat uterus. *Anti-Cancer Drugs* 16 (5), 559–567.
- Sahlin, L., Masironi, B., Akerberg, S., Eriksson, H., 2006. Tissue- and hormone-dependent progesterone receptor distribution in the rat uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 47.
- Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Németh, K., Váradi, A., 2004. ABCG2 a transporter for all seasons. *FEBS Letters* 567 (1), 116–120.
- Scotto, K.W., 2003. Transcriptional modulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22 (47), 7496–7511.
- Shier, W.T., Shier, A.C., Xie, W., Mirocha, C.J., 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol* 3 (9), 1435–1438.
- Shin, B.S., Hong, S.H., Bulitta, J.B., Hwang, S.W., Kim, H.J., Lee, J.B., Yang, S.D., Kim, J.E., Yoon, H.S., Kim do, J., Yoo, S.D., 2009. Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72 (21–22), 1406–1411.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1), 76–85.
- St-Pierre, M.V., Stallmach, T., Freimoser-Grundschober, A., Dufour, J.F., Serrano, M.A., Marin, J.J., Sugiyama, Y., Meier, P.J., 2004. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and foetal liver of the rat. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287 (6), R1505–R1516.
- Szuetz, P., Mesterhazy, A., Falkay, G.Y., Bartyok, T., 1997. Early telearch symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foodstuffs. *Cereal Research Communications* 25, 429–436.
- Tanaka, Y., Slitt, A.L., Leazer, T.M., Maher, J.M., Klaassen, C.D., 2005. Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (*Bcrp/Abcg2*) in rats and mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326 (1), 181–187.
- Tomaszewski, J., Mitorski, R., Semczuk, A., Kotarski, J., Jakowicki, J., 1998. Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekologia Polska* 69 (5), 363–366.
- Ueno, Y., Ayaki, S., Sato, N., Ito, T., 1977. Fate and mode of action of zearalenone. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* 31 (4–6), 935–948.
- Vähäkangas, K., Myllynen, P., 2009. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *British Journal of Pharmacology* 158 (3), 665–678.
- Vendrell, J.A., Magnino, F., Danis, E., Duchesne, M.J., Pinloche, S., Pons, M., Birnbaum, D., Nguyen, C., Theillet, C., Cohen, P.A., 2004. Estrogen modulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation. *Journal of Molecular Endocrinology* 32 (2), 397–414.
- Videmann, B., Koraichi, F., Mazallon, M., Lecoeur, S., 2012. Effect of gender, pregnancy and exposure conditions on metabolism and distribution of zearalenone in rats. *World Mycotoxin Journal* 5 (1), 57–69.
- Videmann, B., Mazallon, M., Prouillac, C., Delaforge, M., Lecoeur, S., 2009. ABC1, ABC2 and ABC3 are implicated in the transepithelial transport of the myco-estrogen zearalenone and its major metabolites. *Toxicology Letters* 190 (2), 215–223.
- Videmann, B., Mazallon, M., Tep, J., Lecoeur, S., 2008. Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 46 (10), 3279–3286.
- Vore, M., Leggas, M., 2008. Progesterone acts via progesterone receptors A and B to regulate breast cancer resistance protein expression. *Molecular Pharmacology* 73 (3), 613–615.
- Wang, H., Lee, E.W., Zhou, L., Leung, P.C., Ross, D.D., Unadkat, J.D., Mao, Q., 2008. Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. *Molecular Pharmacology* 73 (3), 845–854.
- Wang, H., Masironi, B., Eriksson, H., Sahlin, L., 1999. A comparative study of estrogen receptors alpha and beta in the rat uterus. *Biology of Reproduction* 61 (4), 955–964.
- Wang, H., Wu, X., Hudkins, K., Mikheev, A., Zhang, H., Gupta, A., Unadkat, J.D., Mao, Q., 2006a. Expression of the breast cancer resistance protein (*Bcrp1/Abcg2*) in

- tissues from pregnant mice, effects of pregnancy and correlations with nuclear receptors. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 291 (6), E1295–E1304.
- Wang, H., Zhou, L., Gupta, A., Vethanayagam, R.R., Zhang, Y., Unadkat, J.D., Mao, Q., 2006b. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17beta-estradiol in human placental BeWo cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 290 (5), E798–E807.
- Yague, E., Armesilla, A.L., Harrison, G., Elliott, J., Sardini, A., Higgins, C.F., Raguz, S., 2003. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *Journal of Biological Chemistry* 278 (12), 10344–10352.
- Yang, C.P., DePinho, S.G., Greenberger, L.M., Arceci, R.J., Horwitz, S.B., 1989. Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *Journal of Biological Chemistry* 264 (2), 782–788.
- Zhang, Y., Zhou, G., Wang, H., Zhang, X., Wei, F., Cai, Y., Yin, D., 2006. Transcriptional upmodulation of breast cancer resistance protein by 17beta-estradiol in ERalpha-positive MCF-7 breast cancer cells. *Oncology* 71 (5–6), 446–455.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, modulations and intake of zearalenone, an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45 (1), 1–18.

II.1.1.d. RESULTATS-DISCUSSION

Nous n'avons pas pu établir de corrélation entre les teneurs tissulaires en ZEN et métabolites et l'effet observé sur l'expression des transporteurs ABC, ce qui suggère un mécanisme d'action à très faible dose ou une courbe dose-réponse non conventionnelle, tel que cela a été décrit pour les PEs. Tous les organes montrent une modulation de l'expression d'une partie ou de la totalité des transporteurs et récepteurs étudiés, mais cette modulation varie fortement de façon qualitative (induction/répression) et quantitative en fonction des tissus et du temps écoulé après l'exposition à la ZEN. L'utérus est l'organe présentant les plus fortes variations d'expression, les messagers et protéines *Abcb1* et *Abcg2* étant induits, tandis que *Abcc1* et *Abcc3* sont inhibés puis dans un second temps induits. Les conséquences d'une telle modulation, dépendant de la localisation membranaire apicale ou basolatérale de chaque transporteur au sein de l'organe, pourraient influencer les échanges maternels-fœtaux non seulement de xénobiotiques mais aussi de substrats endogènes tels que la progestérone.

II.1.1.e. CONCLUSION

Nos résultats ont mis en évidence pour la première fois une modulation de l'expression des transporteurs ABC dans le foie fœtal et les organes maternels de rattes exposées à la ZEN durant la gestation mais ne peuvent permettre d'établir d'hypothèses sur les conséquences que de telles modulations pourraient avoir sur la santé. Cependant, la modification de l'expression des transporteurs ABC dans le foie fœtal pose la question de la rémanence de ces effets une fois l'exposition à la ZEN terminée et leurs conséquences potentielles sur le développement du fœtus.

II.1.2. *In Vitro*

II.1.2.a. CONTEXTE DE L'ETUDE

L'exposition *in utero* suggère le franchissement du placenta. Le placenta peut être considéré comme une barrière conditionnant le passage des substances à l'image de toute autre barrière physiologique telle que l'intestin. En effet, plusieurs travaux montrent que de nombreux xénobiotiques absorbés par la mère sont susceptibles de traverser cette barrière par des mécanismes de transport actif via des protéines d'efflux.

Parallèlement à sa fonction de transfert, le placenta joue un rôle majeur dans le déroulement de la grossesse par ses fonctions endocrines. En amont des effets toxiques au niveau du fœtus, il est donc également un des garants d'une grossesse menée à terme sans problèmes majeurs tels qu'avortements, accouchements prématurés, éclampsies, retards de croissance *in utero*.... Enfin, il s'agit d'un organe hormono-dépendant qui évolue d'un point de vue fonctionnel et morphologique tout au long de la grossesse.

Ces éléments ont été à la base de l'hypothèse selon laquelle le placenta peut constituer un tissu cible de l'effet des contaminants environnementaux à effet PE, dont la ZEN et ses métabolites. Pour répondre à ces questions nous avons choisi d'étudier les effets de la ZEN et de ses métabolites principaux (α -ZEL et β -ZEL) sur des cellules placentaires (lignée BeWo) issues d'un choriocarcinome humain. Il s'agit de trophoblastes villositaires recouvrant l'arbre villositaire, siège des échanges fœto-maternels et des fonctions endocrines placentaires qui sont capables de se différencier en syncytiotrophoblaste.

II.1.2.b. OBJECTIFS

Les effets de la ZEN sur l'expression des transporteurs ABC (MRP1, MRP2 et BCRP) et sur la différenciation cellulaire des trophoblastes ont été préalablement mis en évidence dans des travaux antérieurs (Prouillac et al., 2009).

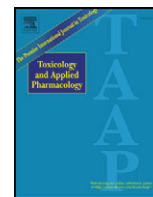
Les objectifs de cette étude ont été de comparer les effets de la ZEN à ceux de ses métabolites (α -ZEL et β -ZEL) afin de comprendre l'importance des propriétés oestrogéniques et l'implication des récepteurs nucléaires dans la modulation de l'expression des transporteurs ABC et dans la différenciation cellulaire induite par la ZEN. Au préalable, nous avons montré que la ZEN n'étant pas métabolisée par les cellules BeWo, cette lignée cellulaire constituait un bon modèle d'étude des effets de la ZEN et de ses principaux métabolites de façon indépendante.

II.1.2.c. RESULTATS: PUBLICATION 3

In vitro toxicological effects of estrogenic mycotoxins on human placental cells: structure activity relationships

Prouillac, C., **Koraichi, F.**, Videmann, B., Mazallon, M., Rodriguez, F., Baltas, M., Lecoer, S. 2012

Toxicol Appl Pharmacol, 259, 366-75



In vitro toxicological effects of estrogenic mycotoxins on human placental cells: Structure activity relationships

Caroline Prouillac^{a,*}, Farah Koraichi^a, Bernadette Videmann^a, Michelle Mazallon^a, Frédéric Rodriguez^{b,1}, Michel Baltas^{b,1}, Sylvaine Lecoœur^a

^a Université Lyon, US/C 1233 INRA VetAgroSup, Métabolisme et Toxicologie Comparée des Xénobiotiques, 1 avenue Bourgelat, BP 83, 69280 Marcy l'Etoile, France

^b Université Paul Sabatier, SPCMB-UMR5068, Laboratoire de Synthèse et de Physicochimie des Molécules d'Intérêt Biologique, 118 route de Narbonne, 31062 TOULOUSE cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2011

Revised 20 January 2012

Accepted 21 January 2012

Available online 31 January 2012

Keywords:

Mycotoxins

Zearalenone

Placenta

Differentiation

ABC transporter

Nuclear receptor

ABSTRACT

Zearalenone (ZEN) is a non-steroid estrogen mycotoxin produced by numerous strains of *Fusarium* which commonly contaminate cereals. After oral administration, ZEN is reduced via intestinal and hepatic metabolism to α - and β -zearalenol (α ZEL and β ZEL). These reduced metabolites possess estrogenic properties, α ZEL showing the highest affinity for ERs. ZEN and reduced metabolites cause hormonal effects in animals, such as abnormalities in the development of the reproductive tract and mammary gland in female offspring, suggesting a fetal exposure to these contaminants.

In our previous work, we have suggested the potential impact of ZEN on placental cells considering this organ as a potential target of xenobiotics. In this work, we first compared the in vitro effects of α ZEL and β ZEL on cell differentiation to their parental molecule on human trophoblast (BeWo cells). Secondly, we investigated their molecular mechanisms of action by investigating the expression of main differentiation biomarkers and the implication of nuclear receptor by docking prediction. Conversely to ZEN, reduced metabolites did not induce trophoblast differentiation. They also induced significant changes in ABC transporter expression by potential interaction with nuclear receptors (LXR, PXR, PR) that could modify the transport function of placental cells. Finally, the mechanism of ZEN differentiation induction seemed not to involve nuclear receptor commonly involved in the differentiation process (PPAR γ). Our results demonstrated that in spite of structure similarities between ZEN, α ZEL and β ZEL, toxicological effects and toxicity mechanisms were significantly different for the three molecules.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Contamination of cereals by mycotoxins poses certain health questions. The mycotoxin ZEN is a secondary metabolite produced by numerous strains of *Fusarium* fungi which contaminate a large variety of foods. This non-steroid estrogen mycotoxin leads to toxic effects in animals and human (Zinedine et al., 2007) and is classified by IARC under group 3 carcinogens (IARC, 1999).

After intake, ZEN is reduced via intestinal and hepatic metabolism to alpha and beta-zearalenol (α ZEL and β ZEL) (Malekinejad et al., 2006) (Fig. 1). ZEN and derivatives show similar estrogenic properties, with the exception of α ZEL which possess a higher estrogenic activity (Minervini et al., 2005). The effects of an inevitable exposure of population and children to these toxins, with probable adverse outcomes, need to be scientifically assessed.

Most studies report reproductive toxicological effect of ZEN in animals (decrease in the size of the litter in small ruminant females,

penis abnormalities and degenerating sperm in males, Zinedine et al., 2007) and humans (central precocious puberty, endometrial adenocarcinomas, Massart et al., 2008; Szuetz et al., 1997; Tomaszewski et al., 1998).

In toxicology, toxic effects on fetal development have usually been considered as a consequence of environmental contaminants exposure via placental transfer. Indeed, placenta is the key organ that regulates the exchange of nutrients, gasses, waste, endogenous and foreign molecules between maternal and fetal circulations (Prouillac and Lecoœur, 2010). However, in human pregnancy, successful placentation and remodeling of the uterine vasculature are crucial for a healthy pregnancy and also for fetal development: dysregulation of these phenomena may have a potential role in the development of preeclampsia or intrauterine growth restriction (Cartwright et al., 2010). In particular, trophoblasts differentiation process seems to be a critical step. After nidation, the trophoblast differentiates in two ways: the extra-villous trophoblast (which is the precursor of the invasive trophoblast) and the villous (which is the precursor of the syncytiotrophoblast). Villous trophoblast cells proliferate and differentiate by fusion to form a continuous, uninterrupted, multinucleated layer that regulates the exchange of substrates, gasses and other

* Corresponding author. Fax: + 33 4 78 87 80 12.

E-mail address: c.prouillac@vetagro-sup.fr (C. Prouillac).

¹ Fax: + 33 5 61 55 60 11.

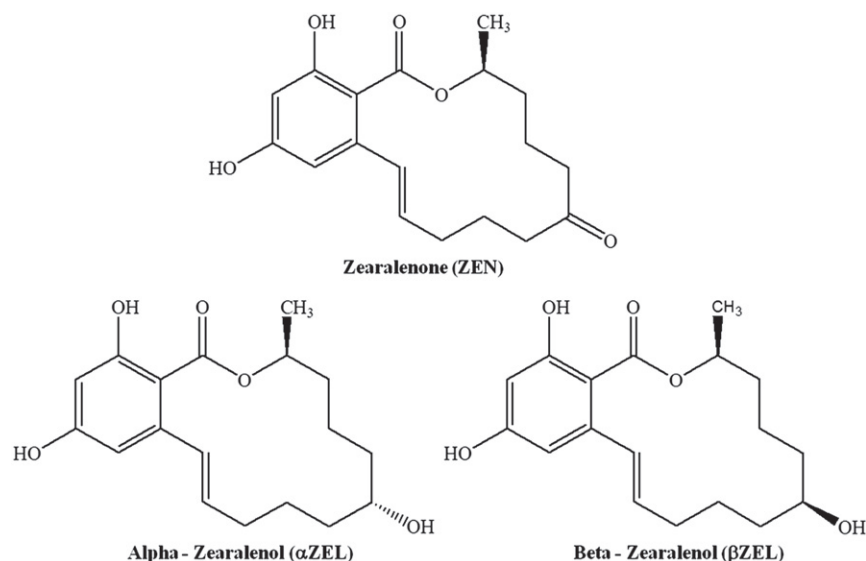


Fig. 1. Chemical structures of mycotoxins.

factors between the maternal and fetal circulations and synthesizes and secretes steroid hormones (progesterone, estrogens) and many protein hormones, including placental lactogen and chorionic gonadotropin (hCG) (Guibourdenche et al., 2009). Fusion of cytotrophoblasts to the syncytiotrophoblast depends on multiple key elements: it is well established that the activation of adenylyl cyclase leads to increased expression of cAMP, hCG, and several proteins as the envelope protein of a recently identified human endogenous defective retrovirus (Syncytin 1 and Syncytin 2) (Delidakis et al., 2010). Tarrade et al. (2001) suggested also the role of nuclear receptor (PPAR γ) in trophoblast differentiation. Dysregulation of some factors could result in aberrant villous trophoblast turnover (Gauster et al., 2009; Handwerker, 2010).

In previous work, we demonstrated the potential impact of ZEN on trophoblast differentiation suggesting a potential role on pregnancy disorders (Prouillac et al., 2009). ZEN modulated also the expression of major ABC membrane transporters implicated in endogenous and foreign molecule exchanges between mother and fetus (Prouillac and Lecoecur, 2010). Finally, we established a link between cell differentiation and modulation of ABC transporters expression.

Toxicological effect of α ZEL and β ZEL on placenta cells and potential interaction with nuclear receptors are not already described. In this work, to elucidate the mechanism of action of ZEN on syncytialization process, we first compared the respective effects of ZEN with its major metabolites, α ZEL and β ZEL, on syncytialization, by analyzing the toxin effect on differentiation biomarkers already identified as crucial regulators of trophoblast cell fusion (hCG, Syncytins, intracellular cAMP) (Delidakis et al., 2010; Yang et al., 2003). We also investigated the modulation of major ABC transporter expression by α ZEL and β ZEL. MRP1, MRP2 and BCRP are the best studied ABC efflux transporters expressed in placenta and play a key role in expelling chemicals across the maternal fetal interface (Prouillac and Lecoecur, 2010).

Finally, according to numbers of studies reported the involvement of hormonal and orphan nuclear receptors in ABC transporter expression modulation (Ding et al., 2006; Tarrade et al., 2001; Wang et al., 2006; Wang et al., 2008), we investigated, by docking studies, potential interaction of mycotoxins with nuclear receptors (PPAR γ , PR, LXR).

Material and methods

Chemicals and reagents. ZEN, α ZEL, β ZEL, FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment, forskolin and MTT (3-[4,5-

dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Saponin came from Acros organics, Noisy-le-Grand, France. The hCG immunoassay kit used for the quantitative measurement of hCG in culture media came from Bio-Line (Bruxelles, Belgique) and colorimetric ELISA kit for cAMP intracellular quantification was purchased from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France). Primary antibodies (JSB-1, M₂I-4, BXP-34) were obtained from Alexis Biochemicals Corp. (San Diego, CA, USA). Mouse IgG1 isotype (MOPC 31C) came from Ancell Corp. (Bayport, MN, USA).

Cell culture and treatments. The BeWo cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC-CCL-98) and was used between passages 194 and 205. BeWo cells were maintained in DMEM/Ham's F12 (Invitrogen Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Perbio Science, Brebières, France), 100 U/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen Cergy Pontoise, France) in 75-cm² flasks (Falcon, VWR international, Strasbourg, France) in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C. Medium was changed three times a week and cells were sub-cultured at 70–80% confluency using a 0.25% trypsin-EDTA solution (Invitrogen Cergy Pontoise, France).

Before exposure, cells were washed with PBS and further cultured in serum-free medium. The BeWo cells (100 000 cells/cm²) were exposed 3 days after seeding on 12 wells plates or 25-cm² flasks (Falcon, VWR international, Strasbourg, France). Serum-free medium was used to avoid possible stimulatory effects of growth factors present in FCS. For induction of differentiation, cells were treated for 48 h with forskolin, an activator of adenylyl cyclase.

Selected concentrations of α ZEL, β ZEL, ZEN and forskolin, were prepared as 1000 \times stocks in dimethyl sulphoxide (DMSO). For 48 h exposure, chemicals were administered in the solvent vehicle, and the concentration was limited to 0.1% (v/v). The medium was changed every day. The control cells were cultured in the media containing vehicle (0.1% v/v DMSO) under the same conditions.

MTT cell viability assay. Cell viability in undifferentiated cells was assayed by the MTT test, as described in our previous report (Prouillac et al., 2009). BeWo cells were exposed to 0.1–100 μ M α ZEL and β ZEL at day 3–4 post-seeding when cells were confluent. Two exposure times (24 h, 48 h) were tested. Absorbance at 490 nm was read using a Microplate reader (SpectraCount, Perkin-Elmer). Cell viability is expressed as the relative formazan formation in

treated samples when compared to control cells [(A_{490} treated cells/ A_{490} control cells) 100%].

hCG measurement in culture media. Conditioned media were collected from wells at 48 h after exposure and kept at -20°C . hCG in cell culture medium was quantified using enzyme immunoassay kit which is based on the sandwich technology and detects both whole hCG molecule and its free subunit α and β -hCG present in media. The assay was conducted according to the manufacturer's instructions. The optical density was read at 450 nm with a microplate reader (SpectraCount, Perkin-Elmer), and results were normalized to protein concentration (Bradford method). The intensity of color developed from the peroxidase-substrate reaction was proportional to the concentration of hCG in the sample.

cAMP measurement. Intracellular levels of cAMP were determined following the manufacturer's instructions of the enzyme immunoassay kit. Briefly, after treatment the cells were washed once with saline buffer, incubated for 10 min in 0.1 M HCl to stop endogenous phosphodiesterase activity, and scraped into microcentrifuge tubes. After centrifugation, direct cAMP measurements were performed on supernatants after acetylation. The optical density was read at 405 nm with a microplate reader (SpectraCount, Perkin-Elmer). The intracellular cAMP concentration was calculated by using a standard curve and normalized to protein concentration (Bradford method).

Flow cytometry. The expression of MRP1, MRP2 and BCRP in BeWo cells was analyzed by flow cytometry. Cells were harvested with trypsin-EDTA (1:20) in PBS (1 ml/well), and washed with PBS containing 4% fetal bovine serum, then fixed for 30 min at room temperature with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. After centrifugation (5 min, 400 g), cells were permeabilized by re-suspending the pellet in PBS containing 4% fetal bovine serum and 0.1% saponin. Anti-MRP1 (MRPm6, 1:5) anti-MRP2 (M2I-4, 1:5), anti-BCRP (BXP-34, 1:5) primary antibodies, mouse IgG1 isotype used as negative control, were added and cells were incubated at 4°C for 30 min under orbital agitation. After washing and centrifugation (5 min, 400 g), cells were incubated for 30 min at 4°C in PBS containing 0.1% saponin, 4% fetal bovine serum, and FITC-conjugated IgG F(ab')₂ fragment (1:100). The labeled cells were washed in PBS containing 0.1% saponin and 4% fetal bovine serum, then fixed in a 1% PFA/PBS (v/v) solution and kept at 4°C until analysis.

Fluorescence was measured with the Accuri C6 flow cytometer (Accuri, Ann Arbor, MI) and data analyzed with CFlow software. Analysis was based on light-scatter and fluorescence signals produced from 20 mW laser illumination at 488 nm and being screened by the following filter configurations FL1 533/30 nm band pass filter. Forward (FSC) and side (SSC) scatter data were used to establish a gate excluding dead cells and debris.

Real time RT-PCR. Cells were immediately collected in RNA Later (Qiagen, Courtaboeuf, France) before RNA extraction. Total RNA was isolated from BeWo with RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified with RiboGreen® RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Assays were carried out according to the manufacturer's instructions. RNA was amplified by using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Real-time quantitative RT-PCR was performed in an Mx3000 cyclor (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) using SybrGreen dye (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Primer concentrations were 400 nM. The relative mRNA levels in each sample were normalized to two housekeeping genes, β -actin and 3-phosphoglycerate kinase (PGK). Primer sequences, product size and origin are indicated in Supplementary data S1. After RT, the thermal cycling comprised a denaturation step at 94°C for 15 s, 40 cycles at 95°C for 10 s, 50–

60°C for 30 s, 72°C for 30 s. In prevalidation experiments the conditions for the PCR cycles were optimized and the PCR slope and PCR efficiency were calculated for each gene which permits efficiency-corrected comparative quantitation (Pfaffl, 2001). Primer pair specificity was tested at the end of every run by melting curve analysis, and amplification specificity was confirmed by electrophoresis in a 2% agarose gel. After GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) staining, visualization under Ultra Violet light showed a single band with the expected size for each gene.

Expression of target genes was normalized to the level of β -actin and expressed relative to a control (untreated sample). Normalization to PGK was also performed to confirm results obtained using β -actin. Reactions were carried out in duplicate.

Computational study. Discovery Studio Client and UCSF Chimera software were used for protein–ligand interaction visualization. Docking studies were realized with Molegro Virtual Docker software. The methods are described in Supplementary data 2.

Statistical analysis. All experiments were performed in triplicate. Statistical analysis was performed using the unpaired Student *t*-test (XLSTAT-PRO 2010). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Cytotoxicity assay

The viability of the placental cells was measured by means of the MTT assay after culturing in presence of the mycotoxins for 48 h.

The cytotoxic effect of the two mycotoxins increases in relation to increasing concentration (Fig. 2). A significant effect on cell viability was observed from up to $10\ \mu\text{M}$ and IC_{50} are evaluated at $75\ \mu\text{M}$ for αZEL and $50\ \mu\text{M}$ for βZEL . As the MTT test can also be used to measure proliferation, we observed a slight proliferating effect at lowest concentrations. In accordance with these results, mycotoxin effects were studied at concentrations of 0.1 – $10\ \mu\text{M}$. Concentrations of other compounds were chosen according to literature data, absence of cytotoxicity being verified for each compound.

Differentiation study

hCG measurement

To highlight a potential effect of reduced metabolites of ZEN on BeWo cells differentiation, the levels of hCG were measured in the

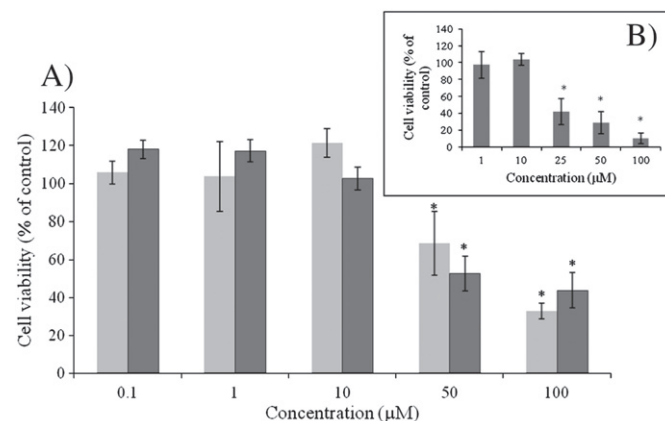


Fig. 2. Effect of ZEN, αZEL and βZEL on BeWo cells viability. BeWo cell monolayers were exposed to A) αZEL and βZEL (0.1 – $100\ \mu\text{M}$) during 48 h and B) ZEN (1 – $100\ \mu\text{M}$) during 48 h. Data are mean \pm S.D. ($n = 8$) expressed as % of control response. Statistically different from control cell monolayers, * $p < 0.01$.

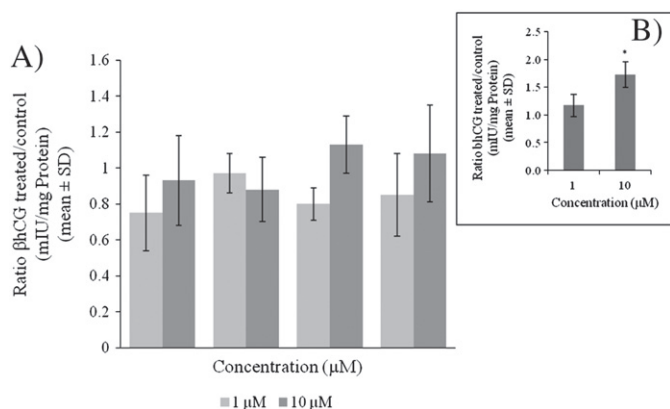


Fig. 3. hCG secretion in conditioned media of BeWo cells. A) Effect of α ZEL and β ZEL (1, 10 μ M) at 24 h and 48 h; B) Effect of ZEN (1, 10 μ M) at 48 h. Results are expressed as the ratio of hCG (mIU/mg protein) treated vs untreated cells. The measurement was carried out in duplicate wells from three experiments (mean \pm SD, $n = 3$).

supernatants from cultured trophoblast at 24 h and 48 h exposure with mycotoxins (Fig. 3). Results were expressed relative to our control conditions and normalized to total protein account to proliferative observed effect. No significant effect of α ZEL and β ZEL was observed on hCG production.

Otherwise, this absence of effect on biochemical cell differentiation was associated with the absence of morphological change such as syncytialization (data not shown).

cAMP measurement

To confirm and explain the potential differential effect of ZEN to its reduced metabolites on cell differentiation process, we determined intracellular cAMP production in response to 48 h mycotoxin exposure (10 μ M) (Fig. 4). Results are normalized to total protein. Forskolin was used as positive control to validate our conditions: a 5-fold increase in cAMP production was provoked by forskolin (5.88 ± 0.40 pmole/mg protein) relative to our control condition (0.28 ± 0.02 pmole/mg protein).

No significant effect was observed after ZEN exposure whereas the cAMP production was significantly increased after α ZEL (0.50 ± 0.21 pmole/mg protein) and β ZEL (0.59 ± 0.08 pmole/mg protein) treatment.

Characterization of human syncytin-1, syncytin-2 and hCG transcripts

To explore and compare the differential effect of the three mycotoxins on proteins which are implicated in syncytialization, we

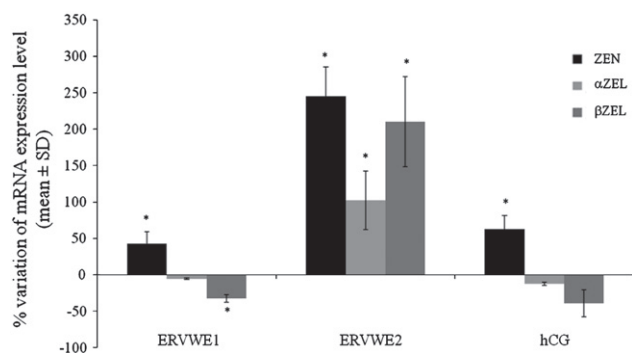


Fig. 4. Effect of ZEN, α ZEL and β ZEL (10 μ M) on intracellular cAMP in BeWo cells. Results are expressed in pmole/mg protein of intracellular cAMP after 48 h mycotoxin exposure. The measurement was carried out in duplicate wells (mean \pm SD, $n = 3$). Statistically different from control cell monolayers, * $p < 0.05$.

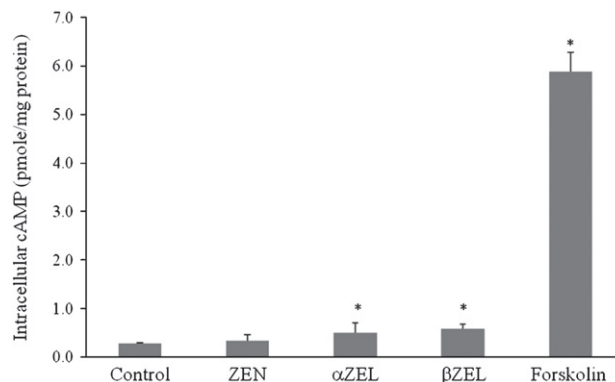


Fig. 5. Effect of ZEN, α ZEL and β ZEL on mRNA expression of differentiation biomarkers in BeWo cells. Relative ERVWE1, ERVWE2 and hCG levels normalized to β -actin were determined as described in Material and methods. Data shown are means \pm SD from 3 independent experiments. Statistically significant from control (unexposed) cells, * $p < 0.05$.

determined the regulation expression of Syncytin-1 (ERVWE1), Syncytin-2 (ERVWE2) and hCG proteins at 48 h (Fig. 5). Results are expressed relative to control conditions.

Relative expression of ERVWE2 was significantly induced by the three mycotoxins: the greater induction was observed in response to ZEN (10 μ M) followed by β ZEL (10 μ M) and α ZEL (10 μ M).

A significant induction of ERVWE1 and hCG mRNA was observed in response to ZEN (10 μ M), while significant inhibition of ERVWE1 and hCG mRNA was observed in response to β ZEL (10 μ M) and no effect on these transcripts was observed with α ZEL (10 μ M).

ABC transporter expression

As cell differentiation and ABC transporter expression may be linked (as previously shown for ZEN, Prouillac et al., 2009), we studied the effect of α ZEL and β ZEL on ABC transporter mRNA and protein expression.

Results showed a differential effect of α ZEL and β ZEL on ABC transporter regulation expression at mRNA (Fig. 6) and protein levels (Fig. 7).

In response to α ZEL (0.1–10 μ M), we observed an early inhibition effect at 24 h on MRP1 ($60.0 \pm 22.5\%$), MRP2 ($40.0 \pm 2.6\%$ to $59.0 \pm 5.7\%$) and BCRP ($31.0 \pm 7.2\%$) mRNA expression (Fig. 6A). This effect was more significant for the lower (0.1–1 μ M) than for the higher (10 μ M) concentrations and completely abolished at 48 h. Effects were not concentration or time dependant.

In response to β ZEL, the expression regulation of ABC transporter is quite different from that observed for α ZEL (Fig. 6B). MRP1 mRNA was significantly induced by 0.1 μ M β ZEL from 24 h ($74 \pm 6.6\%$) whereas this effect decreased with increasing concentration at 24 h and at 48 h for the same dose ($25 \pm 2.6\%$) suggesting a dose dependant transient effect. Otherwise, β ZEL 10 μ M led to significant inhibition of MRP1 mRNA at 48 h ($54 \pm 12.9\%$). The regulation of MRP2 mRNA was also dose dependent: at 24 h, for lowest concentrations, MRP2 mRNA was significantly induced until 1 μ M ($57.5 \pm 3.4\%$ to $112.25 \pm 6.1\%$) and dropped at 10 μ M. This phenomenon is completely reversed at 48 h with a significant induction ($53.0 \pm 10.0\%$) in response to β ZEL (10 μ M).

Finally, significant effect on BCRP regulation in response to β ZEL (1–10 μ M) was observed at 48 h with an inhibition ($17.6 \pm 4.0\%$ and $19.3 \pm 0.8\%$) whereas a slight induction was observed in response to 0.1 μ M β ZEL ($11.3 \pm 2.1\%$).

To correlate observed variation of mRNA expression we investigated the effect of mycotoxins on ABC transporter protein expression by flow cytometry. No significant effect was observed at 24 h and for the lowest concentration 0.1 μ M.

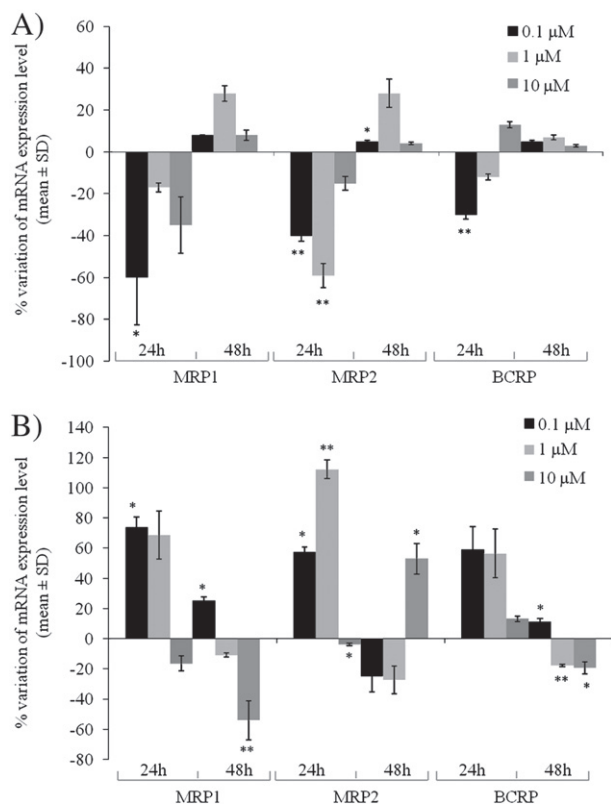


Fig. 6. Effect of α ZEL and β ZEL on ABC transporter mRNA expression in BeWo cells. Relative ABC transporter levels normalized to β -actin were determined as described in [Material and methods](#). Data shown are means \pm SD from 3 independent experiments. A) Effects of α ZEL (0.1–10 μ M) on MRP1, MRP2 and BCRP. B) Effects of β ZEL (0.1–10 μ M) on MRP1, MRP2 and BCRP. Statistically significant from control cells (unexposed), * p <0.05, ** p <0.01.

In response to α ZEL 10 μ M during 48 h, MRP1 and MRP2 were significantly induced (MRP1: $35.7 \pm 7.4\%$ and MRP2: $81.3 \pm 3.6\%$) whereas there was no effect on BCRP protein expression level ([Fig. 7A](#)).

In response to β ZEL 10 μ M during 48 h, MRP1 and BCRP were significantly inhibited (MRP1: $19.5 \pm 4.9\%$ and BCRP: $32.4 \pm 6.8\%$ to $46.7 \pm 2.9\%$) whereas there was no effect on MRP2 protein expression level ([Fig. 7B](#)).

As for transcript regulation analysis, the extent of protein expression variation concerned MRP2, MRP1 and BCRP in decreasing order.

Molecular docking study

To better understand the role of mycotoxins in differentiation process and ABC transporter regulation, we used docking studies to investigate the potential interaction of these compounds with nuclear receptors described to be involved in these two phenomena.

Firstly we evaluated the relative expression of main nuclear receptor genes in undifferentiated trophoblast cells. Relative expression of hormonal nuclear receptors and orphan nuclear receptors are respectively represented in [Figs. 8A](#) and [B](#). Receptor expression was ranked as follows: Peroxisome Proliferator Receptor gamma (PPAR γ) > Progesterone Receptor A (PRA) > Retinoid X Receptor (RXR) > Progesterone Receptor B (PRB) > Liver X Receptor (LXR).

Pregnane X Receptor (PXR) and Farnesoid X Receptor (FXR) were detected at very low level, estrogen receptors (ER α , ER β) were at the detection limit, and Constitutive Androstane Receptor (CAR) was not detected.

We investigated molecular docking studies with well expressed receptors PR, LXR and PPAR γ . In this purpose, we collected a library of high-quality crystallographic structures of ligand binding domains

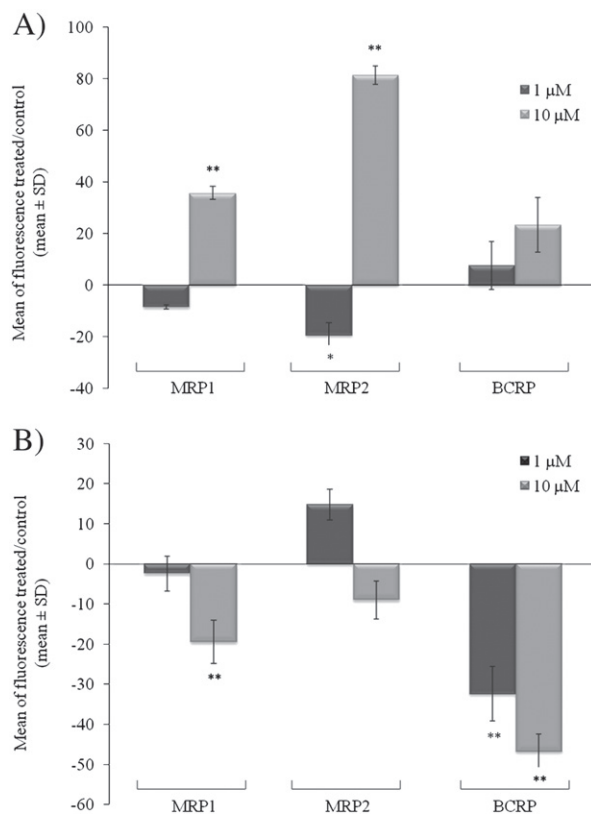


Fig. 7. ABC transporter protein expression modulation. BeWo cells were checked for MRP1, MRP2, BCRP expression after a 48 h of A) α ZEN (1, 10 μ M) and BeWo B) β ZEN (1, 10 μ M). Quantification was realized using mean of fluorescence ratio in exposed/unexposed cells. Data shown are mean \pm SD (n = 3). Statistically different from control cells (unexposed) * p <0.05, ** p <0.01.

of various human nuclear receptors to be used in virtual screening. Each receptor was represented by an ensemble of structures in order to capture possible conformational variations of the binding pocket (Supplementary data 2) in order to take in account possible conformational variations of the binding pocket.

Progesterone receptor

Because of structural similarities with progesterone, ZEN, α ZEL and β ZEL had a high probability to bind to the ligand binding pocket: ZEN, α ZEL and β ZEL had the same orientation and fit in a good way in the binding pocket of PR ([Fig. 9](#)). This assessment was confirmed by docking scores (in Supplementary data 2).

As [Williams and Sigler \(1998\)](#) already demonstrated, the specific determinant of progesterone was the 3-keto substituent which established three hydrogen bonds with GLN 725, ARG 766 and water site. These residues (GLN725 and ASP 766) were also involved in hydrogen interaction with ZEN and β ZEL.

Interaction of ZEN with protein residue was characterized by only one hydrogen bond with GLN725. No hydrogen bonds were observed when we considered α ZEL whereas two hydrogen bonds were notified between β ZEL and the critical residue ARG766 and GLN725. We were therefore able to classify mycotoxins by their bound capacity as β ZEL > ZEN > α ZEL, without suggesting any biological action of them (i.e. activation or inactivation).

Liver X receptor

The ligand-binding pocket of LXR α is a large hydrophobic cavity with only a few possible hydrogen bond interactions ([Fig. 10](#)). Instead

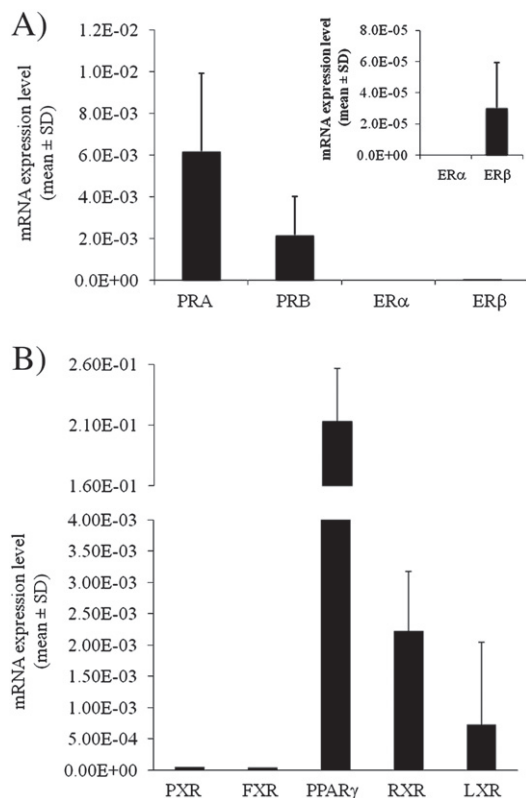


Fig. 8. Relative mRNA expression profile of nuclear receptors in undifferentiated BeWo cells. A) Hormonal nuclear receptor B) Orphan nuclear receptor. Expression of the target genes was normalized to the level of β -actin (mean \pm SD, $n = 3$).

of ZEN, α ZEL and β ZEL had the same orientation and fit in the binding pocket of LXR. ARG 305 is the only residue that interacts directly with the reference agonist ligand, GW3965 whereas THR 302 was the only residue that interacted with α ZEL (three hydrogen bonds) and β ZEL (two hydrogen bonds). No interaction with ZEN and protein residue was observed.

Peroxisome proliferator activated receptor gamma

PPAR γ has much larger bended ligand binding pocket than other nuclear receptors (Fig. 11); this binding pocket explained that PPAR γ ligands were characterized by high flexibility. Indeed, in general the ligand is in a U-shaped conformation and makes interactions with TYR473, SER289 and GLN286. A ligand-entry site in this cavity is apparent from the crystal structure.

Because of this particular ligand binding site conformation and high flexibility, we were unable to establish a good model for docking study (no correlations were obtained between predicted docking score and crystal structure). However, it seemed that because of the relatively low flexibility and size of ZEN and its metabolites, these molecules could not adopt a U-shaped conformation and establish interactions with the same residues as rosiglitazone. The ligand-entry could limit the accessibility of ZEN and its metabolites to the ligand binding domain.

Discussion

ZEN and its major reduced metabolites, α ZEL and β ZEL, are endocrine disruptors that cause estrogenic effects and alter reproductive tracts. Toxicological and biological effects of ZEN on human placental cells have already been described (Prouillac et al., 2009). In the present study, we investigated the molecular mechanism of action of

ZEN on trophoblast differentiation process in comparison to α ZEL and β ZEL by considering structural and hormonal properties of these molecules and recent data on trophoblast differentiation regulation.

First, toxicity of α ZEL and β ZEL was assessed by the MTT assay after 48 h incubation: cell viability was different for the two metabolites with a pronounced toxicity of β ZEL compared to α ZEL considering their respective IC_{50} . As it was already demonstrated by Ouanes-Ben Othmen et al. (2008) on Vero cells, α ZEL and β ZEL were less cytotoxic than ZEN on BeWo cells (Prouillac et al., 2009). The highest toxicity of the parent molecule could be due to its effect on cell cycle and trophoblast differentiation (Abid-Essefi et al., 2004; Prouillac et al., 2009). Indeed, the differentiation of BeWo cells in syncytiotrophoblasts does not occur spontaneously and this process was recently suggested to be associated with only the initiation but not the whole process of apoptosis (Chen et al., 2011).

The multinuclear syncytium is formed from mononuclear cytotrophoblasts through a process of differentiation that involves cellular aggregation followed by fusion of plasma membranes (morphological change) and protein up-regulation as placental lactogen and hCG which is classically considered as a biochemical differentiation marker. Moreover, by autocrine way, hCG promote the fusion of cytotrophoblast cells and their differentiation to syncytiotrophoblast cells (Cole, 2010).

To correlate the differential cytotoxicity effect of α ZEL and β ZEL on one hand and ZEN on the other hand with syncytialization, we investigated morphological change of BeWo cells after α ZEL and β ZEL exposure (data not shown). We did not observe syncytium formation as it was described for ZEN suggesting also a differential effect of ZEN and its metabolites on differentiation process.

As it was demonstrated by Al-Nasiry et al. (2006) in JEG-3 cells, morphological and biochemical changes can be dissociated in trophoblast differentiation; this is the reason why we studied the effect of α ZEL and β ZEL on hCG secretion. hCG secretion was not up regulated by α ZEL or β ZEL even at highest exposure concentrations whereas our previous study reported a significant increased in hCG secretion after ZEN exposure. Thus, α ZEL and β ZEL did not induce morphological and biochemical trophoblast differentiation (no hCG production).

Recently, a link between cell fusion and Syncytin-1 and Syncytin-2 expression was established. These syncytiotrophoblast markers are envelope proteins derived from human endogenous retroviruses (HERVs) and are greatly involved in syncytialization (Pötgens et al., 2004). In BeWo cells, Vargas et al. (2009) reported that Syncytin-1 and Syncytin-2 were positively modulated upon stimulation by forskolin, an inducer of syncytialization: Syncytin-2 seemed to be essential to fusion process and its expression showed a more pronounced response than Syncytin-1 as it was observed in our study for ZEN. Significant induction of Syncytin-2 was also observed after α ZEL or β ZEL exposure but no significant effect was observed for Syncytin-1. These results suggested that induction of cell fusion by ZEN was correlated with up-regulation of both Syncytin-1 and Syncytin-2.

Regulation of the formation of multinucleated syncytiotrophoblast via cell fusion of mononuclear cytotrophoblast is not clearly elucidated and we proposed a synthetic scheme of the multiple pathway involved in trophoblast differentiation (Fig. 12). A number of studies have reported the central role of cAMP and proteins activating by protein kinase A (Keryer et al., 1998). For example, Syncytin-1 and Syncytin-2 are regulated by intracellular level of cAMP in trophoblast (Orendi et al., 2010) as well as hCG, (Handschuh et al., 2009) which is also regulated by a number of factors that regulate villous differentiation (glucocorticoids, growth factors, oxygen concentration). Our data suggested that α ZEL or β ZEL was able to significantly stimulate intracellular cAMP production as forskolin did whereas surprisingly this effect was not observed with ZEN; these results suggested that induction of differentiation by ZEN was not mediated by cAMP and that induction of cAMP production is not necessarily associated with

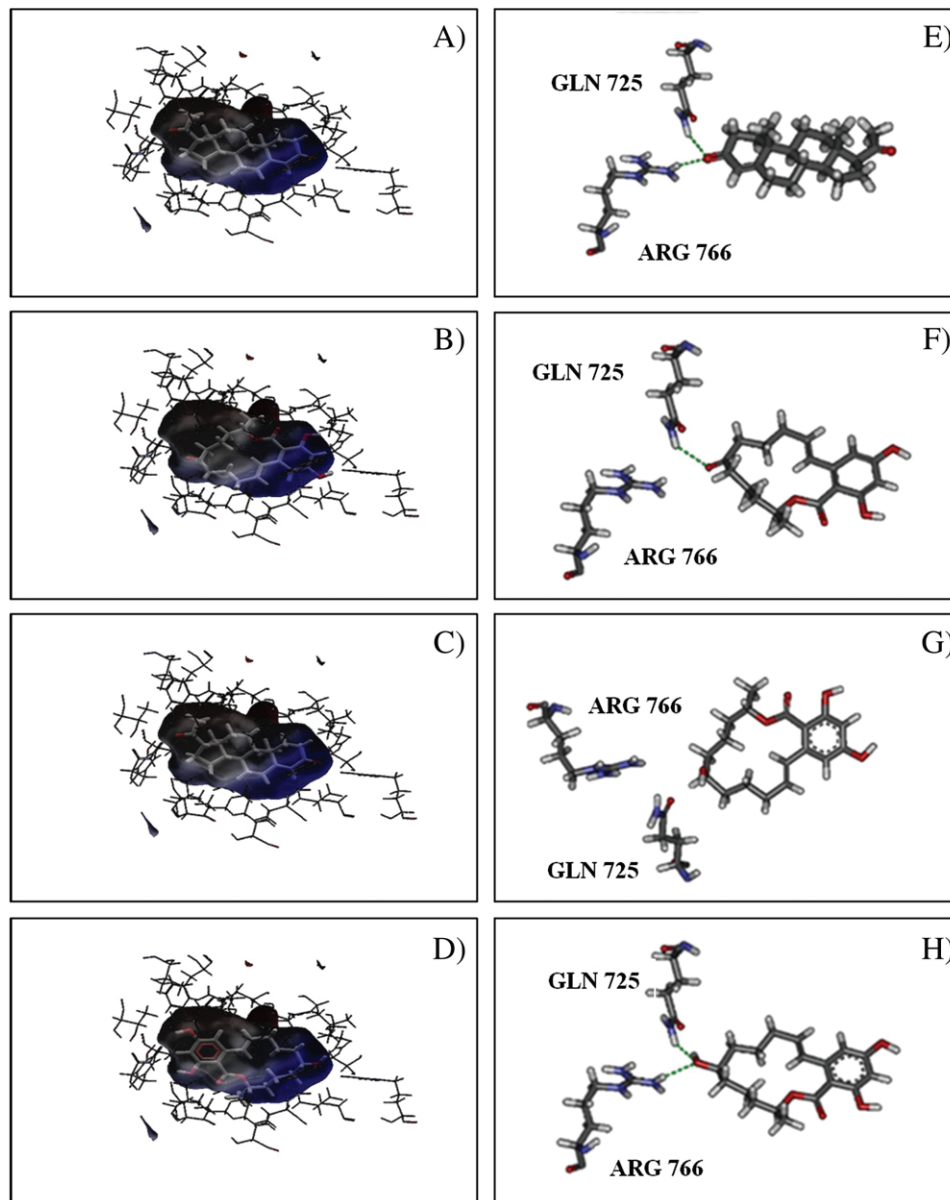


Fig. 9. Diagrams of the three dimensional structure of PR ligand binding domain. The PR structure was obtained from PDB (1a28). Figures A–D represent the protein hydrophobicity surface. Figures E–H represent hydrogen interactions of ligands with protein residues. Representative docking results from crystallographic data of the interaction A–E) of the physiological ligand (progesterone) to the ligand binding pocket of PR; B–F) of the interaction of ZEN to the ligand binding pocket of PR; C–G) of the interaction of α ZEL to the ligand binding pocket of PR D–H) of the interaction of β ZEL to the ligand binding pocket of PR. Studies were realized with protein side chain flexibility. Hydrogen bond distances were less than 2.5 Å.

differentiation. As shown in Orendi et al. (2010), increased cAMP activates protein kinase A which subsequently activates proteins such as the transcription factor glial cells missing 1 (GCM1). Target genes of GCM are Syncytin-1 in particular and also hCG. However, this is not the only way that leads to hCG variation: there is crosstalk between another way of stimulation of hCG production (Yoshie et al., 2010). Firstly, hCG has an autocrine and paracrine role in differentiation (Shi et al., 1993); secondly, Yang et al. (2003) suggested that direct activation of protein kinase A seems to bypass the hCG pathway by targeting genes associated with the differentiation. Finally activation of nuclear receptor could be involved in cell fusion. Handschuh et al. (2009) and Tarrade et al. (2001) suggested that hCG is regulated by PPAR γ -which has a major role in human cytotrophoblast differentiation.

As we observed in previous study, differentiation of BeWo cells was accompanied with ABC transporter expression variation (Prouillac et al., 2009). The expression variation observed after

forskolin treatment was similar to those obtained after ZEN exposure. Because of the differential effect of ZEN and its metabolites on BeWo cell differentiation, we investigated the comparative effect of α ZEL and β ZEL on ABC transporter expression at transcription and protein levels. As previously shown with ZEN (Prouillac et al., 2009), MRP1, MRP2 and BCRP seemed to be regulated by α ZEL and β ZEL; however, transporter modulation was different according to the toxin. α ZEL exposure led to a dose independent but significant inhibition of MRP1, MRP2, and BCRP mRNA from 24 h, whereas β ZEL exposures lead to significant induction of the transcription of these genes. For both molecules, the effect seemed to be normalized or even reversed after 48 h exposure. Variation of corresponding protein expression was consistent with mRNA levels but we observed a delay between mRNA and protein expression variation corresponding to the traduction step.

Because regulation of cell fusion as well as gene expression of ABC transporter has been demonstrated to involve nuclear receptors (Ding et al., 2006; Tarrade et al., 2001; Wang et al., 2006; Wang et

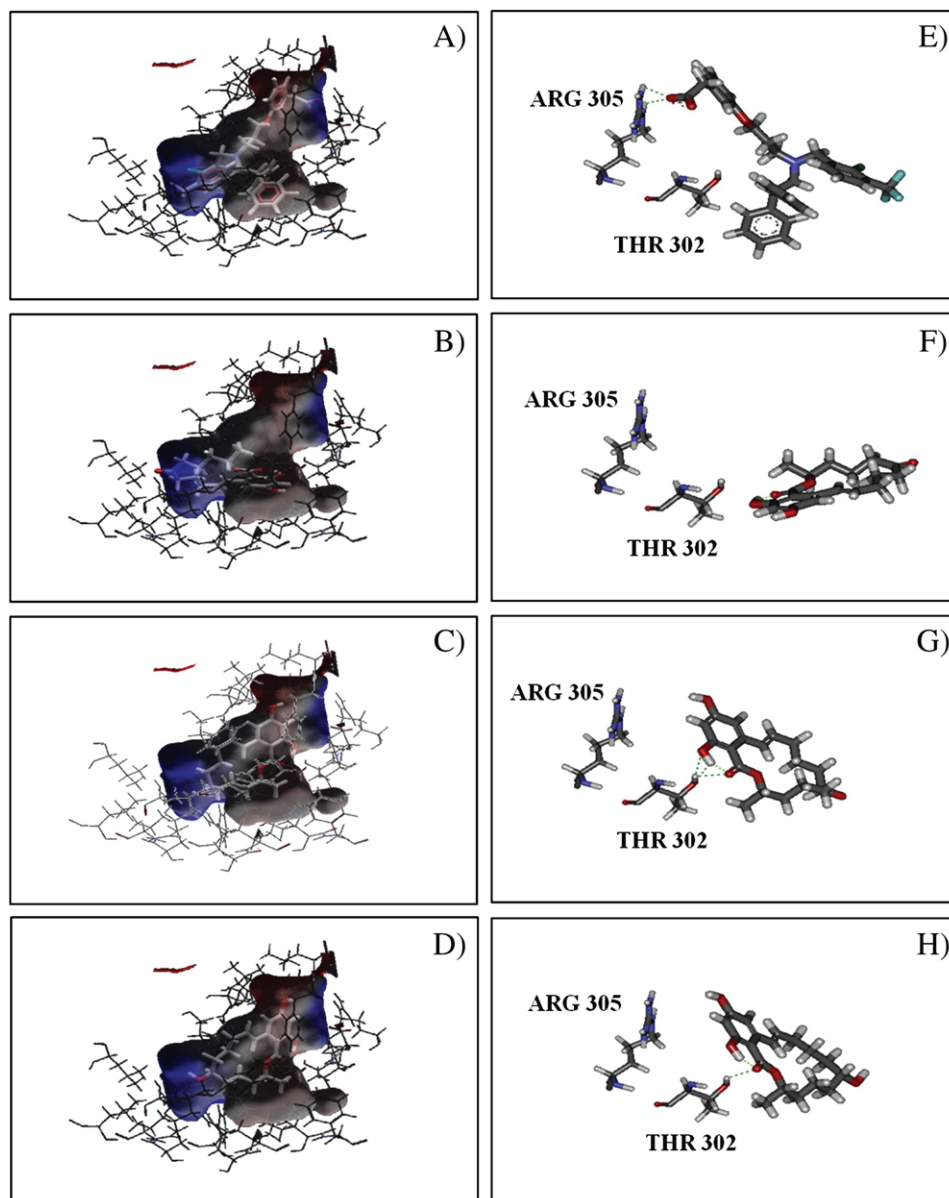


Fig. 10. The LXR structure was obtained from PDB (3IPQ). Figures A–D represent the protein electrostatic surface. Figures E–H represent hydrogen interactions of ligands with protein residues. Representative docking results from crystallographic data of the interaction A–E) of a synthetic reference agonist (GW3965) to the ligand binding pocket of LXR; B–F) of the interaction of ZEN to the ligand binding pocket of LXR; C–G) of the interaction of α ZEL to the ligand binding pocket of LXR D–H) of the interaction of β ZEL to the ligand binding pocket of LXR. Studies were realized with protein side chain flexibility. Hydrogen bond distances were less than 2.5 Å.

al., 2008), we investigated mRNA expression profile of main nuclear receptors in BeWo cells and tried to predict their potential interaction with ZEN, α ZEL and β ZEL by docking studies.

Considering the relative affinity of α ZEL, β ZEL and ZEN to ER (Minervini et al., 2005), our results suggested that estrogenic properties were not involved whereas estradiol was demonstrated to

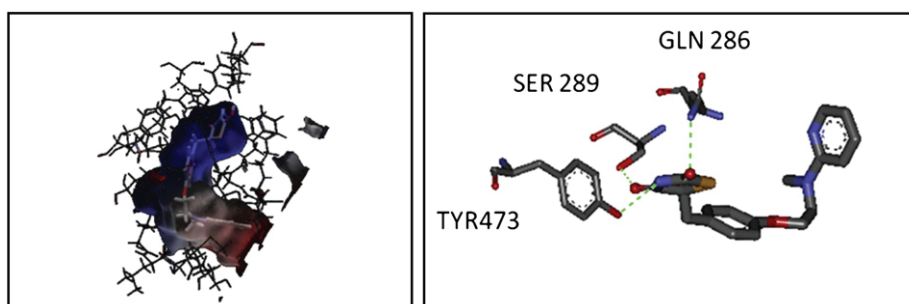


Fig. 11. Diagrams of the three dimensional structure of PPAR γ ligand binding domain. The PPAR γ structure was obtained from PDB (2PRG). Figures represent the protein electrostatic surface and the results from crystallographic data of the interaction of a synthetic reference agonist (rosiglitazone) to the ligand binding pocket of PPAR γ . Studies were realized with protein side chain flexibility. Hydrogen bond distances were less than 2.5 Å.

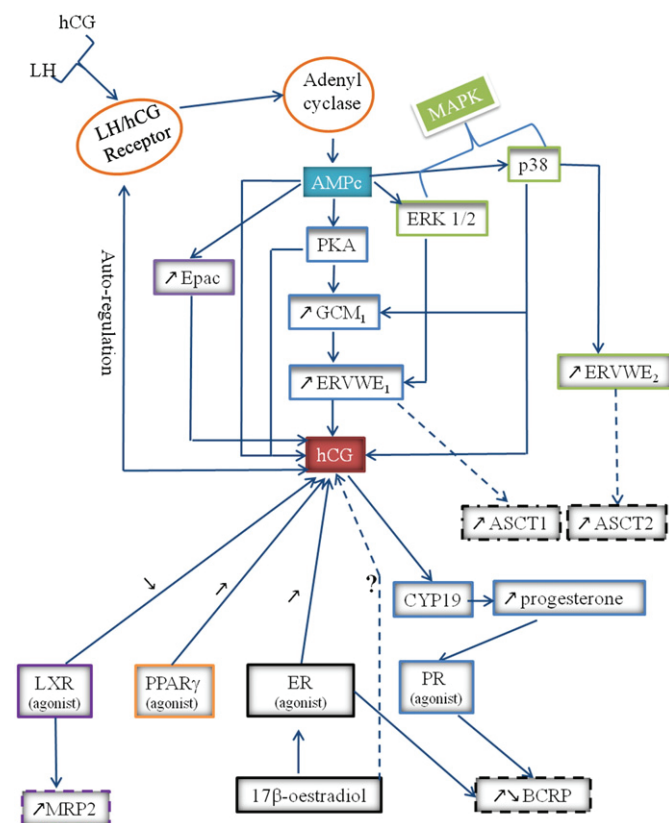


Fig. 12. Proposed pathways of trophoblast differentiation linked to ABC transporter expression regulation. Epac: exchange protein directly activated by cAMP; ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinases; MAPK: mitogen-activated protein kinase; ASCT1-2: Neutral Amino Acid Transporter 1–2; CYP19: aromatase. Adapted from: Chisaki et al. (2009), Cole (2010), Cronier et al. (1999), Handschuh et al. (2009), Kerker et al. (1998), Orendi et al. (2010), Shi et al. (1993), Tarrade et al. (2001), Wang et al. (2008).

stimulate biochemical and morphological trophoblast differentiation (Cronier et al., 1999). BCRP could be modulated by ER and PR (Wang et al., 2006), but expression level of ER α and ER β relatively to PRA and PRB let us suppose that the estrogenic route was not the main explanation for BCRP expression variation. Docking study suggested the ability of these three compounds to bind with PR with a great probability with β ZEL. Even if we could not differentiate PR isoforms, this result was in agreement with Wang et al. (2008) who demonstrated that PRA and PRB regulate BCRP expression.

MRP2 has been shown to be up-regulated by the nuclear receptors PXR (Kast et al., 2002) and recently by LXR. According to Chisaki et al. (2009) who demonstrated that LXR activation induced expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP, our results suggested that ZEN, α ZEL and β ZEL could interact with LXR. This hypothesis was strengthened by docking study which showed potential interactions of α ZEL and β ZEL (higher than ZEN) with LXR.

LXR agonists (oxysterols) regulate cholesterol transport from maternal to fetal circulation and other metabolic pathways as reducing the synthesis and secretion of hCG from trophoblast cells (Weedon-Fekjaer et al., 2005). However, as we have already discussed, the secretion of hCG is known to be regulated by multiple routes that had not allowed us to distinguish the involvement of LXR in observed effect of mycotoxins on hCG secretion.

Because it was previously demonstrated that ZEN could activate human PXR and CAR mRNA levels (Ayed-Boussema et al., 2011; Ding et al., 2006), we could not exclude that effects of ZEN and its metabolites on ABC transporter expression were mediated by these nuclear receptors which are expressed in BeWo cells (except CAR).

Finally, we investigated the potential role of PPAR γ in ZEN effect on trophoblast differentiation: we demonstrated that there was low probability for activation of this nuclear receptor by ZEN or its metabolites due to the characteristic of the ligand binding domain (Nolte et al., 1998).

In conclusion, we have demonstrated the differential effect of ZEN and its reduced metabolites on biochemical and morphological trophoblast differentiation. Estrogenic properties of these molecules seemed not to be involved: α ZEL and β ZEL did not induce syncytialization contrary to ZEN which promoted differentiation by hCG stimulation. Furthermore, α ZEL and β ZEL exposure were the cause of great variation of ABC transporter expression by interacting with nuclear receptors. Finally, mycotoxins could alter placental functions leading to 1) human pregnancy disorders by affecting the differentiation process and 2) alteration of fetal development by altering exchange of molecules between maternal and fetal circulations.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.taap.2012.01.016.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E., Bacha, H., 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol. in Vitro* 18, 467–474.
- Al-Nasiry, S., Spitz, B., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R., 2006. Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* 21, 193–201.
- Ayed-Boussema, I., Pascucci, J.M., Maurel, P., Bacha, H., Hassen, W., 2011. Zearalenone activates pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and aryl hydrocarbon receptor and corresponding phase I target genes mRNA in primary cultures of human hepatocytes. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 79–87.
- Cartwright, J.E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A.E., James, J.L., 2010. Remodelling at the maternal-foetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reprod. Res.* 140, 803–813.
- Chen, Y.X., Allars, M., Maiti, K., Angeli, G.L., Abou-Seif, C., Smith, R., 2011. Factors affecting cytotrophoblast cell viability and differentiation: evidence of a link between syncytialisation and apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 821–828.
- Chisaki, I., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Iseki, K., 2009. Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP. *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (11), 2396–2403.
- Cole, L.A., 2010. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 102–116.
- Cronier, L., Guibourdenche, J., Nigera, C., Malassiné, A., 1999. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 20, 669–676.
- Delidakis, M., Gu, M., Hein, A., Vatish, M., Grammatopoulos, D.K., 2010. Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblastic cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 332 (1–2), 213–220.
- Ding, X., Lichti, K., Staudinger, J.L., 2006. The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the pregnane X receptor. *Toxicol. Sci.* 91, 448–455.
- Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., Huppertz, B., 2009. Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta* 30, S49–S54.
- Guibourdenche, J., Fournier, T., Malassiné, A., Evain-Brion, D., 2009. Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochem. Cytobiol.* 47, S35–S42.
- Handschuh, K., Guibourdenche, J., Cocquebert, M., Tsatsaris, V., Vidaud, M., Evain-Brion, D., Fournier, T., 2009. Expression and regulation by PPAR γ of hCG α - and β -subunits: comparison between villous and invasive extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 30, 1016–1022.
- Handwerker, S., 2010. New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 94–104.
- IARC, 1999. Overall evaluations of carcinogenicity to humans. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs, vols. 1–73, pp. 1–36.
- Kast, R., Goodwin, B., Tarr, P.T., Jones, S.A., Anisfeld, A.M., Stoltz, C.M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T.M., Edwards, P.A., 2002. Regulation of multidrug resistance associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* 277 (4), 2908–2915.
- Kerker, G., Alsat, E., Taskén, K., Evain-Brion, D., 1998. Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation *in vitro*. *J. Cell Sci.* 111, 995–1004.
- Malekinejad, H., Maas-Bakker, R., Fink-Gremmels, J., 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet. J.* 172, 96–102.
- Massart, F., Meucci, V., Saggese, G., Soldani, G., 2008. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *J. Pediatr.* 152, 690–695.

- Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A., Visconti, A., 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicol. Lett.* 159, 272–283.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., Milburn, M.V., 1998. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature* 395 (6698), 137–143.
- Orendi, K., Gauster, M., Mose, G., Meiri, H., Huppertz, B., 2010. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* 140, 759–766.
- Ouanes-Ben Othmen, Z., El Golli, E., Abid-Essefi, S., Bacha, H., 2008. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, α Zearalenol and β Zearalenol, on cultured Vero cells. *Toxicology* 252, 72–77.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pötgens, A.J.G., Drewlo, S., Kokozidou, M., Kaufmann, P., 2004. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Hum. Reprod. Update* 10, 487–496.
- Prouillac, C., Lecoœur, S., 2010. The role of the placenta in foetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab. Dispos.* 38 (10), 1623–1635.
- Prouillac, C., Videmann, B., Mazallon, M., Lecoœur, S., 2009. Induction of cells differentiation and ABC transporters expression by a myco-estrogen, zearalenone, in human choriocarcinoma cell line (BeWo). *Toxicology* 263, 100–107.
- Shi, Q.J., Lei, Z.M., Rao, C.V., Lin, J., 1993. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132, 1387–1395.
- Szuetz, P., Mesterhazy, A., Falkay, G.Y., Bartyok, T., 1997. Early telearche symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foodstuffs. *Cereal Res. Commun.* 25, 429–436.
- Tarrade, T., Schoonjans, K., Guibourdenche, J., Bidart, J.M., Vidaud, M., Auwerx, J., Rochette-Egly, C., Evain-Brion, D., 2001. PPAR $\{\gamma\}$ /RXR $\{\alpha\}$ heterodimers are involved in human CG $\{\beta\}$ synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 142, 4504–4514.
- Tomaszewski, J., Miturski, R., Semczuk, A., Kotarski, J., Jakowicki, J., 1998. Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekol. Pol.* 69, 363–366.
- Vargas, A., Moreau, J., Landry, S., LeBellego, F., Toufaily, C., Rassart, E., Lafond, J., Barbeau, B., 2009. Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J. Mol. Biol.* 392, 301–318.
- Wang, H., Zhou, F., Gupta, A., Vethanayagam, R.R., Zhang, Y., Unadkat, J.D., Mao, Q., 2006. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17 β -estradiol in human placental BeWo cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E798–E807.
- Wang, H., Lee, E.W., Zhou, L., Leung, P.C.K., Ross, D.D., Unadkat, J.D., Mao, Q., 2008. Progesterone Receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo Cells. *Mol. Pharmacol.* 73, 845–854.
- Weedon-Fekjaer, M.S., Duttaroy, A.K., Nebb, H.I., 2005. Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line. *Placenta* 26, 721–728.
- Williams, S.P., Sigler, P.B., 1998. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393, 392–396.
- Yang, M., Lei, Z.M., Rao, C.V., 2003. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144, 1108–1120.
- Yoshie, M., Kaneyama, K., Kusama, K., Higuma, C., Nishi, H., Isaka, K., Tamura, K., 2010. Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells. *Hum. Reprod.* 25, 2229–2238.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C., Manes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1–18.

II.1.2.d. RESULTATS-DISCUSSION

L'exposition à la ZEN entraîne une modification morphologique des cellules BeWo qui forment un syncytium. Le même effet est obtenu avec E2 et la forskoline (inducteur non oestrogénique de la différenciation). A l'inverse, aucune modification n'est observée lorsque les cellules sont exposées à des concentrations équivalentes en α -ZEL ou β -ZEL. Par ailleurs, seule la ZEN entraîne une augmentation de la production de la β hCG. La ZEN est donc à l'origine d'une différenciation morphologique et biochimique des trophoblastes à l'inverse de ses deux métabolites actifs. Les effets de la ZEN et de ses métabolites réduits sur la production d'AMPc et les niveaux d'expression des ARNm de deux protéines impliquées dans la différenciation morphologique des cellules montrent que la différenciation cellulaire induite par ZEN n'implique pas la voie de l'AMPc contrairement à l' α -ZEL et le β -ZEL. Les effets de la ZEN seraient donc plutôt liés à l'augmentation de la production de la β hCG.

Concernant les effets de la ZEN et de ses métabolites sur l'expression des transporteurs ABC, des modifications significatives de l'expression d'ABCC1, ABCC2 et ABCG2 ont été observées à l'échelle transcriptionnelle et protéique; toutefois ces effets sont différents pour la ZEN et ses métabolites.

L'implication des RNs dans les processus de différenciation et de production de la β hCG (notamment PPAR γ), et dans la régulation des transporteurs ABC (notamment PGR et LXR) étant démontrée, nous avons modélisé l'interaction de la ZEN et ses métabolites avec ces récepteurs tous exprimés dans les cellules BeWo. Concernant PPAR γ , aucune des trois molécules ne semble pouvoir interagir avec le site de liaison du récepteur. Ce dernier ne serait pas impliqué dans les effets sur la différenciation cellulaire. Concernant PGR, les trois molécules sont susceptibles d'interagir avec des résidus du site de liaison de cette protéine. L'interaction PGR/ β -ZEL semble être la plus favorable. Ces interactions pourraient expliquer les effets sur les niveaux d'expression d'ABCG2.

Concernant LXR impliqué dans la régulation des ABCCs, seuls l' α -ZEL et le β -ZEL semblent pouvoir établir des interactions avec des résidus du site de liaison du récepteur: or α -ZEL et β -ZEL ont montré des effets significatifs dans la modulation de l'expression de ces protéines.

II.1.2.e. CONCLUSION

En conclusion, nous avons montré d'une part l'absence de métabolisation de la ZEN par les cellules placentaires BeWo. Ceci a permis une étude individuelle des effets de cette mycotoxine et de ses principaux métabolites actifs. Malgré des structures très proches, les effets de ces trois molécules sont très différents tant sur l'induction de la différenciation cellulaire que sur l'expression des transporteurs ABC. Les voies de régulation impliquées dans ces phénomènes sont multiples faisant intervenir des mécanismes d'autorégulation complexes.

Les résultats montrent clairement un effet de la ZEN sur la différenciation cellulaire sans répercussion majeure sur l'expression des transporteurs ABC. A l'inverse les métabolites de la ZEN semblent avoir des effets majeurs sur les niveaux d'expression des transporteurs ABC sans répercussion sur la différenciation. Ces effets semblent être indépendants des propriétés oestrogéniques mais potentiellement liés à des interactions différentes avec des RNs.

II.2. DANS LE CONTEXTE D'UNE EXPOSITION NEONATALE CHEZ LE MALE *IN VIVO* ET *IN VITRO*

II.2.1. CONTEXTE DE L'ETUDE

L'exposition aux PEs et en particulier aux xénoestrogènes comme la ZEN est à l'origine d'une augmentation de l'incidence des troubles du système reproducteur mâle comme l'hypofertilité. La pérennité d'une espèce dépend de l'intégrité des organes reproducteurs. Cette dernière est maintenue grâce à des systèmes de protection, qui dans le cas du testicule sont représentés par la barrière hémato-testiculaire (BHT). Les transporteurs de la superfamille ABC font partie intégrante de cette barrière et jouent un rôle primordial dans le cycle de la lignée germinale (transport de nucléotides), et dans la protection de ces cellules contre la toxicité de leurs substrats xénobiotiques (médicaments, produits chimiques, contaminants de l'environnement). Une modification de leur localisation ou de leur expression pourraient avoir des conséquences dramatiques sur l'intégrité du testicule et sur la fertilité. Il existe peu de données sur la localisation cellulaires de ces transporteurs dans le testicule et en particulier celle d'ABCC4/Abcc4 et ABCC5/Abcc5. De même l'effet d'une exposition néonatale à la ZEN sur ces transporteurs n'est pas connu. La période néonatale est une phase sensible aux effets des PEs. Elle est particulièrement critique dans le cas du testicule puisque la mise en place et l'assemblage de la BHT débute et s'achève durant cette période. C'est pourquoi, nous avons dans un premier temps tenté de localiser les transporteurs ABC majeurs dans le testicule du rat, et de déterminer si une exposition à la ZEN pouvait modifier cette localisation. Nous avons ensuite évalué les effets d'une exposition néonatale à trois doses de la ZEN sur l'expression de ces transporteurs dans le testicule du jeune adulte. Nous avons également exploré l'implication de l'activité oestrogénique de la ZEN dans cette modulation par comparaison à l'Estradiol benzoate (EB). Les cellules de Sertoli jouant un rôle crucial dans la protection des cellules germinales, nous avons également évalué l'effet de la ZEN et de l'EB sur l'expression de ces pompes d'efflux dans une lignée de Sertoli de rat immature avec ou sans inhibiteur des ESRs.

II.2.2. OBJECTIFS

Les objectifs de cette étude sont de (1) déterminer la localisation cellulaire des transporteurs: Abcb1, Abcg2, Abcc1, et Abcc4-5 dans le testicule adulte du rat, et l'effet d'une exposition à la ZEN sur cette localisation,(2) évaluer l'effet d'une exposition néonatale à trois doses de ZEN sur l'expression des messagers et des protéines de ces transporteurs dans le testicule du jeune adulte, (3) explorer l'implication de l'activité oestrogénique de la ZEN dans cette modulation par comparaison de son effet à celui d'un œstrogène pur: l'estradiol benzoate (EB), et enfin (4) déterminer l'effet *in vitro* de la ZEN et EB sur l'expression des transporteurs ABC dans une lignée de cellules de Sertoli de rat immature avec ou sans inhibiteur des récepteurs aux œstrogènes.

II.2.3. RESULTATS: PUBLICATION 4

Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporters expression in testis

Farah Koraïchi, Lilia Inoubli, Nadjem Lakhdari, Léo Meunier, Aurélie Vega, Claire Mauduit, Mohamed Benahmed, Caroline Prouillac, and Sylvaine Lecoeur, 2012

Toxicological Sciences



Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporter expression in testis

Journal:	<i>Toxicological Sciences</i>
Manuscript ID:	TOXSCI-12-0966
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	03-Dec-2012
Complete List of Authors:	Koraichi, Farah; National Institute for Agronomic Research, Animal Health Inoubli, Lilia; INSERM, Lakhdari, Nadjem; INSERM, Meunier, Leo; INSERM, Vega, Aurelie; INSERM, Mauduit, Claire; INSERM, Benahmed, Mohamed; INSERM, Prouillac, Caroline; Vetagro-sup, Lecoeur, Sylvaine; National Institute for Agronomic Research, Animal Health
Key Words:	Xenobiotic Transporters < Biotransformation and Toxicokinetics, endocrine disruptors < Endocrine Toxicology, reproductive tract; male < Reproductive & Developmental Toxicology, natural products < Agents, endocrine; estrogens < Endocrine Toxicology
Society of Toxicology Specialty Section Subject Area:	Reproductive and Developmental Toxicology [126]

Neonatal exposure to zearalenone induces long term modulation of ABC transporter expression in testis

Farah Koraïchi^{1,3}, Lilia Inoubli², Nadjem Lakhdari², Léo Meunier², Aurélie Vega², Claire Mauduit², Mohamed Benahmed², Caroline Prouillac³, and Sylvaine Lecoœur¹

¹ CarMeN, INRA 1235/INSERM 1060/UCBL1/INSA Lyon/HCL, Faculté de Médecine LYON SUD-BP 12, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69921 Oullins cedex, France

² U895 INSERM-Université de Nice-Sophia Antipolis, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, 151 route de Ginestière, 06204 Nice, France

³ RS2GP Rongeurs Sauvages, Risques Sanitaires et Gestion des Populations US/C 1233 INRA UPSP, F-69280, MARCY L'ETOILE

Corresponding author

Sylvaine Lecoœur

CarMeN, INRA 1235/INSERM 1060/UCBL1/INSA Lyon/HCL, Faculté de Médecine LYON SUD-BP 12, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69921 Oullins cedex, France

sylvaine.lecoeur@lyon.inra.fr

Fax 33 4 26 23 59 16

Abbreviation list:

ABC: ATP Binding Cassette

ABCB1/Abcb1a-b: ATP Binding Cassette, subfamily B, member 1A-B

ABCC1-5/Abcc1-5: ATP Binding Cassette, subfamily C, member 1-5

ABCG2/Abcg2: ATP Binding Cassette, subfamily G, member 2

Actb: Actin, beta

BTB: Blood Testis Barrier

E2: 17 β estradiol

EB: Estradiol Benzoate

ESRs/Esrs: Estrogen receptors

ESR1/Esr1: Estrogen receptor α

ESR2/Esr2: Estrogen receptor β

Gapdh: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

PND: Post Natal Day

ZEN: Zearalenone

Keywords:

ABC transporters

Estrogenic xenobiotics

Neonatal exposure

Rat

Sertoli

Testis

ABSTRACT

1
2
3
4
5 Mycotoxin zearalenone (ZEN) is a cereal contaminant produced by various species of
6 *Fusarium* fungi. When interacting with estrogen receptors, ZEN leads to animal fertility
7 disturbances and other reproductive pathologies. Few data are available on the effects of
8 perinatal exposure to ZEN, particularly in the blood-testis barrier. The aim of this study was
9 to assess the impact of ZEN in adult rats exposed neonatally. We focused on the expression
10 and cellular localization of major ABC transporters expressed in adult rat testis, comparing
11 ZEN effects with those of EB neonatal exposure. Dose-dependent and long term modulations
12 of mRNA and protein levels of Abcb1, Abcc1, Abcg2, Abcc4 and Abcc5 were observed,
13 along with Abcc4 protein cellular delocalization. ZEN exposure of SerW3 Sertoli cells
14 showed modulation of Abcb1, Abcc4 and Abcc5. Comparison with EB exposure showed
15 similar modulation profiles for Abcg2 but differential modulations for Abcb1, Abcc1, Abcc4
16 and Abcc5 *in vivo*, and a similar profile for Abcb1 modulation by ZEN and EB, but
17 differential modulation for Abcc4 and Abcc5 *in vitro*. ZEN and EB effects were inhibited by
18 *in vitro* addition of the pure anti-estrogen ICI 182.780, suggesting the at least partial
19 implication of ZEN estrogenic activity in these modulations. These results suggested that
20 ZEN neonatal exposure could affect the exposure of testis to ABC transporter substrates, and
21 negatively influence spermatogenesis and male fertility.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1. INTRODUCTION

Estrogen receptors (ESRs/Esrs) are widely distributed in testicular cells from fetal life through to adulthood, and physiological estrogens play an important role in spermatogenesis, steroidogenesis and in the regulation of the rodent and human male reproductive function (Carreau *et al.*, 2012). Exposure to endocrine disrupting chemicals and in particular to xenoestrogens, leads to an increasing incidence of male reproductive system disorders, i.e. gonadal dysgenesis, genital malformations, cryptorchidism, decreased fertility potential and testicular neoplastic changes (reviewed in Delbes *et al.*, 2006). Zearalenone (ZEN), a non steroidal estrogenic mycotoxin, is produced by various *Fusarium* fungi species and commonly contaminates cereal crops worldwide (Bennett and Klich, 2003). Animals and humans are exposed to ZEN via the consumption of cereals and by-products. ZEN is a full agonist of Estrogen receptor α (ESR1) and a partial agonist of Estrogen receptor β (ESR2). Several *in vivo* studies report its toxicological effect on the reproductive systems of farm and laboratory animals (Zinedine *et al.*, 2007). In the male reproductive system, ZEN is responsible for reduced numbers of germ and Sertoli cells (Jee *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003), the alteration of testis morphological parameters (Filipiak *et al.*, 2009; Perez-Martinez *et al.*, 1997), abnormal testicular differentiation (Perez-Martinez *et al.*, 1996) and disturbed fertility.

The blood-testis barrier (BTB) consists of Sertoli cells closely linked by specialized junctions. Sertoli cells and spermatogenic cells are in close contact, which is primordial for the survival, proliferation and differentiation of the germ cell line (Cheng and Mruk, 2012). The BTB protects developing germ cells against harmful toxicants (e.g., drugs, chemicals, environmental toxicants), but permits the entrance of vital nutrients (e.g., amino acids, nucleosides) (Lui *et al.*, 2003), allowing the outcome of a normal spermatogenesis cycle and maintaining fertility (reviewed in Cheng and Mruk, 2012). Several transporters are involved in the transport of molecules across the BTB (Bart *et al.*, 2004). Among them members of ATP binding cassette efflux transporters are part of the BTB and play an important role in protecting germ cells from harmful xenobiotic substrates (e.g., drugs, phytoestrogens, pollutants) and maintaining the barrier functional. ABCB1/Abcb1 is expressed in Sertoli and Leydig cells, macrophages, peritubular myoid cells and colocalizes with tight junctions (Melaine, 2002; Su *et al.*, 2009). ABCG2/Abcg2 is found in peritubular myoid and endothelial cells (Bart *et al.*, 2004) and in elongated spermatids (Scharenberg *et al.*, 2009), where it has secretory functions (Fetsch *et al.*, 2006). Much attention has been given to ABCC1/Abcc1, the ABCC transporter in Sertoli cells, where it is highly expressed (Cheng

1
2
3 and Mruk, 2012). It is also found in Leydig and peritubular myoid cells (Bartet *et al.*, 2004)
4 (Fig.1). The exact localization of ABCC4/Abcc4 and ABCC5/Abcc5 has not been elucidated,
5 but their role has been highlighted in the mitosis and meiosis of germ cells through the
6 transport of nucleotides essential for these development processes (Wijnholds *et al.*, 2000).
7
8 As mentioned above, the cellular localization of these transporters in the BTB has been
9 characterized by several studies, but data are still lacking. Thus the first objective of this work
10 was to determine the localization of these major ABC transporters in rat testicular slices by
11 immuno-histochemistry.
12
13

14
15
16 Several studies reported the estrogeno-regulation of ABC transporters (Cao *et al.*, 2002;
17 Evseenko *et al.*, 2007), and we have previously shown that ZEN was able to modulate their
18 expression in various tissues of pregnant rats and in fetus (Koraichi *et al.*, 2012). Given that
19 neonatal exposure may also be crucial for the development of adverse effects of endocrine
20 disruptors (Williams *et al.*, 2001), we aimed at evaluating the effects of neonatal exposure to
21 three doses of ZEN on the expression of major ABC transporters in adult rat testis. A
22 difference in localization could have crucial consequences on substrate transport and germ
23 cell development, so we also assessed the impact of ZEN on cellular localization. In addition,
24 we compared this impact to that of a pure estrogen, Estradiol Benzoate (EB) to explore the
25 implication of the estrogenic activity of ZEN. Moreover, since Sertoli cells play a crucial role
26 in protecting germ cells, we evaluated the effects of ZEN and EB on the expression of ABC
27 efflux pumps in an immature rat Sertoli cell line with and without an estrogen inhibitor. Our
28 results showed a significant modulation of the mRNA and protein levels of major ABC
29 transporters in adult rat testis, along with cellular delocalization of ABCC4.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals and reagents. ZEN was purchased from COGER (Morillons, France). DMSO, Epidermal Growth Factor, Estradiol Benzoate (EB), Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement and Testosterone came from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). The Sodium Pyruvate came from Gibco BRL (Cergy Pontoise, France). The Rneasy® Mini kit, RNA Cell Protect® Reagent and the QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR kit were provided by Qiagen (Courtaboeuf, France). The Quant-it™ RiboGreen® RNA Reagent and kit were obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

2.2. Animals. Pregnant Sprague Dawley rats at gestational day (GD)15 (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were individually housed in temperature-controlled rooms with 12-h light, 12-h dark cycles and given free access to water and feed. At birth, each pup was sexed, weighed, and identified. Male pups (≈ 20 g body weight) were administered vehicle (corn oil; MP Biomedicals, Illkirch, France) or ZEN or EB by daily sc injections from post-natal day (PND) 1 to PND5 at doses of 0, 1, 50 or 100 and 0, 0.75, 1.25 or 2.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ respectively. From PND6, the rats were left without treatment and killed at PND90 by CO₂ inhalation. One of the testes was snap frozen for quantitative molecular analyses, whereas the other was fixed for immunohistochemical studies. Eight different animals from four different litters were used for each treatment group. This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* - Animal Care Committee (protocol no. 2008-43).

2.3. Cell culture and treatments. The SerW3 Sertoli cell line (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Germany) from 17-day-old male Wistar rats, was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) containing 10% fetal calf serum (FCS, Gibco BRL) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin), at 35°C as described previously (Pognan *et al.*, 1997). To examine the effects of ZEN and EB, SerW3 Sertoli cells were cultured for 72 h in the presence of FCS. The cells were washed twice with serum free DMEM and incubated for 12 hours in serum free Dulbecco's medium (SFDM) composed of DMEM-antibiotics supplemented with Epidermal Growth Factor (10 ng/ml), insulin and transferrin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), selenium (10 ng/ml), and testosterone (100 nM). ZEN and EB were diluted in DMSO stock solution and added in fresh SFDM medium. The cells were then exposed to three

1
2
3 concentrations of either ZEN (0, 0.1, 5, and 10 nM) or EB (0, 0.05, 5, and 10 nM) for 48 hours.
4
5 The cells were immediately collected in RNA Cell Protect Reagent for mRNA quantification
6
7 experiments and lysed for protein expression analyses by western blotting.
8
9 For ZEN, the doses were 10^3 – 10^5 times lower than the EC₅₀ determined in preliminary
10
11 experiments while no cytotoxicity was reached for EB in the range of doses tested (0–100
12
13 μ M) (data not shown).

14
15 Pure anti-estrogen ICI 182.780 was used to determine the implication of ZEN estrogenic
16
17 activity in the modulation of ABC transporter mRNA expression. Cells were pre-exposed for
18
19 1h to ICI 182.780 (0.1 and 10 μ M), and then exposed to a mix of ZEN (10 nM) and ICI (0.1
20
21 and 10 μ M) or a mix of EB (0.2 nM) and ICI (0.1 and 10 μ M) according to the same protocol
22
23 described above. The highest doses of ZEN and EB (10 nM and 0.2 nM respectively) were
24
25 used in this test, because they corresponded to the doses where the mRNAs expressions of all
26
27 the ABC transporters were significantly modulated.

28
29 **2.4. Immunohistochemical localization of ABC transporters in PND90 rat testis.** Testes
30
31 were immediately fixed for 48 h in Bouin's fluid, dehydrated stepwise in graded ethanol baths
32
33 and embedded in paraffin. Testes fixed in Bouin's fluid were then cut into 5 μ m thick slices.
34
35 An unmasking treatment with citrate buffer was performed to localize the ABC transporters in
36
37 the adult rat testis; the sections were incubated for 10 min in PBS 0.1% Triton X-100 at room
38
39 temperature, then in PBS-5% FCS-1% protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO) for
40
41 30 min. The sections were incubated 1h at room temperature and subsequently overnight at
42
43 4°C with primary antibodies anti Abcb1 (sc 59593; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa
44
45 Cruz, CA), anti Abcg2 (sc 25822; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anti
46
47 Abcc1 (sc 13960; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), anti Abcc4
48
49 (SAB2500011; Sigma, St. Louis, MO) and anti Abcc5 (sc 5780; Santa Cruz Biotechnology,
50
51 Inc., Santa Cruz, CA) diluted at 1:50. The sections were then washed three times in PBS 0.1%
52
53 Triton X-100 and incubated for 1h at room temperature with fluorescein isothiocyanate
54
55 (FITC) or Texas Red-conjugated secondary antibody, goat anti-rabbit (Santa Cruz, CA)
56
57 diluted at 1/250, rabbit anti-mouse, or rabbit anti-goat (Dako, Glostrup, Denmark) diluted at
58
59 1:50. Afterwards, the sections were washed in 1× PBS and counterstained with mounting
60
61 medium containing 4',6'-diaminido-2-phenylindole (DAPI).

1
2
3 **2.5. Total RNA isolation, integrity and quantification.** Testis and SerW3 total cell RNA
4 were isolated and purified with the Rneasy® Mini Kit according to the supplier's instructions.
5 All extractions were performed with a DNA elimination step. RNA integrity was verified by
6 1% agarose gel electrophoresis. Total RNA was quantified with the Quant-it™ RiboGreen®
7 RNA Reagent and kit according to the manufacturer's protocol.
8
9

10
11
12
13 **2.6. Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR).** RT-qPCR was performed in an
14 Mx3000 cycler (Stratagene, Amsterdam, the Netherlands), using the SybrGreen dye
15 (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) and the Two Step® protocol of the QuantiTect
16 SYBR Green RT-PCR kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1µg of total
17 RNA was converted to cDNA by reverse transcription with the QuantiTect® Reverse
18 Transcription Kit. Diluted cDNAs were then amplified in a total volume of 20µl using the
19 QuantiTect SYBR® Green PCR Kit. mRNA levels of each test gene were normalized to two
20 reference genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), and Actin, beta
21 (*Actb*). PCR cycling conditions were optimized and PCR slopes and efficiencies were
22 calculated for each gene to allow efficiency-corrected quantitation (Pfaffl, 2001). Specific
23 primers for *Gapdh*, *Actb*, *Abcb1a* and *Abcg2* were provided by Qiagen (confidential
24 sequences). Published primer sequences were used for *Abcc1* (St-Pierre *et al.*, 2004). *Abcb1b*,
25 *Abcc4* and *Abcc5* forward and reverse primers were designed with Primer3 (v. 0.4.0)®
26 software (table 1). Sequences were chosen to span exon-exon boundaries in order to avoid
27 amplification from possible DNA contamination. Reactions were carried out in duplicate.
28 Primer sequences, concentrations and product sizes are indicated in table 1. The cycling
29 parameters were as follows: PCR activation for 10 min at 95°C; denaturing for 15 sec at
30 95°C; annealing for 60 sec at 60°C (55°C for *Gapdh*, *Actin β*, *Abcb1b* and *Abcg2*) for 40
31 cycles, and extending for 30 sec at 72°C.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Primer pair specificity was tested at the end of every run by melting curve analysis, and
amplification specificity was confirmed by electrophoresis in a 2% agarose gel. After
GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) staining, visualization under Ultra Violet light showed a
single band with the expected size for each gene.

53 **2.7. Western blot analysis.** Frozen testicular tissue was ground in liquid nitrogen to obtain
54 tissue powders. Aliquots of powder and SerW3 cells were lysed and homogenized in ice cold
55 SLB buffer (Tris 20 mM, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, MgCl₂ 1 mM, Glycerol 1mM, Nonidet
56 1%, pH 8), supplemented with protease inhibitor cocktail, complete Ultra Tablets, Mini,
57
58
59
60

1
2
3 EASY PACK (1 tablet/10 ml) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Extracts were
4 incubated for 30 min on ice, then centrifuged at 12000g for 30 min at 4°C. Supernatants were
5 removed and protein concentrations were determined by the colorimetric method using
6 bicinchoninic acid (Smith *et al.*, 1985). Lysates were diluted in lysis buffer, and then loading
7 buffer was added and heated at 70°C for 10 min. 15-20 µg of each sample was resolved on
8 8% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane in transfer buffer (Tris-Glycine 1X, pH
9 8.5 containing 20% methanol). The transfer was performed at a constant voltage of 100 V for
10 1 h for low molecular weight proteins and 2h for high molecular weight ones. Membranes
11 were blocked in TBS 0.05% Tween supplemented with 5% non fat milk on a rocker at room
12 temperature for 2h. Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4°C raised
13 against Abcb1 (Calbiochem C219, 517310/1: 100, Darmstadt, Germany), Abcc1 (Santa Cruz
14 sc-13960/1: 500, Santa Cruz, CA, USA), Abcc4 (Abcam, ab77184/1: 200, Cambridge, UK),
15 Abcc5 (Santa Cruz sc- sc-5781/1: 200, CA, USA), Abcg2 (Santa Cruz sc-25822/1: 1000)
16 and Actb (Sigma-Aldrich A5060/1: 10000, Lyon, France). Then, membranes were incubated
17 with secondary horse-radish peroxidase labelled antibodies: rabbit polyclonal anti mouse
18 (Abcam ab97046/ 1: 5000), goat anti rabbit (Santa Cruz sc-2004/ 1: 5000) and rabbit
19 polyclonal anti goat (Abcam ab6741/1:5000). The bands were detected using a
20 chemiluminescence Pierce® ECL Western Blotting Substrate kit (Thermo Scientific, Saint
21 Herblain, France) and visualized by the Molecular Imager® ChemiDac™ XRS+ imaging
22 system (Bio-RAD), and quantitation was carried out with Image Lab™ software (Bio-RAD,
23 Marnes-la-Coquette, France). Protein expression was normalized to Actb.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **2.8. Data analysis.** Comparisons of protein expression were performed with the Student's *t*
40 test. A *p* value of 0.05 was taken to be significant. The MxPro™ q PCR Software, version
41 4.10, was used to analyse the mRNA expression data. The relative expression ratios of the
42 target genes were calculated based on the efficiencies and quantification cycle (Cq) deviations
43 of unknown samples versus controls, and expressed in comparison to reference genes. These
44 calculations were performed with the relative gene expression software tool REST-MCS β
45 version 2 (Pfaffl *et al.*, 2002). Differences in mRNA expression between controls and exposed
46 samples were tested for statistical significance by the Pair Wise Fixed Reallocation
47 Randomisation Test (REST-MCS β version 2 Software) (Pfaffl *et al.*, 2002). A *p* value of
48 0.05 was taken to be significant.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3. RESULTS

3.1. Immunohistochemical localization of ABC transporters in PND 90 rat testis and the effect of a 100 µg/kg/day dose of ZEN on Abcc4 cellular localization (Fig. 2). Localization of ABC transporters was performed in adult rat testis by immunofluorescent microscopy assay. As shown in Fig.2A, *Abcb1* was localized in peritubular myoid cells, Sertoli and Leydig cells. *Abcg2* was mainly found in peritubular myoid cells as well as at the site of elongated spermatids (Fig.2B). *Abcc1* and *Abcc5* were widely expressed in rat testes. Our results revealed that both *Abcc1* and *Abcc5* were localized in Sertoli, Leydig and peritubular myoid cells. *Abcc5* was also observed in the endothelia of blood vessels (Fig.2C and D). No difference of localization was observed in the testis with or without exposure to ZEN for these ABC transporters. The highest dose of ZEN (100 µg/kg/day) caused delocalization of the *Abcc4* protein in the testis of adult rats treated neonatally with ZEN. Without ZEN exposure, *Abcc4* was essentially localized in peritubular myoid cells and also found in the site of spermatocytes and spermatids (Fig.2E). After ZEN treatment, *Abcc4* was exclusively localized in post meiotic cells: spermatocytes and round spermatids (Fig.2F).

3.2. Effects of ZEN and EB on the mRNA and protein expression of ABC transporters in PND 90 rat testis (Fig.3)

Abcb1 (Fig.3A). The three doses of ZEN strongly inhibited mRNA expression of both *Abcb1a* and *Abcb1b* (2.0, 4.2, 2.5 and 9, 10, 6.7-fold decrease, respectively) while only the highest dose of EB significantly down-modulated the mRNA of *Abcb1a* (1.8 fold decrease). Modulation of protein expression did not follow that of mRNA. The low and medium doses of ZEN induced *Abcb1* protein expression (1.6, 1.5-fold induction) while the highest dose significantly inhibited it (1.7-fold inhibition). Different effects were noted for EB: the medium and high doses strongly inhibited *Abcb1* protein expression (3.1 and 3.7-fold decrease, respectively). This effect was correlated to mRNA modulation only for the highest dose.

Abcc1 (Fig.3B). *Abcc1* mRNA and protein were inhibited 2, 2.1 and 1.6 and 1.8, 1.5 and 1.2 - fold by the three doses of ZEN, respectively, whereas only protein expression was inhibited by the medium and high dose of EB (2.6, 1.8-fold decrease, respectively).

Abcc4 (Fig.3C). ZEN and EB significantly induced mRNA expression of *Abcc4* (at the three doses for ZEN: 1.8, 1.9 1.7-fold increase, and at the two highest ones for EB: 1.4 and 1.5-fold increase). Contrary to mRNA expression, ZEN and EB down-modulated *Abcc4* protein

1
2
3 expression at all doses (1.8, 2.5, 1.2 and 1.2, 2.3, 2.3-fold decrease, respectively), although the
4 inhibition at the lowest EB dose was not statistically significant.

5
6 **Abcc5 (Fig.3D).** ZEN slightly induced *Abcc5* mRNA expression at 50 and 100 µg/day (1.6
7 and 1.7-fold increase, respectively), while EB strongly induced it at all doses (3.1, 3.1 and
8 3.2-fold inductions). For ZEN, the modulation of protein expression was contrary to that of
9 mRNA for the low and medium doses (1.6 and 1.3-fold decrease respectively) but no
10 significant effect was noted at the highest dose. Contrary, to ZEN, EB up-modulated *Abcc5*
11 protein expression 1.7-fold but only at the highest dose

12
13 **Abcg2 (Fig.2E).** Both ZEN and EB significantly down-modulated mRNA expression of
14 *Abcg2* at all doses (1.4, 2.0 and 1.8-fold inhibition for ZEN and 1.2, 1.6 and 1.3-fold decrease
15 for EB). The two substances also inhibited *Abcg2* protein expression at the three doses for
16 ZEN (1.4, 1.8 and 1.3-fold decrease), and the medium and high doses for EB (1.3 and 1.6-fold
17 decrease).

25 26 27 **3.3. Effects of ZEN and EB on the mRNA and protein expression of ABC transporters in** 28 **the SerW3 rat Sertoli cell line (Fig.4)**

29
30 **Abcb1 (Fig.4A).** ZEN and EB significantly induced mRNA expression of *Abcb1a* at medium
31 and high doses for ZEN (1.9 and 1.5-fold increase) and at the highest dose for EB (1.7-fold
32 increase). For *Abcb1b*, only EB slightly inhibited mRNA expression by 0.8-fold at the highest
33 dose. Both ZEN and EB down modulated the protein expression of *Abcb1* at all doses with
34 approximately the same magnitude (1.7, 1.7 and 2.0-fold decrease and 1.5, 1.8 and 2.0-fold
35 decrease, respectively).

36
37 **Abcc1 (Fig.4B).** Neither ZEN nor EB modulated mRNA or protein expressions of *Abcc1* at
38 any dose.

39
40 **Abcc4 (Fig.4C).** ZEN induced both mRNA (1.4, 1.3 and 1.6-fold increase) and protein
41 expressions (2.9, 2.1 and 1.8-fold induction) of *Abcc4* at the three doses, while EB only
42 induced mRNA at the highest dose (1.4-fold increase) but induced protein expression at the
43 two other doses (2.0 and 2.5-fold increase, respectively).

44
45 **Abcc5 (Fig.4D).** All doses of ZEN and the medium and high doses of EB significantly
46 induced the expression of *Abcc5* mRNA (2.0, 2.7 and 6-fold increase, and 1.8 and 2.6-fold
47 increase respectively). Concordance between ZEN and EB effects and between mRNA and
48 protein expression modulation only occurred for the doses of media (1.2 and 1.4-fold protein
49 inductions). ZEN also modulated the mRNA and protein expression of *Abcc5* in the same way
50 for the highest dose (1.5-fold protein induction) but inhibited its protein expression at the
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 lowest dose (1.6-fold decrease) rather than inducing it. A completely inverse effect was noted
4 for EB, where the lowest and highest doses induced the protein expression of Abcc5 1.6-fold
5 and inhibited it 1.4-fold, respectively.
6
7
8

9
10 **3.4. Effect of the pure anti-estrogen ICI 182.780 on the mRNA modulation of expression**
11 **of the highest doses of ZEN and EB in the SerW3 rat Sertoli cell line (Fig.5).** 10 nM ZEN
12 and 0.2 nM EB effects on mRNA expression of *Abc1a-b*, *Abcc4* and *Abcc5* reproduced those
13 observed in Fig.3 with the following magnitudes: *Abcb1a* +1.4, *Abcc4* +1.8 and *Abcc5* +4.0
14 fold change for ZEN and *Abcb1a* +1.6, *Abcb1b* -1.7, *Abcc4* +1.8 and *Abcc5* +1.5 fold change
15 for EB. Exposure of SerW3 cells to both doses of ICI 182.780 reversed both ZEN and EB
16 mRNA modulations of expression of all the ABC genes tested.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4. DISCUSSION

Numerous studies have evaluated the *in utero* exposure effects of xenoestrogens on the male reproductive tract (Thuillier *et al.*, 2003; Wilcox *et al.*, 1995; Yasuda *et al.*, 1985), while a growing number of publications demonstrate growing interest in the neonatal exposure effects of such molecules (Williams *et al.*, 2001). Indeed, the latter window of exposure is particularly critical since it is now well known that BTB assembly begins and ends at the neonatal stage (Toyama *et al.*, 2001). The BTB is one of the tightest blood-tissue barriers in the mammalian body and protects the germ cells to ensure the establishment of normal spermatogenesis. Environmental toxicants induce testicular injury via their initial actions at the BTB to elicit subsequent damage through germ cell loss, reduced sperm count, and male infertility or subfertility (Toyama *et al.*, 2001). ABC efflux pumps present at the BTB regulate the entry of such harmful molecules and thus actively participate in the protective role of the BTB.

We therefore aimed to assess the effect of three doses of the ZEN xeno-estrogen on ABC transporter expression in adult rat testis after neonatal exposure. As the *in vivo* effect of ZEN on ABC transporter expression was evaluated some time after exposure, and to confirm that ZEN was effectively responsible for the modulations observed in adulthood, we also evaluated its effect *in vitro*. Sertoli cells play a number of roles in testis, ranging from mechanical support of the seminiferous tubules to functional regulation of spermatogenesis. They are the main component of the BTB and play a key role in its protective function. ABC efflux transporter expression in these cells contributes to their protective role by extruding their harmful substrates out of the testis. We chose to evaluate ZEN effects in the SerW3 rat Sertoli cell line, which has approximately the same ABC transporter expression profile as Sertoli cells *in vivo* (Leslie *et al.*, 2005). The non transformed SerW3 cells mimic our *in vivo* model well and represent a good model for early neonatal exposure experiments. Indeed, they are derived from 17-day-old male Wistar rats, which is the earliest age allowing the isolation and successful culture of Sertoli cells (Pognan *et al.*, 1997).

Firstly, we localized these transporters in the testis of young adult rats. Our results showed similar patterns of localization to those described in previous works for Abcb1 (peritubular myoid cells, Sertoli and Leydig cells), Abcc1 (Sertoli, Leydig and peritubular myoid cells) and Abcg2 (peritubular myoid cells, elongated spermatids) (Bart *et al.*, 2004; Cheng and Mruk, 2012; Melaine, 2002; Scharenberg *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2009). To our knowledge, the localization of Abcc4 and Abcc5 in rat testis has not been described up to now. We found that

1
2
3 Abcc4 was localized in the peritubular myoid cells, spermatocytes and spermatids, while
4 Abcc5 had wider cellular distribution and was found in Sertoli, Leydig, peritubular myoid
5 cells, and in blood vessels. Surprisingly, after ZEN exposure, the Abcc4 protein localization
6 was found exclusively in the post meiotic cells (spermatocytes and round spermatids). Given
7 the role of Abcc4 in the transport of nucleotides, its delocalization could have a real impact on
8 the mitosis and meiosis processes of germ cells (Wijnholds *et al.*, 2000).

9
10
11
12
13 Secondly, we showed a dose-dependent and long term modulating effect of ZEN on the
14 mRNA and protein expression of ABC transporters in adult rat testis. Acute ZEN exposure *in*
15 *vitro* also resulted in the modulation of ABC transporter expression, confirming the
16 implication of ZEN in the *in vivo* effects.
17

18
19 Since Esr1 and Esr2 are expressed in rat testis and in SerW3 cells (with a similar profile, data
20 not shown) as described *in vivo* (Shughrue *et al.*, 1998), we compared ZEN effects to those of
21 the pure estrogen EB to evaluate the implication of estrogenic activity in transporter
22 modulation. ZEN and EB had a similar modulation profile for Abcg2 *in vivo* (no expression
23 of Abcg2 in SerW3 cells), but differentially modulated the expression of Abcb1, Abcc4 and
24 Abcc5, both *in vivo* and *in vitro*. For Abcg2, mRNA and protein modulations of expression
25 were correlated for both molecules, suggesting a transcriptional mechanism. This result is in
26 accordance with previous works that have shown the transcriptional regulation of the Abcg2
27 gene by estrogens. Indeed, the promoter region of the ABCG2 gene was shown to contain
28 functional estrogen response elements (Ee *et al.*, 2004). Several studies have highlighted the
29 estrogeno-regulation of the ABCG2 gene. Yasuda *et al.* (2006) demonstrated the induction of
30 both mRNA and protein expression of the ABCG2 gene in BeWo cells by E2, estrone and
31 estriol. Zhang *et al.* (2006) reported the induction of ABCG2 mRNA by E2 in ESR1 positive
32 MCF-7 cells. In addition, a recent study demonstrated that the selective estrogen modulator
33 toremifene down-regulates the expression of ABCG2 (mRNA and protein) in the ESR1
34 positive MCF-7 cell line (Zhang *et al.*, 2010).
35

36
37 ZEN and EB differentially modulated mRNA and protein expressions of Abcb1, Abcc4 and
38 Abcc5. This discordance might be related to the implication of epigenetic modifications.
39 Indeed, Meunier *et al.* (2012) showed that the neonatal administration of EB to male rats
40 modified the expression pattern of endogenous miRNA that in turn modified the expression of
41 DNA methyltransferase, with, as a final consequence, a modification in transcript levels of
42 DNA methylation target genes. In particular, the authors showed a modulation of miR-29a-b
43 and c, and TargetScanHuman V6.2 predicted that these miRNAs control Abcb1a-b expression
44 in the rat (Results in: <http://www.targetscan.org>). As EB, ZEN could modulate the profile of
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 miRNAs and be responsible for differences of mRNA and protein expression. Additionally,
4 differences between ABC expression modulations observed for Abcb1, Abcc1, Abcc4, Abcc5
5 respectively induced by ZEN and EB could be explained by the range of doses used in this
6 study. Competitive receptor-binding and yeast-based reporter gene assays showed that ZEN
7 had low estrogenic potency when compared to estrogens (Takemura *et al.*, 2007). In the
8 present work, doses chosen for ZEN exposure were based on these studies and were thus
9 higher than EB ones, but estrogens and endocrine disruptors can have U or inverted U shaped
10 dose-response curves and this could explain different biological effects, depending on the
11 exposure dose. This type of effect has been extensively described for endogenous hormones
12 and endocrine disruptors (for review, see Vandenberg *et al.*, 2012).

13 Except Abcc1, mRNA modulations were comparable between ZEN and EB, suggesting an
14 estrogenic effect. This was confirmed *in vitro* by the effect of fulvestrant (ER-mediated
15 transcription inhibitor, Robertson, 2001) which totally reversed these modulations, showing
16 the implication of ZEN estrogenic properties at transcriptional level.

17 The effect of ZEN and EB on Abcc1 expression was absent *in vitro*, suggesting that the effect
18 of ZEN on Abcc1 was probably not estrogenic. Indeed, data on the regulation of Abcc1 are
19 scarce and no study has yet demonstrated its regulation by estrogens (Elali and Hermann,
20 2012).

21 Consequences of such modulations of ABC transporters on long term susceptibility to
22 xenobiotic toxicity are difficult to estimate. For example, the induction of Abcb1 protein by
23 ZEN at 1µg/day could enhance its efflux of harmful xenobiotic substrates in Sertoli cells and
24 hence protect the germline, whereas its inhibition at a dose of 100 µg/day could overexpose
25 the germ cells to toxicants. The dose-dependant effect of ZEN complicates the evaluation of
26 human risk since food intake of ZEN varies according to the type of food ingested and the
27 level of *Fusarium* contamination.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

5. CONCLUSION

Our results showed for the first time that neonatal exposure to ZEN was responsible for dose-dependent and long term modulations of mRNA and protein levels of major ABC efflux transporters, and of a cellular delocalization of Abcc4 in the adult rat testis. Comparison with EB showed similar profiles of modulation for some transporters and differential modulations for others both *in vivo* and *in vitro*. The results of the pure anti-estrogen ICI 182.780 test in SerW3 cells suggested that the estrogenic activity of ZEN is at least partially involved in the modulation of Abcb1, Abcc4, and Abcc5. Further investigations are needed to elucidate the exact mechanism by which ZEN acts on ABC transporter regulation, and evaluate the consequences of Abcc4 protein delocalization in the testis. However, modifications of ABC transporter expression and localization at the BTB in a critical window of development and maturation could disturb physiological development processes such as spermatogenesis, and enhance the access of drugs, environmental molecules and other xenobiotic toxicants to the testis, thereby promoting the development of reproductive disorders, cancers and infertility.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by a grant from the ANR (ZENREPROTOX, Grant 415 178C).

We are grateful to Mr Keith Hodson for editing the English.

1
2
3 **Figure 1: Localisation of Abcb1, Abcg2 and Abcc1 in testis according to Melaine et al.**
4 **(2002) with modifications.**
5
6

7
8 **Figure 2: Immunohistochemical localization of ABC transporters in PND 90 rat testis**
9 **and the effect of the 100 µg/kg/day dose of ZEN on Abcc4 cellular localization.**
10 Localization of Abcb1 (A), Abcg2 (B), Abcc1 (C), Abcc5 (D) and Abcc4 (E) and the effect of
11 ZEN on Abcc4 localization (F) in adult rat testis was performed as described in the Materials
12 and Methods section with FITC antibodies or Texas Red-conjugated (green or red signal,
13 respectively). ABC transporters are expressed both in the interstitial compartment (Leydig
14 and peritubular myoid cells) and in seminiferous tubules (spermatocytes and round
15 spermatids). Scale bar = 50µm;
16
17
18
19
20
21

22 **Figure 3: ZEN and EB effect on mRNA and protein expression of ABC transporters in**
23 **PND 90 rat testis.** The mRNA expression of the target genes, determined by RT-qPCR, was
24 normalized to the level of *Actb* and *Gapdh* and expressed relative to controls. Controls were
25 set at 1 (dotted line). The protein expression of the target genes, determined by western
26 blotting, was normalized to the level of *Actb*. Significantly different from the control group *
27 $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$. Data are means \pm S.D. (n=8). Control □, 1 ■, 50 ■ and
28 100 µg/day ■ for ZEN and 0.75 □, 1.25 ■ and 2.5 µg/day for EB. A, Abcb1; B, Abcc1; C,
29 Abcc4; D, Abcc5; E, Abcg2. ZEN zearalenone, EB Estradiol Benzoate.
30
31
32
33
34
35
36

37 **Figure 4: The effect of ZEN and EB on mRNA and protein expression of ABC**
38 **transporters in the SerW3 Sertoli rat cell line.** The mRNA expression of the target genes,
39 determined by RT-qPCR, was normalized to the level of *Actb* and *Gapdh* and expressed
40 relative to controls. Controls were set at 1 (dotted line). The protein expression of the target
41 genes, determined by western blotting, was normalized to the level of *Actb*. Significantly
42 different from the control group * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$. Measurements were
43 carried out in triplicate wells. Data are means of \pm S.D. from 3 independent experiments.
44 Control □, 0.1 □, 5 ■ and 10 nM ■ for ZEN and 0.05 □, 0.1 ■ and 0.2 nM for EB. A,
45 Abcb1; B, Abcc1; C, Abcc4; D, Abcc5;. ZEN zearalenone, EB Estradiol Benzoate.
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **Figure 5: The effect of ICI 172186 on ZEN and EB mRNA modulation of ABC**
55 **transporters in the SerW3 Sertoli rat cell line.** The mRNA expression of the target genes,
56 determined by RT-qPCR, was normalized to the level of *Actb* and *Gapdh* and expressed
57
58
59
60

1
2
3 relative to the following controls: DMSO, ICI 0.1 μ M and ICI 10 μ M. Controls were set at 1
4 (dotted line). Significantly different from control group * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.
5
6 Measurements were carried out in triplicate wells. Data are means of \pm S.D from 3
7
8 independent experiments.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1, Sequences and concentrations of oligonucleotide primers and amplicon length

Gene (GenBank™ accession number)	Primer sequence (5'-3')	Primer concentrations (nM)	Amplicon length (bp)
<i>Gapdh</i> (NM017008)	NP (Rn_Gapd_1_SG QuantiTect Primer Assay*)	FP 500 RP 500	149
<i>Actb</i> (NM031144)	NP (Rn_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay*)	FP 500 RP 500	145
<i>Abcb1a</i> (NM133401)	NP (Rn_Abcb1_2_SG QuantiTect Primer Assay*)	FP 500 RP 500	112
<i>Abcb1b</i> (NM012623)	FP ATGAAACTGCCCCACAAATT RP CTTTCTGTGTCCAAGGCTGA	FP 500 RP 500	155
<i>Abcg2</i> (NM181381)	NP (Rn_Abcg2_1_SG QuantiTect Primer Assay*)	FP 500 RP 500	87
<i>Abcc1</i> (NM022281) ¹	FP CGAATGTCCTCTGAGATGGAGAC RP CTCTACACGGCCTGAATGGG	FP 400 RP 400	138
<i>Abcc4</i> (NM133411.1)	FP TGCACACAGCTTACGGCTAC RP GAGAGCCTTCCGGTAAATCA	FP 250 RP 250	146
<i>Abcc5</i> (NM053924.1)	FP CCGAGTTGAGGGTCTTTCC RP CTGGTGCTTGGTGGTGGT	FP 250 RP 250	133

NP, not provided by the manufacturer; * Qiagen product designation, FP, forward primer; RP, reverse primer. ¹

St-Pierre et al.,2004

REFERENCES

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Bart, J., Hollema, H., Groen, H. J., de Vries, E. G., Hendrikse, N. H., Sleijfer, D. T., Wegman, T. D., Vaalburg, W. and van der Graaf, W. T. (2004). The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer* **40**(14), 2064-70.

Bennett, J. W. and Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* **16**(3), 497-516.

Cao, J., Stieger, B., Meier, P. J. and Vore, M. (2002). Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(3), G757-66.

Carreau, S., Bouraima-Lelong, H. and Delalande, C. (2012). Role of estrogens in spermatogenesis. *Front Biosci* **4**, 1-11.

Cheng, C. Y. and Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev* **64**(1), 16-64.

Delbes, G., Levacher, C. and Habert, R. (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* **132**(4), 527-38.

Ee, P. L., Kamalakaran, S., Tonetti, D., He, X., Ross, D. D. and Beck, W. T. (2004). Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res* **64**(4), 1247-51.

Elali, A. and Hermann, D. M. (2012). Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells. *Brain Pathol* **22**(2), 175-87.

Evseenko, D. A., Paxton, J. W. and Keelan, J. A. (2007). Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab Dispos* **35**(4), 595-601.

Fetsch, P. A., Abati, A., Litman, T., Morisaki, K., Honjo, Y., Mittal, K. and Bates, S. E. (2006). Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* **235**(1), 84-92.

Filipiak, E., Walczak-Jedrzejowska, R., Oszukowska, E., Guminska, A., Marchlewska, K., Kula, K. and Slowikowska-Hilczer, J. (2009). Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. *Folia Histochem Cytobiol* **47**(5), S113-20.

Jee, Y., Noh, E. M., Cho, E. S. and Son, H. Y. (2010). Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by zearalenone in rat. *J Vet Sci* **11**(2), 115-9.

1
2
3 Kim, I. H., Son, H. Y., Cho, S. W., Ha, C. S. and Kang, B. H. (2003). Zearalenone induces
4 male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Lett* **138**(3), 185-92.

5
6 Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Benahmed, M., Prouillac, C. and Lecoeur, S.
7 (2012). Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear
8 receptors in pregnant rats and fetal liver. *Toxicol Lett* **211**(3), 246-56.

9
10
11 Leslie, E. M., Deeley, R. G. and Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-
12 glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*
13 **204**(3), 216-37.

14
15
16 Lui, W. Y., Mruk, D., Lee, W. M. and Cheng, C. Y. (2003). Sertoli cell tight junction
17 dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod* **68**(4), 1087-97.

18
19
20 Melaine, N. (2002). Multidrug Resistance Genes and P-Glycoprotein in the Testis of the Rat,
21 Mouse, Guinea Pig, and Human. *Biol Reprod* **67**(6), 1699-1707.

22
23
24 Meunier, L., Siddeek, B., Vega, A., Lakhdari, N., Inoubli, L., Bellon, R. P., Lemaire, G.,
25 Mauduit, C. and Benahmed, M. (2012). Perinatal programming of adult rat germ cell death
26 after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of
27 DNA methyltransferases and Mcl-1. *Endocrinology* **153**(4), 1936-47.

28
29
30 Perez-Martinez, C., Ferreras-Estrada, M. C., Garcia-Iglesias, M. J., Bravo-Moral, A. M.,
31 Espinosa-Alvarez, J. and Escudero-Diez, A. (1997). Effects of in utero exposure to
32 nonsteroidal estrogens on mouse testis. *Can J Vet Res* **61**(2), 94-8.

33
34
35 Perez-Martinez, C., Garcia-Iglesias, M. J., Ferreras-Estrada, M. C., Bravo-Moral, A. M.,
36 Espinosa-Alvarez, J. and Escudero-Diez, A. (1996). Effects of in-utero exposure to zeranol or
37 diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice. *J Comp Pathol*
38 **114**(4), 407-18.

39
40 Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-
41 PCR. *Nucleic Acids Res* **29**(9).

42
43
44 Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool
45 (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in
46 real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**(9).

47
48
49 Pognan, F., Masson, M. T., Lagelle, F. and Charuel, C. (1997). Establishment of a rat Sertoli
50 cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the
51 native cell. *Cell Biol Toxicol* **13**(6), 453-63.

52
53
54 Robertson, J. F. (2001). ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-
55 regulator--current clinical data. *Br J Cancer* **2**, 11-4.

1
2
3 Scharenberg, C., Mannowetz, N., Robey, R. W., Brendel, C., Repges, P., Sahrhage, T., Jahn,
4 T. and Wennemuth, G. (2009). ABCG2 is expressed in late spermatogenesis and is associated
5 with the acrosome. *Biochem Biophys Res Commun* **378**(2), 302-7.

6
7
8 Shughrue, P. J., Lane, M. V., Scrimo, P. J. and Merchenthaler, I. (1998). Comparative
9 distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat
10 pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* **63**(10), 498-504.

11
12 Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M.
13 D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). Measurement of
14 protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**(1), 76-85.

15
16
17 St-Pierre, M. V., Stallmach, T., Freimoser Grundschober, A., Dufour, J. F., Serrano, M. A.,
18 Marin, J. J., Sugiyama, Y. and Meier, P. J. (2004). Temporal expression profiles of organic
19 anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp*
20 *Physiol* **287**(6), R1505-16.

21
22
23 Su, L., Cheng, C. Y. and Mruk, D. D. (2009). Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an
24 integrated component of the mammalian blood-testis barrier. *Int J Biochem Cell Biol* **41**(12),
25 2578-87.

26
27
28 Takemura, H., Shim, J. Y., Sayama, K., Tsubura, A., Zhu, B. T. and Shimoi, K. (2007).
29 Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. *J*
30 *Steroid Biochem Mol Biol* **103**(2), 170-7.

31
32
33 Thuillier, R., Wang, Y. and Culty, M. (2003). Prenatal exposure to estrogenic compounds
34 alters the expression pattern of platelet-derived growth factor receptors alpha and beta in
35 neonatal rat testis: identification of gonocytes as targets of estrogen exposure. *Biol Reprod*
36 **68**(3), 867-80.

37
38
39 Toyama, Y., Ohkawa, M., Oku, R., Maekawa, M. and Yuasa, S. (2001). Neonatally
40 administered diethylstilbestrol retards the development of the blood-testis barrier in the rat. *J*
41 *Androl* **22**(3), 413-23.

42
43
44 Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H.,
45 Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T. and Myers, J. P.
46 (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic
47 dose responses. *Endocr Rev* **33**(3), 378-455.

48
49
50 Wijnholds, J., Mol, C. A., van Deemter, L., de Haas, M., Scheffer, G. L., Baas, F., Beijnen, J.
51 H., Scheper, R. J., Hatse, S., De Clercq, E., Balzarini, J. and Borst, P. (2000). Multidrug-
52 resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide
53 analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13), 7476-81.

54
55
56 Wilcox, A. J., Baird, D. D., Weinberg, C. R., Hornsby, P. P. and Herbst, A. L. (1995).
57 Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *N Engl J Med* **332**(21), 1411-6.

1
2
3 Williams, K., McKinnell, C., Saunders, P. T., Walker, M., Fisher, J. S., Turner, K. J.,
4 Atanassova, N. and Sharpe, M. (2001). Neonatal exposure to potent and environmental
5 oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for
6 importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum*
7 *Reprod Update* **7**(3), 236-47.

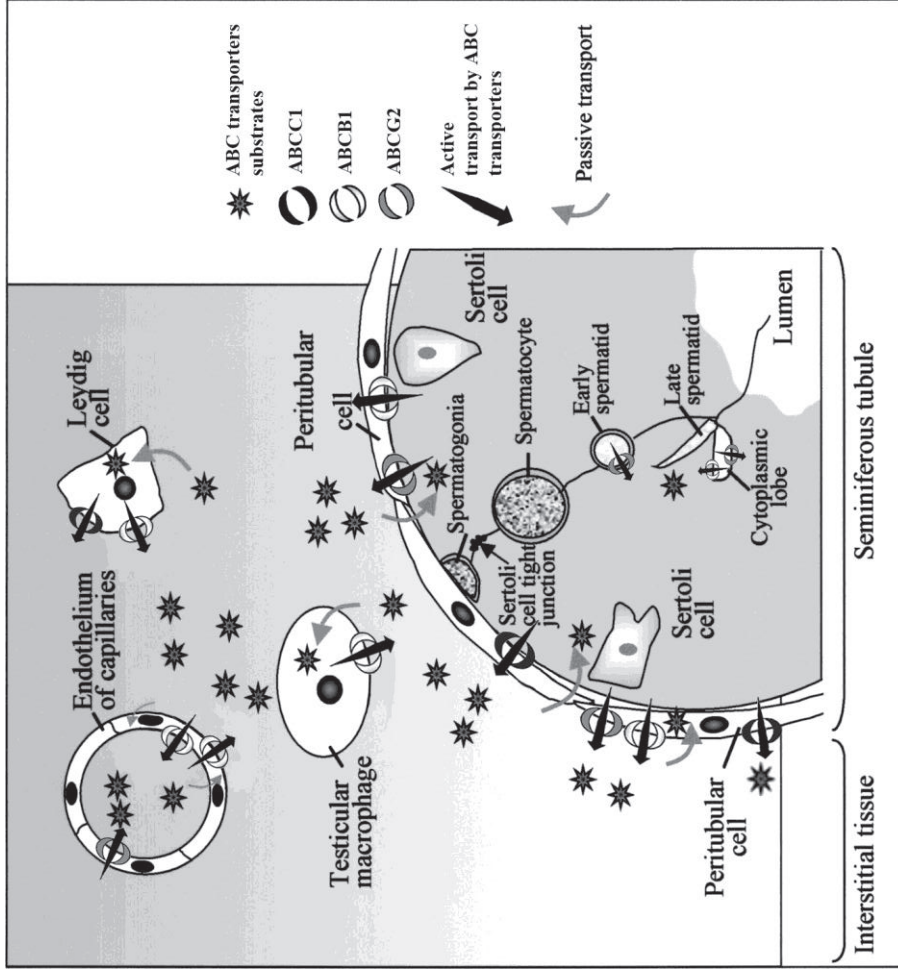
8
9
10 Yasuda, S., Itagaki, S., Hirano, T. and Iseki, K. (2006). Effects of sex hormones on regulation
11 of ABCG2 expression in the placental cell line BeWo. *J Pharm Pharm Sci* **9**(1), 133-9.

12
13 Yasuda, Y., Kihara, T., Tanimura, T. and Nishimura, H. (1985). Gonadal dysgenesis induced
14 by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. *Teratology* **32**(2), 219-27.

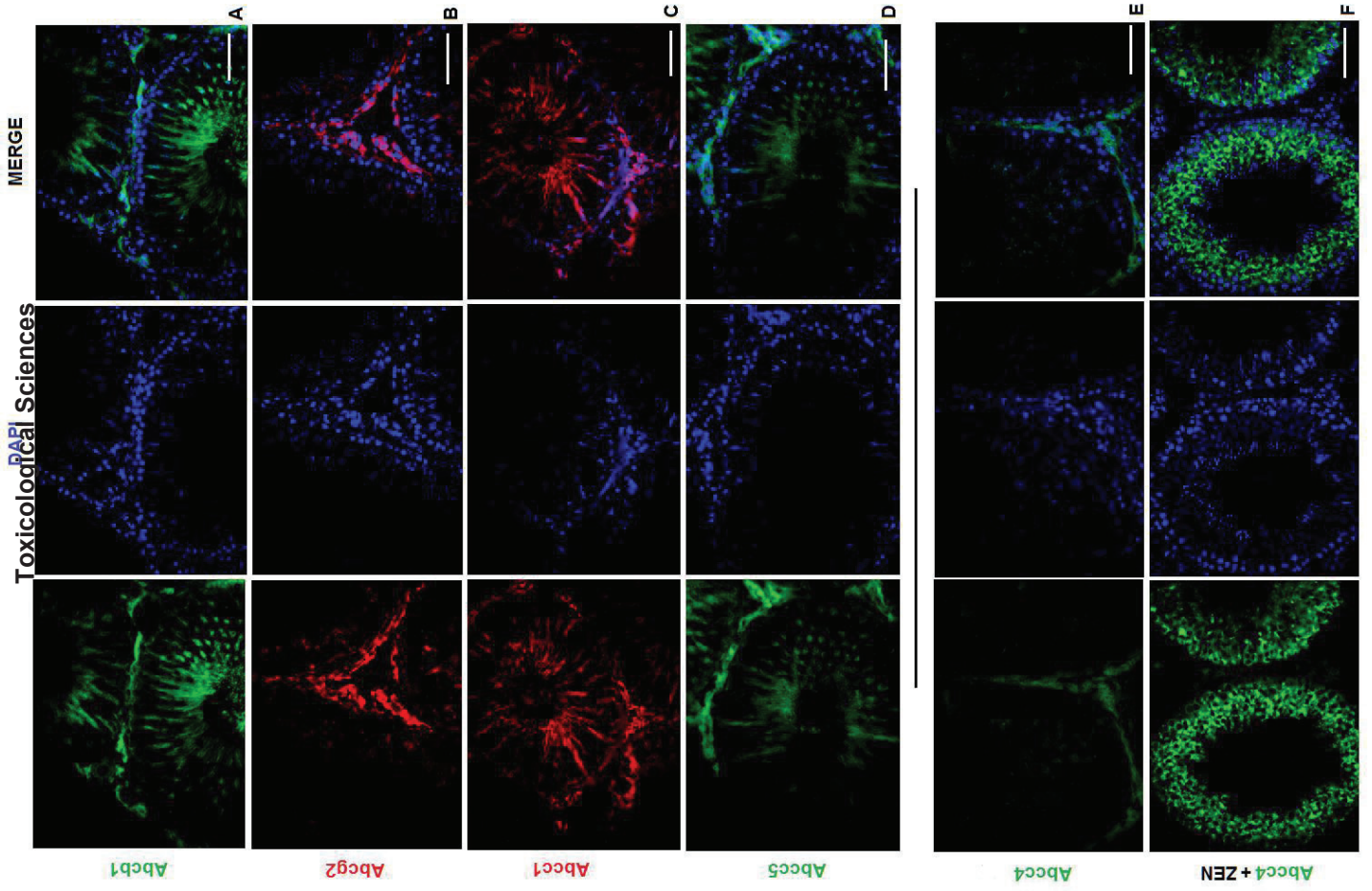
15
16
17 Zhang, Y., Wang, H., Wei, L., Li, G., Yu, J., Gao, Y., Gao, P., Zhang, X., Wei, F., Yin, D.
18 and Zhou, G. (2010). Transcriptional modulation of BCRP gene to reverse multidrug
19 resistance by toremifene in breast adenocarcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* **123**(3),
20 679-89.

21
22
23 Zhang, Y., Zhou, G., Wang, H., Zhang, X., Wei, F., Cai, Y. and Yin, D. (2006).
24 Transcriptional upregulation of breast cancer resistance protein by 17beta-estradiol in
25 ERalpha-positive MCF-7 breast cancer cells. *Oncology* **71**(5-6), 446-55.

26
27
28 Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C. and Manes, J. (2007). Review on the toxicity,
29 occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic
30 mycotoxin. *Food Chem Toxicol* **45**(1), 1-18.



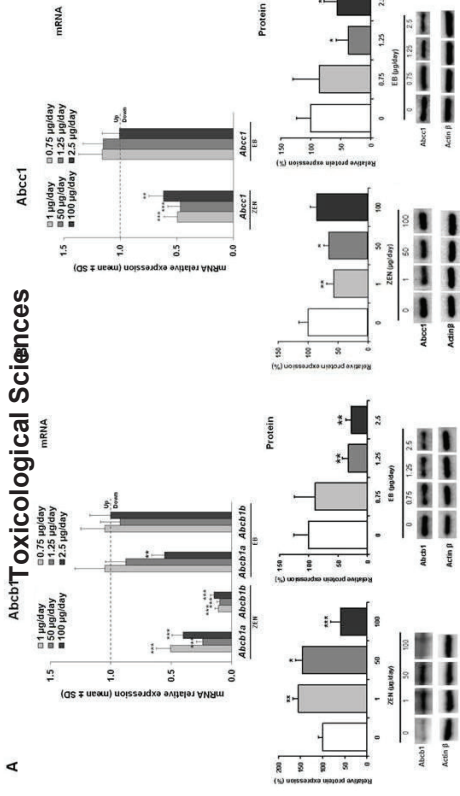
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43



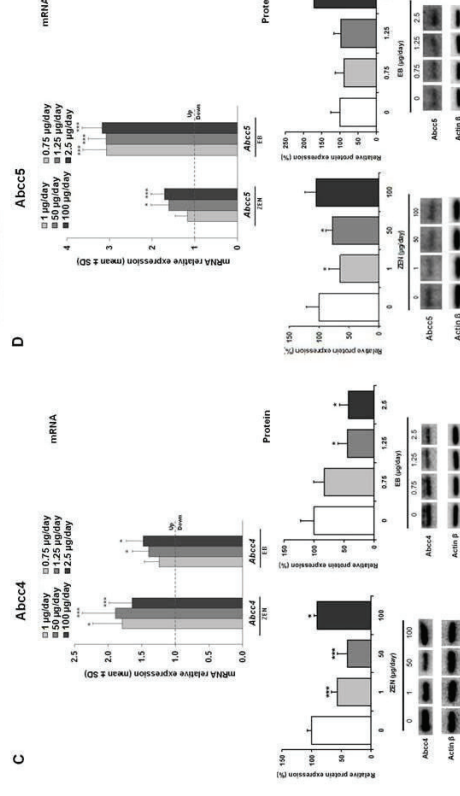
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

AbcbT Toxicological Sciences

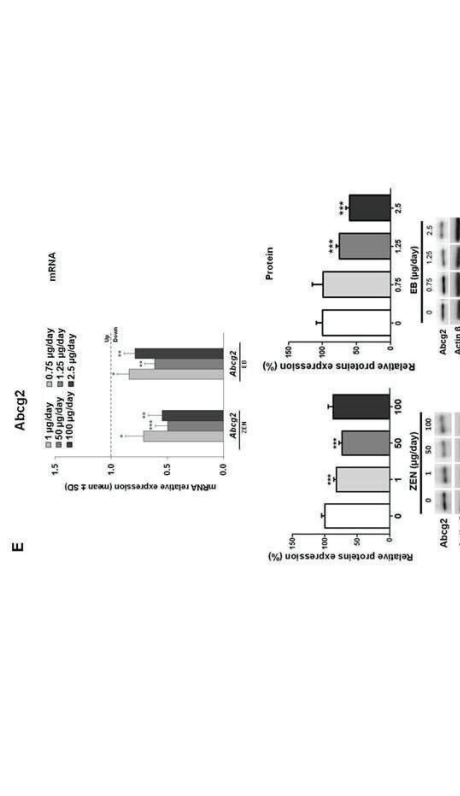
A



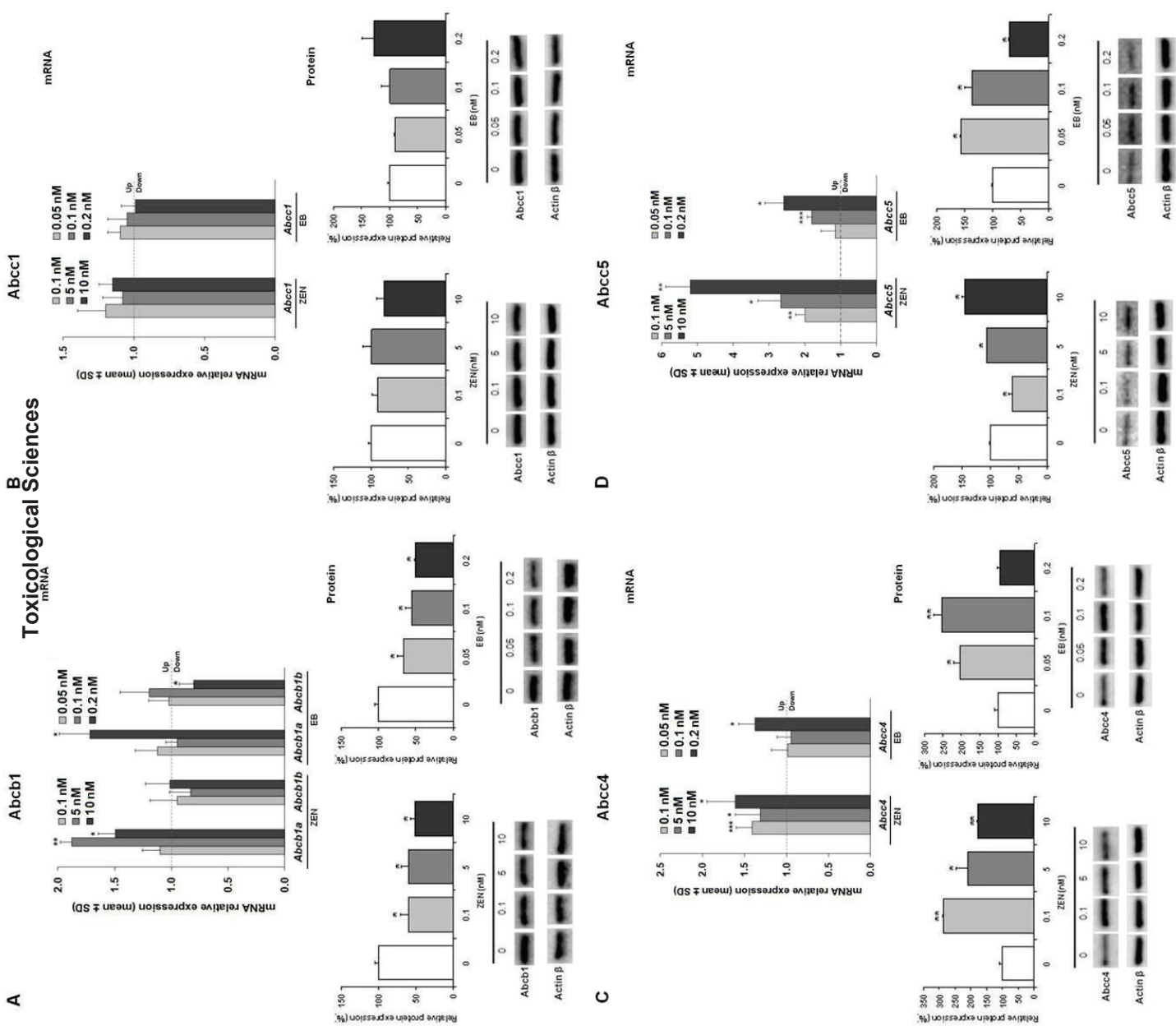
C



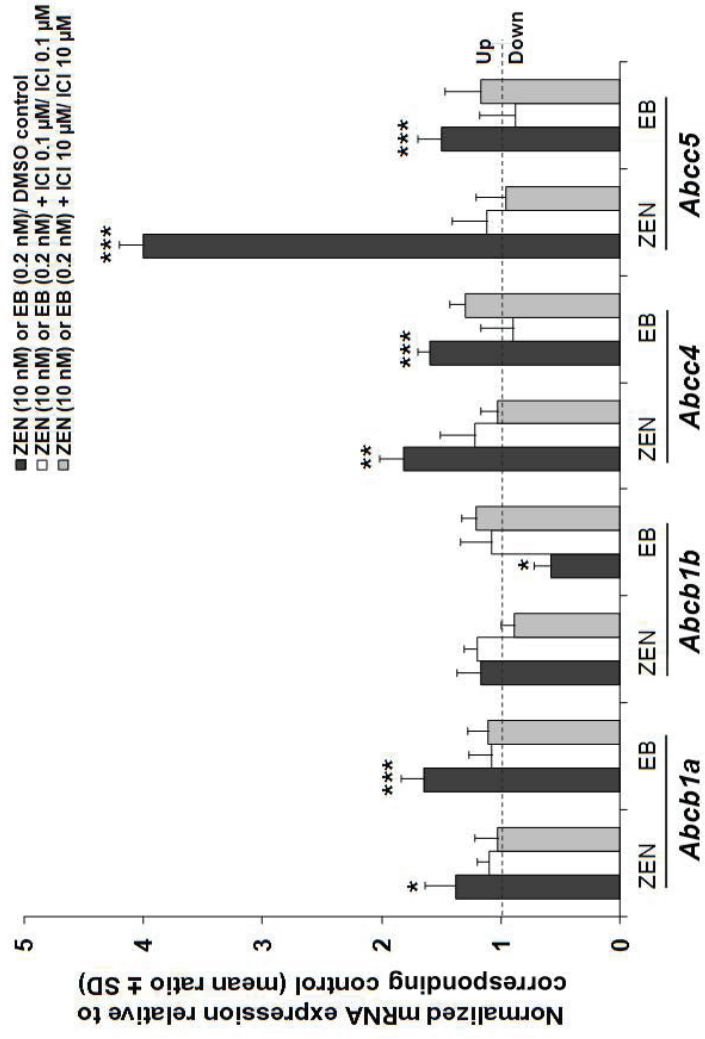
E



Toxicological Sciences



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

II.2.4. RESULTATS-DISCUSSION

Nos résultats montrent un effet dose-dépendant à long terme de la ZEN sur l'expression des transporteurs ABC dans le testicule du rat à l'âge adulte, après une exposition néonatale. *In vitro*, l'exposition aiguë des cellules de Sertoli (SerW3) à la ZEN est également responsable d'une modulation dose-dépendante de l'expression des transporteurs ABC, ce qui confirme l'implication de la ZEN dans les effets observés *in vivo*. L'effet dose-dépendant est largement décrit pour les hormones endogènes et les PEs.

Afin de déterminer l'implication de l'activité oestrogénique de la ZEN dans cette modulation, nous avons comparé les effets de la ZEN à ceux de l'EB (œstrogène pur). La ZEN et l'EB ont un profil de modulation similaire pour *Abcg2* (*in vivo* car aucune expression d'*Abcg2* dans les SerW3), mais différents pour *Abcb1*, *Abcc4* et *Abcc5* à la fois *in vivo* et *in vitro*. Pour *Abcg2*, les modulations d'expression des ARNm et des protéines sont corrélées pour les deux molécules suggérant un mécanisme d'action transcriptionnel. Ce résultat est en accord avec des travaux antérieurs montrant une régulation transcriptionnelle du gène *Abcg2* par les œstrogènes. Les différences entre les profils de modulation des autres transporteurs entre la ZEN et l'EB pourraient être liées aux gammes de doses utilisées dans cette étude. Les doses utilisées pour la ZEN sont plus élevées que celles de l'EB car la ZEN est considérée comme un œstrogène faible. Toutefois de récentes données montrent que les tests d'oestrogénicité classiques ne prédisent pas le réel potentiel oestrogénique des molécules en raison de l'existence de voies d'activation non classiques. Ainsi, il est possible que la ZEN ait eu le même profil de modulation de l'EB si les doses utilisées avaient été plus faibles. L'implication de l'activité oestrogénique de la ZEN n'est donc pas à exclure dans cette modulation, surtout compte tenu des résultats obtenus *in vitro* avec l'anti-œstrogène pur (ICI 182.780), montrant une réversion de toutes les modulations d'expression des ARNm induites par la ZEN et l'EB.

II.2.5. CONCLUSION

Nos résultats montrent pour la première fois qu'une exposition néonatale à la ZEN est responsable, chez le rat, d'une modulation dose dépendante et à long terme de l'expression des messagers et des protéines de transporteurs ABC majeurs dans le testicule adulte. La comparaison avec EB montre des profils de modulation similaires pour certains transporteurs et différents pour d'autres *in vivo* et *in vitro*. Les résultats obtenus avec l'anti-œstrogène pur sur les cellules SerW3 suggèrent, au moins en partie, l'implication de l'activité oestrogénique de la ZEN dans ces modulations. Une modification du niveau d'expression des transporteurs ABC dans la BHT durant une période critique de son développement pourrait rendre le testicule accessible aux divers médicaments, polluants environnementaux et autres substances toxiques, favorisant ainsi le développement de troubles de la reproduction, de cancers et d'infertilité.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse nous a permis dans un premier temps de mettre en évidence, chez le rat, des différences pharmacocinétiques de la ZEN en fonction du genre et du statut hormonal, et en particulier une exposition, via la mère, des fœtus et des nouveaux nés, périodes critiques du développement pouvant constituer des stades de plus grande vulnérabilité aux effets de la toxine. Nous avons ensuite démontré pour la première fois que la ZEN pouvait moduler l'expression de transporteurs ABC majeurs suite à des expositions durant ces phases critiques. Nous avons ainsi mis en évidence une modulation de l'expression de ces transporteurs au cours d'une exposition gestationnelle dans le foie fœtal et les organes maternels. Etant donné leur rôle dans la détoxification des xénobiotiques, une modulation de ces transporteurs pourrait influencer l'exposition du fœtus aux divers polluants environnementaux, avec les risques impliqués pour sa viabilité et son développement. La modulation de l'expression des transporteurs ABC dans le foie fœtal pose également la question d'une persistance de ces effets après la naissance et à l'âge adulte. Les résultats obtenus *in vitro* montrent également une modulation de ces transporteurs par la ZEN et ses métabolites réduits dans une lignée placentaire humaine. Les effets produits sont différents d'une molécule à l'autre, montrant l'importance de l'implication du métabolisme dans la nature des effets produits par la ZEN, confirmant ainsi les résultats de la première partie de ce travail. La ZEN est également capable de moduler à long terme l'expression des transporteurs ABC du testicule après une exposition néonatale. Ces effets sont dose-dépendants et semblent être en partie liés aux propriétés oestrogéniques de la ZEN comme en attestent les résultats de comparaison avec les effets d'un œstrogène pur: l'EB, et les résultats obtenus sur des cellules de Sertoli *in vitro* avec l'anti-œstrogène ICI 182.780. Les conséquences de tels effets seraient délétères pour la fertilité masculine, puisque les transporteurs ABC modulés ont un rôle central dans la barrière hémato-testiculaire en protégeant les cellules germinales de la toxicité de leur substrats. Si la fonction d'efflux de ces transporteurs était altérée, les divers médicaments et toxiques auraient plus facilement accès au testicule et pourraient ainsi favoriser le développement de cancers et de diverses maladies.

Au final, ce travail de thèse nous a permis d'établir que la ZEN était capable de moduler l'expression des transporteurs ABC *in vivo* et *in vitro*. Nous avons en particulier mis en évidence ses effets au cours de la gestation et de la période néonatale. Il serait également intéressant d'évaluer ses effets lors d'une exposition se produisant au cours d'autres fenêtres sensibles du développement comme celles de l'allaitement et la puberté. Une étude sur les effets de la ZEN sur plusieurs générations pourrait également apporter un éclaircissement sur d'éventuels effets multi et/ou transgénérationnels de cette mycoestrogène.

En effet, de tels effets ont déjà été rapportés pour d'autres PE à caractère oestrogénique comme le DES.

Nous avons également pu fournir des premiers éléments de réponse quant au mécanisme via lequel la ZEN modulerait l'expression des transporteurs ABC. Nos résultats suggérant l'implication d'Esr1 et d'Esr2, il serait intéressant d'explorer plus précisément cette voie, et de déterminer l'implication exacte de chaque récepteur par des techniques de siRNA. De plus, et au vu des différences observées dans les effets de la ZEN sur les divers transporteurs ABC de cette étude, il serait également pertinent d'évaluer l'implication des autres RNs activés par la ZEN: CAR, PXR et AhR, et qui sont aussi impliqués dans la régulation de ces transporteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABBES, S., OUANES, Z., BEN SALAH-ABBES, J., HOUAS, Z., OUESLATI, R., BACHA, H. & OTHMAN, O. 2006. The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological, biochemical and pathological changes induced by Zearalenone in mice. *Toxicon*, 47, 567-74.
- ABID-ESSEFI, S., BOUAZIZ, C., GOLLI-BENNOUR, E. E., OUANES, Z. & BACHA, H. 2009. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol on cultured human Caco-2 cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 23, 233-43.
- ABID-ESSEFI, S., OUANES, Z., HASSEN, W., BAUDRIMONT, I., CREPPY, E. & BACHA, H. 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol In Vitro*, 18, 467-74.
- ABOU NAZEL, M. W. & EL-SHANAWANY, S. 2007. Effect of the mycotoxin Zearalenone on the testis of mice and the protective role of vitamin E: histological and toxicological study. *Bulletin of the Alexandria Faculty of Medicine*, 43, 451-452.
- ADACHI, T., NAKAGAWA, H., CHUNG, I., HAGIYA, Y., HOSHIJIMA, K., NOGUCHI, N., KUO, M. T. & ISHIKAWA, T. 2007. Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCC1, ABCC2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress. *J Exp Ther Oncol*, 6, 335-48.
- AHAMED, S., FOSTER, J. S., BUKOVSKY, A. & WIMALASENA, J. 2001. Signal transduction through the Ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells. *Mol Carcinog*, 30, 88-98.
- AKITA, H., SUZUKI, H., ITO, K., KINOSHITA, S., SATO, N., TAKIKAWA, H. & SUGIYAMA, Y. 2001. Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta*, 1511, 7-16.
- ALCORN, J., LU, X., MOSCOW, J. A. & MCNAMARA, P. J. 2002. Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 487-96.
- ALEKSUNES, L. M. & KLAASSEN, C. D. 2012. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice. *Drug Metab Dispos*, 40, 1366-79.
- ALLIKMETS, R., GERRARD, B., HUTCHINSON, A. & DEAN, M. 1996. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet*, 5, 1649-55.

- ALM, H., GREISING, T., BRUSSOW, K. P., TORNER, H. & TIEMANN, U. 2002. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicol In Vitro*, 16, 643-8.
- ALONSO-MAGDALENA, P., ROPERO, A. B., SORIANO, S., GARCIA-AREVALO, M., RIPOLL, C., FUENTES, E., QUESADA, I. & NADAL, A. 2012. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol*, 355, 201-7.
- ANDRADE, A. J., GRANDE, S. W., TALSNESS, C. E., GROTE, K. & CHAHOUD, I. 2006. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology*, 227, 185-92.
- ANWAY, M. D., CUPP, A. S., UZUMCU, M. & SKINNER, M. K. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308, 1466-9.
- ANWAY, M. D. & SKINNER, M. K. 2006. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*, 147, 11.
- ANWAY, M. D. & SKINNER, M. K. 2008a. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reprod Biomed Online*, 16, 23-5.
- ANWAY, M. D. & SKINNER, M. K. 2008b. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease. *Prostate*, 68, 517-29.
- ARANDA, A. & PASCUAL, A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, 81, 1269-304.
- ARCECI, R. J., BAAS, F., RAPONI, R., HORWITZ, S. B., HOUSMAN, D. & CROOP, J. M. 1990. Multidrug resistance gene expression is controlled by steroid hormones in the secretory epithelium of the uterus. *Mol Reprod Dev*, 25, 101-9.
- ARIAS, A., VILLANUEVA, S. S., RUIZ, M. L., LUQUITA, M. G., VEGGI, L. M., PELLEGRINO, J. M., VORE, M., CATANIA, V. A. & MOTTINO, A. D. 2009. Regulation of expression and activity of rat intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by cholestatic estrogens. *Drug Metab Dispos*, 37, 1277-85.
- ATKINSON, H. A. & MILLER, K. 1984. Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation. *Toxicol Lett*, 23, 215-21.

- AVANTAGGIATO, G., HAVENAAR, R. & VISCONTI, A. 2003. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1283-1290.
- AXIOTIS, C. A., GUARCH, R., MERINO, M. J., LAPORTE, N. & NEUMANN, R. D. 1991a. P-glycoprotein expression is increased in human secretory and gestational endometrium. *Lab Invest*, 65, 577-81.
- AXIOTIS, C. A., MONTEAGUDO, C., MERINO, M. J., LAPORTE, N. & NEUMANN, R. D. 1991b. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 138, 799-806.
- AYED-BOUSSEMA, I., PASCUSI, J. M., MAUREL, P., BACHA, H. & HASSEN, W. 2011. Zearalenone activates pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and aryl hydrocarbon receptor and corresponding phase I target genes mRNA in primary cultures of human hepatocytes. *Environ Toxicol Pharmacol*, 31, 79-87.
- AYRTON, A. & MORGAN, P. 2001. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica*, 31, 469-97.
- BAKER, M. E., MEDLOCK, K. L. & SHEEHAN, D. M. 1998. Flavonoids inhibit estrogen binding to rat alpha-fetoprotein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, 317-21.
- BANDERA, E. V., CHANDRAN, U., BUCKLEY, B., LIN, Y., ISUKAPALLI, S., MARSHALL, I., KING, M. & ZARBL, H. 2011. Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New Jersey girls. *Sci Total Environ*, 409, 5221-7.
- BARBIER, G. 2011. Perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution. In: TECHNOLOGIQUES, O. P. D. É. D. C. S. E. (ed.). France: Assemblée Nationale.
- BARKER, D. J. 2003. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol*, 18, 733-6.
- BARS, R., FEGERT, I., GROSS, M., LEWIS, D., WELTJE, L., WEYERS, A., WHEELER, J. R. & GALAY-BURGOS, M. 2012. Risk assessment of endocrine active chemicals: Identifying chemicals of regulatory concern. *Regul Toxicol Pharmacol*, 64, 143-154.
- BART, J., HOLLEMA, H., GROEN, H. J., DE VRIES, E. G., HENDRIKSE, N. H., SLEIJFER, D. T., WEGMAN, T. D., VAALBURG, W. & VAN DER GRAAF, W. T. 2004. The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer*, 40, 2064-70.
- BAUER, J., HEINRITZI, K., GAREIS, M. & GEDEK, B. 1987. [Changes in the genital tract of female swine after feeding with practice-relevant amounts of zearalenone]. *Tierarztl Prax*, 15, 33-6.

- BEAUMONT, K., HARPER, A., SMITH, D. A. & BENNETT, J. 2000. The role of P-glycoprotein in determining the oral absorption and clearance of the NK2 antagonist, UK-224,671. *Eur J Pharm Sci*, 12, 41-50.
- BECCI, P. J., VOSS, K. A., HESS, F. G., GALLO, M. A., PARENT, R. A., STEVENS, K. R. & TAYLOR, J. M. 1982. Long-term carcinogenicity and toxicity study of zearalenone in the rat. *J Appl Toxicol*, 2, 247-54.
- BEHRAVAN, J. & PIQUETTE-MILLER, M. 2007. Drug transport across the placenta, role of the ABC drug efflux transporters. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3, 819-30.
- BELLI, P., BELLATON, C., DURAND, J., BALLEYDIER, S., MILHAU, N., MURE, M., MORNEX, J. F., BENAHMED, M. & LE JAN, C. 2010. Fetal and neonatal exposure to the mycotoxin zearalenone induces phenotypic alterations in adult rat mammary gland. *Food Chem Toxicol*, 48, 2818-26.
- BEN SALAH-ABBES, J., ABBES, S., ABDEL-WAHHAB, M. A. & OUESLATI, R. 2009. Raphanus sativus extract protects against Zearalenone induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice. *Toxicol*, 53, 525-33.
- BEN SALAH-ABBES, J., ABBES, S., HOUAS, Z., ABDEL-WAHHAB, M. A. & OUESLATI, R. 2008. Zearalenone induces immunotoxicity in mice: possible protective effects of radish extract (*Raphanus sativus*). *J Pharm Pharmacol*, 60, 761-70.
- BENZONI, E., MINERVINI, F., GIANNOCCARO, A., FORNELLI, F., VIGO, D. & VISCONTI, A. 2008. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reprod Toxicol*, 25, 461-7.
- BEREK, L., PETRI, I. B., MESTERHAZY, A., TEREN, J. & MOLNAR, J. 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicol In Vitro*, 15, 25-30.
- BERGERON, J. M., WILLINGHAM, E., OSBORN, C. T., 3RD, RHEN, T. & CREWS, D. 1999. Developmental synergism of steroidal estrogens in sex determination. *Environ Health Perspect*, 107, 93-7.
- BERNHOF, A., BEHRENS, G. H., INGEBRIGTSEN, K., LANGSETH, W., BERNDT, S., HAUGEN, T. B. & GROTMOL, T. 2001. Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. *Reprod Toxicol*, 15, 545-50.
- BIEHL, M. L., PRELUSKY, D. B., KORITZ, G. D., HARTIN, K. E., BUCK, W. B. & TRENHOLM, H. L. 1993. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 121, 152-9.
- BJORNSTROM, L. & SJOBERG, M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, 19, 833-42.

- BLAZQUEZ, A. G., BRIZ, O., ROMERO, M. R., ROSALES, R., MONTE, M. J., VAQUERO, J., MACIAS, R. I., CASSIO, D. & MARIN, J. J. 2012. Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol Pharmacol*, 81, 273-83.
- BOAS, M., FELDT-RASMUSSEN, U., SKAKKEBAEK, N. E. & MAIN, K. M. 2006. Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol*, 154, 599-611.
- BORST, P., DE WOLF, C. & VAN DE WETERING, K. 2007. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch*, 453, 661-73.
- BORST, P., EVERS, R., KOOL, M. & WIJNHOLDS, J. 1999. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta*, 6, 347-57.
- BORST, P., EVERS, R., KOOL, M. & WIJNHOLDS, J. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1295-302.
- BRAVIN, F., DUCA, R. C., BALAGUER, P. & DELAFORGE, M. 2009. In vitro cytochrome p450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite in vivo. *Int J Mol Sci*, 10, 1824-37.
- BRERA, C., CATANO, C., DE SANTIS, B., DEBEGNACH, F., DE GIACOMO, M., PANNUNZI, E. & MIRAGLIA, M. 2006. Effect of industrial processing on the distribution of aflatoxins and zearalenone in corn-milling fractions. *J Agric Food Chem*, 54, 5014-9.
- BRIAN, J. V., HARRIS, C. A., SCHOLZE, M., BACKHAUS, T., BOOY, P., LAMOREE, M., POJANA, G., JONKERS, N., RUNNALLS, T., BONFA, A., MARCOMINI, A. & SUMPTER, J. P. 2005. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect*, 113, 721-8.
- BROWN, H. E., SALAMANCA, S., STEWART, G. & UPHOUSE, L. 1991. Chlordecone (Kepone) on the night of proestrus inhibits female sexual behavior in CDF-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 110, 97-106.
- BURGER, J., FOSSI, C., MCCLELLAN-GREEN, P. & ORLANDO, E. F. 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environ Res*, 104, 135-52.
- BURK, O., ARNOLD, K. A., GEICK, A., TEGUDE, H. & EICHELBAUM, M. 2005. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem*, 386, 503-13.
- CAI, C., OMWANCHA, J., HSIEH, C. L. & SHEMSHEDINI, L. 2007. Androgen induces expression of the multidrug resistance protein gene MRP4 in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 10, 39-45.

- CAO, J., STIEGER, B., MEIER, P. J. & VORE, M. 2002. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283, G757-66.
- CAPEN, C. C. & MARTIN, S. L. 1989. Mechanisms that lead to disease of the endocrine system in animals. *Toxicol Pathol*, 17, 234-49.
- CASALS-CASAS, C. & DESVERGNE, B. 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol*, 73, 135-62.
- CAVALIERI, E. L. & ROGAN, E. G. 2010. Depurinating estrogen-DNA adducts in the etiology and prevention of breast and other human cancers. *Future Oncol*, 6, 75-91.
- CAVRET, S. & LECOEUR, S. 2006. Fusariotoxin transfer in animal. *Food Chem Toxicol*, 44, 444-53.
- CHELKOWSKI, J. 1998. *Fusarium* and mycotoxins. In: SINHA, K. S., BHATNAGAR, D. & DEKKER, M. (eds.) *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. New York.
- CHEN, C. & KLAASSEN, C. D. 2004. Rat multidrug resistance protein 4 (Mrp4, Abcc4): molecular cloning, organ distribution, postnatal renal expression, and chemical inducibility. *Biochem Biophys Res Commun*, 317, 46-53.
- CHEN, J., LU, G., LIN, J., DAVIDSON, A. L. & QUIOCHO, F. A. 2003. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*, 12, 651-61.
- CHEN, J. C., WILEY, A. A., KAUFFOLD, J., WAHNER, M., BARTOL, F. F. & BAGNELL, C. A. 2009. Perinatal zearalenone exposure affects RXFP1, RXFP2, and morphoregulatory gene expression in the neonatal porcine uterus. *Ann N Y Acad Sci*, 1160, 188-9.
- CHENG, S. Y., LEONARD, J. L. & DAVIS, P. J. 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*, 31, 139-70.
- CHOU DHURI, S. & KLAASSEN, C. D. 2006. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol*, 25, 231-59.
- CHOW, E. C., DURK, M. R., CUMMINS, C. L. & PANG, K. S. 2011. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ up-regulates P-glycoprotein via the vitamin D receptor and not farnesoid X receptor in both *fxr(-/-)* and *fxr(+/+)* mice and increased renal and brain efflux of digoxin in mice in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 337, 846-59.
- COLBORN, T. & CLEMENT, C. 1992. *Chemically-Induced alterations in sexual and functional development: The Wildlife human connection*, Princeton Scientific Publishing

- COLBORN, T., DUMANOSKI, D. & MEYERS, J. P. 1996. *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility*
- COLBORN, T., VOM SAAL, F. S. & SOTO, A. M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101, 378-84.
- COLE, S. P., BHARDWAJ, G., GERLACH, J. H., MACKIE, J. E., GRANT, C. E., ALMQUIST, K. C., STEWART, A. J., KURZ, E. U., DUNCAN, A. M. & DEELEY, R. G. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258, 1650-4.
- COLES, L. D., LEE, I. J., VOULALAS, P. J. & EDDINGTON, N. D. 2009. Estradiol and progesterone-mediated regulation of P-gp in P-gp overexpressing cells (NCI-ADR-RES) and placental cells (JAR). *Mol Pharm*, 6, 1816-25.
- COLLINS, T. F., SPRANDO, R. L., BLACK, T. N., OLEJNIK, N., EPPLEY, R. M., ALAM, H. Z., RORIE, J. & RUGGLES, D. I. 2006. Effects of zearalenone on in utero development in rats. *Food Chem Toxicol*, 44, 1455-65.
- COORAY, R. 1984. Effects of some mycotoxins on mitogen-induced blastogenesis and SCE frequency in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol*, 22, 529-34.
- CREPPY, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett*, 127, 19-28.
- CREWS, D. & MCLACHLAN, J. A. 2006. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology*, 147, S4-10.
- CREWS, D., PUTZ, O., THOMAS, P., HAYES, T. & HOWDESHELLK 2003. Animal models for the study of the effects of mixtures, low doses, and the embryonic environment on the action of endocrine disrupting chemicals. *Pure and Applied Chemistry, SCOPE/IUPAC Project Implications of Endocrine Active Substances for Humans and Wildlife*, 75, 2305-2320.
- CREWS, D., WILLINGHAM, E. & SKIPPER, J. K. 2000. Endocrine disruptors: present issues, future directions. *Q Rev Biol*, 75, 243-60.
- CUI, Y., KONIG, J., BUCHHOLZ, J. K., SPRING, H., LEIER, I. & KEPPLER, D. 1999. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol*, 55, 929-37.
- CUMMINGS, A. M., STOKER, T. & KAVLOCK, R. J. 2007. Gender-based differences in endocrine and reproductive toxicity. *Environ Res*, 104, 96-107.

- DALLAS, S., MILLER, D. S. & BENDAYAN, R. 2006. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, 58, 140-61.
- DANICKE, S., BRUSSOW, K. P., GOYARTS, T., VALENTA, H., UEBERSCHAR, K. H. & TIEMANN, U. 2007a. On the transfer of the Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation. *Food Chem Toxicol*, 45, 1565-74.
- DANICKE, S., GADEKEN, D., UEBERSCHAR, K. H., MEYER, U. & SCHOLZ, H. 2002a. Effects of Fusarium toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone. *Arch Tierernahr*, 56, 245-61.
- DANICKE, S., SWIECH, E., BURACZEWSKA, L. & UEBERSCHAR, K. H. 2005. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 89, 268-76.
- DANICKE, S., UEBERSCHAR, K. H., HALLE, I., MATTHES, S., VALENTA, H. & FLACHOWSKY, G. 2002b. Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or Fusarium toxin-contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone. *Poult Sci*, 81, 1671-80.
- DANICKE, S., VALENTA, H., UEBERSCHAR, K. H. & MATTHES, S. 2007b. On the interactions between Fusarium toxin-contaminated wheat and non-starch-polysaccharide hydrolysing enzymes in turkey diets on performance, health and carry-over of deoxynivalenol and zearalenone. *Br Poult Sci*, 48, 39-48.
- DAZERT, P., MEISSNER, K., VOGELGESANG, S., HEYDRICH, B., ECKEL, L., BOHM, M., WARZOK, R., KERB, R., BRINKMANN, U., SCHAEFFELER, E., SCHWAB, M., CASCORBI, I., JEDLITSCHKY, G. & KROEMER, H. K. 2003. Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am J Pathol*, 163, 1567-77.
- DE ANGELIS, I., FRIGGE, G., RAIMONDI, F., STAMMATI, A., ZUCCO, F. & CALONI, F. 2005. Absorption of fumonisin B1 and aminopentol on an in vitro model of intestinal epithelium; the role of P-glycoprotein. *Toxicon*, 45, 285-91.
- DEAN, M. 2009. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 14, 3-9.
- DENNIS, A. P., HAQ, R. U. & NAWAZ, Z. 2001. Importance of the regulation of nuclear receptor degradation. *Front Biosci*, 6, D954-9.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J. P., GIUDICE, L. C., HAUSER, R., PRINS, G. S., SOTO, A. M., ZOELLER, R. T. & GORE, A. C. 2009. Endocrine-

- disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*, 30, 293-342.
- DICKERSON, S. M. & GORE, A. C. 2007. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Rev Endocr Metab Disord*, 8, 143-59.
- DIEKMAN, M. A. & GREEN, M. L. 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J Anim Sci*, 70, 1615-27.
- DIEKMAN, M. A. & LONG, G. G. 1989. Blastocyst development on days 10 or 14 after consumption of zearalenone by sows on days 7 to 10 after breeding. *Am J Vet Res*, 50, 1224-7.
- DING, X., LICHTI, K. & STAUDINGER, J. L. 2006. The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the pregnane X receptor. *Toxicol Sci*, 91, 448-55.
- DOLL, S., DANICKE, S., UEBERSCHAR, K. H., VALENTA, H., SCHNURRBUSCH, U., GANTER, M., KLOBASA, F. & FLACHOWSKY, G. 2003. Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch Tierernahr*, 57, 311-34.
- DONNER, M. G. & KEPPLER, D. 2001. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology*, 34, 351-9.
- DOYLE, L. A., YANG, W., ABRUZZO, L. V., KROGMANN, T., GAO, Y., RISHI, A. K. & ROSS, D. D. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15665-70.
- DRESCHER, S., GLAESER, H., MURDTER, T., HITZL, M., EICHELBAUM, M. & FROMM, M. F. 2003. P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 73, 223-31.
- DUCA, R. C., MABONDZO, A., BRAVIN, F. & DELAFORGE, M. 2012. In vivo effects of zearalenone on the expression of proteins involved in the detoxification of rat xenobiotics. *Environ Toxicol*, 27, 98-108.
- EBERT, B., SEIDEL, A. & LAMPEN, A. 2005. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*, 26, 1754-63.
- EDWARDS, S., CANTLEY, T. C., ROTTINGHAUS, G. E., OSWEILER, G. D. & DAY, B. N. 1987. The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. *Theriogenology*, 28, 43-9.

- EE, P. L., KAMALAKARAN, S., TONETTI, D., HE, X., ROSS, D. D. & BECK, W. T. 2004. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res*, 64, 1247-51.
- EFSA, P. O. C. I. T. F. C. 2011. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. EFSA Journal 2011.
- ELALI, A. & HERMANN, D. M. 2012. Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells. *Brain Pathol*, 22, 175-87.
- ENDERS, A. C. & BLANKENSHIP, T. N. 1999. Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 38, 3-15.
- ETIENNE, M. & JEMMALI, M. 1982. Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. *J Anim Sci*, 55, 1-10.
- EVERS, R., DE HAAS, M., SPARIDANS, R., BEIJNEN, J., WIELINGA, P. R., LANKELMA, J. & BORST, P. 2000. Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer*, 83, 375-83.
- EVERS, R., KOOL, M., VAN DEEMTER, L., JANSSEN, H., CALAFAT, J., OOMEN, L. C., PAULUSMA, C. C., OUDE ELFERINK, R. P., BAAS, F., SCHINKEL, A. H. & BORST, P. 1998. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest*, 101, 1310-9.
- EVSEENKO, D. A., PAXTON, J. W. & KEELAN, J. A. 2007. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab Dispos*, 35, 595-601.
- FERRER, E., JUAN-GARCIA, A., FONT, G. & RUIZ, M. J. 2009. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro*, 23, 1504-9.
- FILANNINO, A., STOUT, T. A., GADELLA, B. M., SOSTARIC, E., PIZZI, F., COLENBRANDER, B., DELL'AQUILA, M. E. & MINERVINI, F. 2011. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reprod Biol Endocrinol*, 9, 134.
- FINK-GREMMELS, J. & MALEKINEJAD, H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 326-341.

- FISHER, J. S. 2004. Are all EDC effects mediated via steroid hormone receptors? *Toxicology*, 205, 33-41.
- FORSELL, J. H. & PESTKA, J. J. 1985. Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis. *Appl Environ Microbiol*, 50, 1304-7.
- FORSELL, J. H., WITT, M. F., TAI, J. H., JENSEN, R. & PESTKA, J. J. 1986. Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem Toxicol*, 24, 213-9.
- FROMM, M. F. 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 423-9.
- FU, M., WANG, C., ZHANG, X. & PESTELL, R. G. 2004. Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 68, 1199-208.
- FUJITA-HAMABE, W., NISHIDA, M., NAWA, A., KOBORI, T., NAKAMOTO, K., KISHIOKA, S. & TOKUYAMA, S. 2012. Etoposide modulates the effects of oral morphine analgesia by targeting the intestinal P-glycoprotein. *J Pharm Pharmacol*, 64, 496-504.
- GADZALA-KOPCIUCH, R., CENDROWSKI, K., CESARZ, A., KIELBASA, P. & BUSZEWSKI, B. 2011. Determination of zearalenone and its metabolites in endometrial cancer by coupled separation techniques. *Anal Bioanal Chem*, 401, 2069-78.
- GAIDO, K. W., MANESS, S. C., MCDONNELL, D. P., DEHAL, S. S., KUPFER, D. & SAFE, S. 2000. Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor alpha and beta, and androgen receptor: structure-activity studies. *Mol Pharmacol*, 58, 852-8.
- GAJECKA, M., RYBARCZYK, L., ZWIERZCHOWSKI, W., JAKIMIUK, E., ZIELONKA, L., OBREMSKI, K. & GAJECKI, M. 2011. The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts. *Theriogenology*, 75, 1085-94.
- GAJECKI, M., PRZYBYLOWICZ, M., ZIELONKA, L., ZWIERZCHOWSKI, W., OBREMSKI, K., SKORSKA-WYSZYNSKA, E., GAJECKA, M., POLAK, M. & JAKIMIUK, E. 2004. Preliminary results of monitoring research on zearalenone presence in blood of women with neoplastic lesions in reproductive system. *Pol J Vet Sci*, 7, 153-6.
- GALLOWAY, S. M., ARMSTRONG, M. J., REUBEN, C., COLMAN, S., BROWN, B., CANNON, C., BLOOM, A. D., NAKAMURA, F., AHMED, M., DUK, S. & ET AL. 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ Mol Mutagen*, 10 Suppl 10, 1-175.

- GAUMY, J. L., BAILLY, J. D., BURGAT, V. & GUERRE, P. 2001. Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 3, 219-234.
- GAZZAH, A., EL GOLLI BENNOUR, E., BOUAZIZ, C., ABID, S., LADJIMI, M. & BACHA, H. 2010. Sequential events of apoptosis induced by zearalenone in cultured hepatocarcinoma cells. *Mycotoxin Res*, 26, 187-197.
- GEICK, A., EICHELBAUM, M. & BURK, O. 2001. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem*, 276, 14581-7.
- GELLERT, R. J. 1978. Kepone, mirex, dieldrin, and aldrin: estrogenic activity and the induction of persistent vaginal estrus and anovulation in rats following neonatal treatment. *Environ Res*, 16, 131-8.
- GEORGE, A. M. & JONES, P. M. 2012. Perspectives on the structure-function of ABC transporters: The Switch and Constant Contact Models. *Prog Biophys Mol Biol*, 109, 95-107.
- GHANEM, C. I., RUIZ, M. L., VILLANUEVA, S. S., LUQUITA, M. G., CATANIA, V. A., JONES, B., BENGOCHEA, L. A., VORE, M. & MOTTINO, A. D. 2005. Shift from biliary to urinary elimination of acetaminophen-glucuronide in acetaminophen-pretreated rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 315, 987-95.
- GIBSON, C. J., HOSSAIN, M., RICHARDSON, J. R. & ALEKSUNES, L. M. 2012. Inflammatory Regulation of ABC Efflux Transporter Expression and Function in Microglia. *J Pharmacol Exp Ther*, 31, 31.
- GOCHFELD, M. 2007. Framework for gender differences in human and animal toxicology. *Environ Res*, 104, 4-21.
- GOLINSKI, P., WASKIEWICZ, A. & GROMADSKA, K. 2010. Zearalenone and its derivatives: known toxins in new aspects. In: RAI, M. & VARMA, A. (eds.) *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- GORE, A. C. 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 29, 358-74.
- GORE, A. C. & CREWS, D. 2009. Environmental Endocrine Disruption of Brain and Behavior. In: PFAFF, D. W., ARNOLD, A. P., ETGEN, A. M., FAHRBACH, S. E. & RUBIN, R. T. (eds.) *Hormones, Brain and Behavior*, 2nd edition. San Diego: Academic Press.
- GORE, A. C., HEINDEL, J. J. & ZOELLER, R. T. 2006. Endocrine disruption for endocrinologists (and others). *Endocrinology*, 147, S1-3.
- GORE, A. C., WALKER, D. M., ZAMA, A. M., ARMENTI, A. E. & UZUMCU, M. 2011. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular

- reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. *Mol Endocrinol*, 25, 2157-68.
- GOYARTS, T., DANICKE, S., BRUSSOW, K. P., VALENTA, H., UEBERSCHAR, K. H. & TIEMANN, U. 2007a. On the transfer of the Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from sows to their fetuses during days 35-70 of gestation. *Toxicol Lett*, 171, 38-49.
- GOYARTS, T., DANICKE, S., VALENTA, H. & UEBERSCHAR, K. H. 2007b. Carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs. *Food Addit Contam*, 24, 369-80.
- GRAY, L. E., JR. 1982. Neonatal chlordecone exposure alters behavioral sex differentiation in female hamsters. *Neurotoxicology*, 3, 67-79.
- GRAY, L. E., JR., FERRELL, J. M. & OSTBY, J. S. 1985. Alteration of behavioral sex differentiation by exposure to estrogenic compounds during a critical neonatal period: effects of zearalenone, methoxychlor, and estradiol in hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol*, 80, 127-36.
- GRAY, L. E., JR., OSTBY, J. S., FERRELL, J. M., SIGMON, E. R. & GOLDMAN, J. M. 1988. Methoxychlor induces estrogen-like alterations of behavior and the reproductive tract in the female rat and hamster: effects on sex behavior, running wheel activity, and uterine morphology. *Toxicol Appl Pharmacol*, 96, 525-40.
- GREEN, M. L., DIEKMAN, M. A., MALAYER, J. R., SCHEIDT, A. B. & LONG, G. G. 1990. Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. *J Anim Sci*, 68, 171-8.
- GRONEMEYER, H., GUSTAFSSON, J. A. & LAUDET, V. 2004. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 950-64.
- GROSSE, Y., CHEKIR-GHEDIRA, L., HUC, A., OBRECHT-PFLUMIO, S., DIRHEIMER, G., BACHA, H. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. 1997. Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Lett*, 114, 225-9.
- GUTMANN, D. A., WARD, A., URBATSCH, I. L., CHANG, G. & VAN VEEN, H. W. 2010. Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1. *Trends Biochem Sci*, 35, 36-42.
- HAGIYA, Y., ADACHI, T., OGURA, S., AN, R., TAMURA, A., NAKAGAWA, H., OKURA, I., MOCHIZUKI, T. & ISHIKAWA, T. 2008. Nrf2-dependent induction of human ABC transporter ABCG2 and heme oxygenase-1 in HepG2 cells by photoactivation of porphyrins: biochemical implications for cancer cell response to photodynamic therapy. *J Exp Ther Oncol*, 7, 153-67.

- HAGLER, W. M., DANKO, G., HORVATH, L., PALYUSIK, M. & MIROCHA, C. J. 1980. Transmission of zearalenone and its metabolite into ruminant milk. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 28, 209-16.
- HAIMEUR, A., CONSEIL, G., DEELEY, R. G. & COLE, S. P. 2004. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab*, 5, 21-53.
- HALL, J. M., COUSE, J. F. & KORACH, K. S. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*, 276, 36869-72.
- HARRIS, R. M., WARING, R. H., KIRK, C. J. & HUGHES, P. J. 2000. Sulfation of "estrogenic" alkylphenols and 17beta-estradiol by human platelet phenol sulfotransferases. *J Biol Chem*, 275, 159-66.
- HARTMANN, G., VASSILEVA, V. & PIQUETTE-MILLER, M. 2005. Impact of endotoxin-induced changes in P-glycoprotein expression on disposition of doxorubicin in mice. *Drug Metab Dispos*, 33, 820-8.
- HARTZ, A. M., MAHRINGER, A., MILLER, D. S. & BAUER, B. 2010. 17-beta-Estradiol: a powerful modulator of blood-brain barrier BCRP activity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30, 1742-55.
- HASSEN, W., EL GOLLI, E., BAUDRIMONT, I., MOBIO, A. T., LADJIMI, M. M., CREPPY, E. E. & BACHA, H. 2005. Cytotoxicity and Hsp 70 induction in Hep G2 cells in response to zearalenone and cytoprotection by sub-lethal heat shock. *Toxicology*, 207, 293-301.
- HAUS, E. 2007. Chronobiology in the endocrine system. *Adv Drug Deliv Rev*, 59, 985-1014.
- HENEWEER, M., HOUTMAN, R., POORTMAN, J., GROOT, M., MALIEPAARD, C. & PEIJNENBURG, A. 2007. Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology approach. *Toxicol Sci*, 99, 303-14.
- HENLEY, D. V. & KORACH, K. S. 2006. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology*, 147, S25-32.
- HIPFNER, D. R., DEELEY, R. G. & COLE, S. P. 1999. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta*, 6, 359-76.
- HIRAI, T., FUKUI, Y. & MOTOJIMA, K. 2007. PPARalpha agonists positively and negatively regulate the expression of several nutrient/drug transporters in mouse small intestine. *Biol Pharm Bull*, 30, 2185-90.

- HIROHASHI, T., SUZUKI, H., ITO, K., OGAWA, K., KUME, K., SHIMIZU, T. & SUGIYAMA, Y. 1998. Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in eisai hyperbilirubinemic rats. *Mol Pharmacol*, 53, 1068-75.
- HIROHASHI, T., SUZUKI, H. & SUGIYAMA, Y. 1999. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem*, 274, 15181-5.
- HITZL, M., KLEIN, K., ZANGER, U. M., FRITZ, P., NUSSLER, A. K., NEUHAUS, P. & FROMM, M. F. 2003. Influence of omeprazole on multidrug resistance protein 3 expression in human liver. *J Pharmacol Exp Ther*, 304, 524-30.
- HO, L. L., KENCH, J. G., HANDELSMAN, D. J., SCHEFFER, G. L., STRICKER, P. D., GRYGIEL, J. G., SUTHERLAND, R. L., HENSHALL, S. M., ALLEN, J. D. & HORVATH, L. G. 2008. Androgen regulation of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in prostate cancer. *Prostate*, 68, 1421-9.
- HONORAT, M., MESNIER, A., DI PIETRO, A., LIN, V., COHEN, P., DUMONTET, C. & PAYEN, L. 2008. Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 375, 308-14.
- HOOGENBOOM, L. A., BOKHORST, J. G., NORTHOLT, M. D., VAN DE VIJVER, L. P., BROEX, N. J., MEVIUS, D. J., MEIJS, J. A. & VAN DER ROEST, J. 2008. Contaminants and microorganisms in Dutch organic food products: a comparison with conventional products. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 25, 1195-207.
- HOOIJBERG, J. H., BROXTERMAN, H. J., KOOL, M., ASSARAF, Y. G., PETERS, G. J., NOORDHUIS, P., SCHEPER, R. J., BORST, P., PINEDO, H. M. & JANSEN, G. 1999. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res*, 59, 2532-5.
- HUFFMAN, J., GERBER, R. & DU, L. 2010. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*, 93, 764-76.
- HUSS, W. J., GRAY, D. R., GREENBERG, N. M., MOHLER, J. L. & SMITH, G. J. 2005. Breast cancer resistance protein-mediated efflux of androgen in putative benign and malignant prostate stem cells. *Cancer Res*, 65, 6640-50.
- HUSSEIN, H. S. & BRASEL, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-34.
- IMAI, Y., ASADA, S., TSUKAHARA, S., ISHIKAWA, E., TSURUO, T. & SUGIMOTO, Y. 2003. Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol*, 64, 610-8.

- INOKUCHI, A., HINOSHITA, E., IWAMOTO, Y., KOHNO, K., KUWANO, M. & UCHIUMI, T. 2001. Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. A transcriptional control of a plausible bile acid transporter. *J Biol Chem*, 276, 46822-9.
- INOSHITA, H., MASUYAMA, H. & HIRAMATSU, Y. 2003. The different effects of endocrine-disrupting chemicals on estrogen receptor-mediated transcription through interaction with coactivator TRAP220 in uterine tissue. *J Mol Endocrinol*, 31, 551-61.
- IQBAL, M., HO, H. L., PETROPOULOS, S., MOISIADIS, V. G., GIBB, W. & MATTHEWS, S. G. 2012. Pro-Inflammatory Cytokine Regulation of P-glycoprotein in the Developing Blood-Brain Barrier. *PLoS One*, 7, e43022.
- ITO, K., SUZUKI, H., HORIE, T. & SUGIYAMA, Y. 2005. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res*, 22, 1559-77.
- JAKIMIUK, E., GAJECKA, M., JANA, B., OBREMSKI, K. & GAJECKI, M. 2010. Effect of zearalenone on steroid secretion by porcine follicular cells in mono- and coculture. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54, 419-423.
- JANSEN, M. S., NAGEL, S. C., MIRANDA, P. J., LOBENHOFER, E. K., AFSHARI, C. A. & MCDONNELL, D. P. 2004. Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7199-204.
- JEAN, K. & BENMARHIA, T. 2011. Perturbateurs endocriniens et biodiversité. WWF France.
- JEDLITSCHKY, G., BURCHELL, B. & KEPPLER, D. 2000. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, 275, 30069-74.
- JEDLITSCHKY, G., LEIER, I., BUCHHOLZ, U., BARNOUIN, K., KURZ, G. & KEPPLER, D. 1996. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res*, 56, 988-94.
- JEDLITSCHKY, G., LEIER, I., BUCHHOLZ, U., CENTER, M. & KEPPLER, D. 1994. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res*, 54, 4833-6.
- JEFFERSON, W. N., PADILLA-BANKS, E., CLARK, G. & NEWBOLD, R. R. 2002. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777, 179-89.

- JIANG, S. Z., YANG, Z. B., YANG, W. R., GAO, J., LIU, F. X., CHEN, C. C. & CHI, F. 2010. Physiopathological effects of zearalenone in post-weaning female piglets with or without montmorillonite clay adsorbent. *Livestock Science*, 131, 130-136.
- JIGOREL, E., LE VEE, M., BOURSIER-NEYRET, C., PARMENTIER, Y. & FARDEL, O. 2006. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 34, 1756-63.
- JIRTLE, R. L. & SKINNER, M. K. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*, 8, 253-62.
- JODLBAUER, J., ZÖLLNER, P. & LINDNER, W. 2000. Determination of zearanol, taleranol, zearalenone, alpha and beta-zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 51, 681-687.
- JOHNSON, D. R. & KLAASSEN, C. D. 2002. Regulation of rat multidrug resistance protein 2 by classes of prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription pathways. *Toxicol Sci*, 67, 182-9.
- JOHNSON, K. J., HEGER, N. E. & BOEKELHEIDE, K. 2012. Of mice and men (and rats): phthalate-induced fetal testis endocrine disruption is species-dependent. *Toxicol Sci*, 19, 19.
- JOHNSTONE, R. W., RUEFLI, A. A. & SMYTH, M. J. 2000. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci*, 25, 1-6.
- JONES, S. R. & CYR, D. G. 2011. Regulation and characterization of the ATP-binding cassette transporter-B1 in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. *Toxicol Sci*, 119, 369-79.
- JULIANO, R. L. & LING, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 455, 152-62.
- KANORA, A. & MAES, D. 2009. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. *Veterinarni Medicina*, 54, 565-576.
- KAST, H. R., GOODWIN, B., TARR, P. T., JONES, S. A., ANISFELD, A. M., STOLTZ, C. M., TONTONNOZ, P., KLIEWER, S., WILLSON, T. M. & EDWARDS, P. A. 2002. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*, 277, 2908-15.
- KATZENELLENBOGEN, B. S. & KATZENELLENBOGEN, J. A. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2, 335-44.

- KATZENELLENBOGEN, B. S., MONTANO, M. M., EDIGER, T. R., SUN, J., EKENA, K., LAZENNEC, G., MARTINI, P. G., MCINERNEY, E. M., DELAGE-MOURROUX, R., WEIS, K. & KATZENELLENBOGEN, J. A. 2000. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res*, 55, 163-93; discussion 194-5.
- KAUFFMANN, H. M., PFANNSCHMIDT, S., ZOLLER, H., BENZ, A., VORDERSTEMANN, B., WEBSTER, J. I. & SCHRENK, D. 2002. Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology*, 171, 137-46.
- KAVLOCK, R. J., DASTON, G. P., DEROSA, C., FENNER-CRISP, P., GRAY, L. E., KAATTARI, S., LUCIER, G., LUSTER, M., MAC, M. J., MACZKA, C., MILLER, R., MOORE, J., ROLLAND, R., SCOTT, G., SHEEHAN, D. M., SINKS, T. & TILSON, H. A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*, 104 Suppl 4, 715-40.
- KELCE, W. R., MONOSSON, E., GAMCSIK, M. P., LAWS, S. C. & GRAY, L. E., JR. 1994. Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol*, 126, 276-85.
- KEPPLER, D. 2011. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 201, 299-323.
- KEPPLER, D. & KONIG, J. 2000. Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. *Semin Liver Dis*, 20, 265-72.
- KIM, I. H., SON, H. Y., CHO, S. W., HA, C. S. & KANG, B. H. 2003. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Lett*, 138, 185-92.
- KIM, Y. T., LEE, Y. R., JIN, J., HAN, K. H., KIM, H., KIM, J. C., LEE, T., YUN, S. H. & LEE, Y. W. 2005. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol*, 58, 1102-13.
- KIUCHI, Y., SUZUKI, H., HIROHASHI, T., TYSON, C. A. & SUGIYAMA, Y. 1998. cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett*, 433, 149-52.
- KLAASSEN, C. D. & ALEKSUNES, L. M. 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev*, 62, 1-96.
- KLEINOVA, M., ZOLLNER, P., KAHLBACHER, H., HOCHSTEINER, W. & LINDNER, W. 2002. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranone in urine, liver, and muscle of heifers. *J Agric Food Chem*, 50, 4769-76.

- KLOKOUZAS, A., WU, C. P., VAN VEEN, H. W., BARRAND, M. A. & HLADKY, S. B. 2003. cGMP and glutathione-conjugate transport in human erythrocytes. *Eur J Biochem*, 270, 3696-708.
- KOIKE, K., KAWABE, T., TANAKA, T., TOH, S., UCHIUMI, T., WADA, M., AKIYAMA, S., ONO, M. & KUWANO, M. 1997. A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res*, 57, 5475-9.
- KONIG, J., HARTEL, M., NIES, A. T., MARTIGNONI, M. E., GUO, J., BUCHLER, M. W., FRIESS, H. & KEPPLER, D. 2005. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer*, 115, 359-67.
- KONIG, J., NIES, A. T., CUI, Y., LEIER, I. & KEPPLER, D. 1999a. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 6, 377-94.
- KONIG, J., ROST, D., CUI, Y. & KEPPLER, D. 1999b. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology*, 29, 1156-63.
- KOOL, M., DE HAAS, M., SCHEFFER, G. L., SCHEPER, R. J., VAN EIJK, M. J., JUIJN, J. A., BAAS, F. & BORST, P. 1997. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 57, 3537-47.
- KOOL, M., VAN DER LINDEN, M., DE HAAS, M., SCHEFFER, G. L., DE VREE, J. M., SMITH, A. J., JANSEN, G., PETERS, G. J., PONNE, N., SCHEPER, R. J., ELFERINK, R. P., BAAS, F. & BORST, P. 1999. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6914-9.
- KORAICHI, F., VIDEMANN, B., MAZALLON, M., BENAHMED, M., PROUILLAC, C. & LECOEUR, S. 2012. Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver. *Toxicol Lett*, 211, 246-56.
- KORTENKAMP, A. 2008. Low dose mixture effects of endocrine disruptors: implications for risk assessment and epidemiology. *Int J Androl*, 31, 233-40.
- KOUADIO, J. H., MOBIO, T. A., BAUDRIMONT, I., MOUKHA, S., DANO, S. D. & CREPPY, E. E. 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 213, 56-65.

- KRESS, E., SAMARUT, J. & PLATEROTI, M. 2009. Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? *Mol Cell Endocrinol*, 313, 36-49.
- KRSKA, R., PETTERSSON, H., JOSEPHS, R. D., LEMMENS, M., MAC DONALD, S. & WELZIG, E. 2003. Zearalenone in maize: stability testing and matrix characterisation of a certified reference material. *Food Addit Contam*, 20, 1141-52.
- KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P. M. & WATANABE, H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol*, 7, 253-306.
- KUO, C. H., TAUB, D., HOFFSOMMER, R. D., WENDLER, N. L., URRY, W. H. & MULLENBACH, G. 1967. The resolution of (\pm)-zearalenone. Determination of the absolute configuration of the natural enantiomorph. *Chemical Communications (London)*, 761.
- KURZ, E. U., COLE, S. P. & DEELEY, R. G. 2001. Identification of DNA-protein interactions in the 5' flanking and 5' untranslated regions of the human multidrug resistance protein (MRP1) gene: evaluation of a putative antioxidant response element/AP-1 binding site. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 981-90.
- KUSHNER, P. J., AGARD, D. A., GREENE, G. L., SCANLAN, T. S., SHIAU, A. K., UHT, R. M. & WEBB, P. 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74, 311-7.
- KUSUHARA, H. & SUGIYAMA, Y. 2002. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release*, 78, 43-54.
- LAM, F. C., LIU, R., LU, P., SHAPIRO, A. B., RENOIR, J. M., SHAROM, F. J. & REINER, P. B. 2001. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem*, 76, 1121-8.
- LASSALLE, B., BASTOS, H., LOUIS, J. P., RIOU, L., TESTART, J., DUTRILLAUX, B., FOUCHET, P. & ALLEMAND, I. 2004. 'Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development*, 131, 479-87.
- LAUREN, D. R. & SMITH, W. A. 2001. Stability of the fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Addit Contam*, 18, 1011-6.
- LAZAROWSKI, A. J., GARCIA RIVELLO, H. J., VERA JANAVEL, G. L., CUNIBERTI, L. A., CABEZA MECKERT, P. M., YANNARELLI, G. G., MELE, A., CROTTOGINI, A. J. & LAGUENS, R. P. 2005. Cardiomyocytes of chronically ischemic pig hearts express the MDR-1 gene-encoded P-glycoprotein. *J Histochem Cytochem*, 53, 845-50.

- LEAZER, T. M. & KLAASSEN, C. D. 2003. The presence of xenobiotic transporters in rat placenta. *Drug Metab Dispos*, 31, 153-67.
- LEBLANC, J. C., TARD, A., VOLATIER, J. L. & VERGER, P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Addit Contam*, 22, 652-72.
- LEE, G. Y., CROOP, J. M. & ANDERSON, E. 1998a. Multidrug resistance gene expression correlates with progesterone production in dehydroepiandrosterone-induced polycystic and equine chorionic gonadotropin-stimulated ovaries of prepubertal rats. *Biol Reprod*, 58, 330-7.
- LEE, K., BELINSKY, M. G., BELL, D. W., TESTA, J. R. & KRUEH, G. D. 1998b. Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res*, 58, 2741-7.
- LEGGAS, M., ADACHI, M., SCHEFFER, G. L., SUN, D., WIELINGA, P., DU, G., MERCER, K. E., ZHUANG, Y., PANETTA, J. C., JOHNSTON, B., SCHEPER, R. J., STEWART, C. F. & SCHUETZ, J. D. 2004. Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol*, 24, 7612-21.
- LESLIE, E. M., DEELEY, R. G. & COLE, S. P. 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204, 216-37.
- LI, S., HURSTING, S. D., DAVIS, B. J., MCLACHLAN, J. A. & BARRETT, J. C. 2003. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbesterol-induced cancers. *Ann N Y Acad Sci*, 983, 161-9.
- LIN, H. K., ALTUWAIJRI, S., LIN, W. J., KAN, P. Y., COLLINS, L. L. & CHANG, C. 2002. Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 277, 36570-6.
- LING, V. & THOMPSON, L. H. 1974. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol*, 83, 103-16.
- LINTON, K. J. 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*, 22, 122-30.
- LINTON, K. J. & HIGGINS, C. F. 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch*, 453, 555-67.
- LIOI, M. B., SANTORO, A., BARBIERI, R., SALZANO, S. & URSINI, M. V. 2004. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat Res*, 557, 19-27.

- LONARD, D. M., TSAI, S. Y. & O'MALLEY, B. W. 2004. Selective estrogen receptor modulators 4-hydroxytamoxifen and raloxifene impact the stability and function of SRC-1 and SRC-3 coactivator proteins. *Mol Cell Biol*, 24, 14-24.
- LONG, G. G., DIEKMAN, M., TUIITE, J. F., SHANNON, G. M. & VESONDER, R. F. 1982. Effect of *Fusarium roseum* corn culture containing zearalenone on early pregnancy in swine. *Am J Vet Res*, 43, 1599-603.
- LONG, G. G. & DIEKMAN, M. A. 1984. Effect of purified zearalenone on early gestation in gilts. *J Anim Sci*, 59, 1662-70.
- LONG, G. G., TUREK, J., DIEKMAN, M. A. & SCHEIDT, A. B. 1992. Effect of zearalenone on days 7 to 10 post-mating on blastocyst development and endometrial morphology in sows. *Vet Pathol*, 29, 60-7.
- LUONGO, D., DE LUNA, R., RUSSO, R. & SEVERINO, L. 2008. Effects of four *Fusarium* toxins (fumonisin B(1), alpha-zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicol*, 52, 156-62.
- MAAROUFI, K., CHEKIR, L., CREPPY, E. E., ELLOUZ, F. & BACHA, H. 1996. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicol*, 34, 535-40.
- MAHER, J. M., CHENG, X., SLITT, A. L., DIETER, M. Z. & KLAASSEN, C. D. 2005a. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos*, 33, 956-62.
- MAHER, J. M., CHENG, X., TANAKA, Y., SCHEFFER, G. L. & KLAASSEN, C. D. 2006a. Hormonal regulation of renal multidrug resistance-associated proteins 3 and 4 (Mrp3 and Mrp4) in mice. *Biochem Pharmacol*, 71, 1470-8.
- MAHER, J. M., CHERRINGTON, N. J., SLITT, A. L. & KLAASSEN, C. D. 2006b. Tissue distribution and induction of the rat multidrug resistance-associated proteins 5 and 6. *Life Sci*, 78, 2219-25.
- MAHER, J. M., SLITT, A. L., CHERRINGTON, N. J., CHENG, X. & KLAASSEN, C. D. 2005b. Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug Metab Dispos*, 33, 947-55.
- MALEKINEJAD, H., MAAS-BAKKER, R. & FINK-GREMMELS, J. 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J*, 172, 96-102.
- MALIEPAARD, M., SCHEFFER, G. L., FANEYTE, I. F., VAN GASTELEN, M. A., PIJNENBORG, A. C., SCHINKEL, A. H., VAN DE VIJVER, M. J., SCHEPER, R. J. & SCHELLENS, J. H. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast

- cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*, 61, 3458-64.
- MAO, Q. 2008. BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm Res*, 25, 1244-55.
- MAO, Q. & UNADKAT, J. D. 2005. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *Aaps J*, 7, E118-33.
- MARIN, D. E., TARANU, I., BURLACU, R., MANDA, G., MOTIU, M., NEAGOE, I., DRAGOMIR, C., STANCU, M. & CALIN, L. 2011. Effects of zearalenone and its derivatives on porcine immune response. *Toxicol In Vitro*, 25, 1981-8.
- MARIN, D. E., TARANU, I., BURLACU, R. & TUDOR, D. S. 2010. Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. *Toxicol*, 56, 956-63.
- MARIN, M. L., MURTHA, J., DONG, W. & PESTKA, J. J. 1996. Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in EL-4 thymoma cells. *J Toxicol Environ Health*, 48, 379-96.
- MASSAAD, C., ENTEZAMI, F., MASSADE, L., BENAHMED, M., OLIVENNES, F., BAROUKI, R. & HAMAMAH, S. 2002. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 100, 127-37.
- MASSART, F., MEUCCI, V., SAGGESE, G. & SOLDANI, G. 2008. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *J Pediatr*, 152, 690-5, 695 e1.
- MASUYAMA, H. & HIRAMATSU, Y. 2004. Involvement of suppressor for Gal 1 in the ubiquitin/proteasome-mediated degradation of estrogen receptors. *J Biol Chem*, 279, 12020-6.
- MASUYAMA, H., HIRAMATSU, Y., KUNITOMI, M., KUDO, T. & MACDONALD, P. N. 2000. Endocrine disrupting chemicals, phthalic acid and nonylphenol, activate Pregnane X receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol*, 14, 421-8.
- MATSUMOTO, J., IWANO, H., INOUE, H., IWANO, N., YAMASHIKI, N. & YOKOTA, H. 2007. Metabolic barrier against bisphenol A in rat uterine endometrium. *Toxicol Sci*, 99, 118-25.
- MCALEER, M. A., BREEN, M. A., WHITE, N. L. & MATTHEWS, N. 1999. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*, 274, 23541-8.
- MCGRATH, T. & CENTER, M. S. 1987. Adriamycin resistance in HL60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 145, 1171-6.

- MEISSNER, K., SPERKER, B., KARSTEN, C., MEYER ZU SCHWABEDISSEN, H., SEELAND, U., BOHM, M., BIEN, S., DAZERT, P., KUNERT-KEIL, C., VOGELGESANG, S., WARZOK, R., SIEGMUND, W., CASCORBI, I., WENDT, M. & KROEMER, H. K. 2002. Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem*, 50, 1351-6.
- MEISTER, U. 2009. Fusarium toxins in cereals of integrated and organic cultivation from the Federal State of Brandenburg (Germany) harvested in the years 2000–2007. *Mycotoxin Research*, 25, 133-139.
- MELAINE, N. 2002. Multidrug Resistance Genes and P-Glycoprotein in the Testis of the Rat, Mouse, Guinea Pig, and Human. *Biol Reprod*, 67, 1699-1707.
- METZLER, M. 2010. Proposal for a uniform designation of zearalenone and its metabolites. *Mycotoxin Res*, 27, 1-3.
- METZLER, M., PFEIFFER, E. & HILDEBRAND, A. 2010. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal*, 3, 385-401.
- MEYER ZU SCHWABEDISSEN, H. E., GRUBE, M., HEYDRICH, B., LINNEMANN, K., FUSCH, C., KROEMER, H. K. & JEDLITSCHKY, G. 2005a. Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation. *Am J Pathol*, 166, 39-48.
- MEYER ZU SCHWABEDISSEN, H. E., JEDLITSCHKY, G., GRATZ, M., HAENISCH, S., LINNEMANN, K., FUSCH, C., CASCORBI, I. & KROEMER, H. K. 2005b. Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metab Dispos*, 33, 896-904.
- MEYERS, P. & HESSLER, W. 2007. *Does 'the dose make the poison? Extensive results challenge a core assumption in toxicology* [Online]. Environmental Health News: Environmental Health Sciences. Available: <http://www.environmentalhealthnews.org/sciencebackground/2007/2007-0415nmdrc.html>.
- MILES, C. O., ERASMUSON, A. F., WILKINS, A. L., TOWERS, N. R., SMITH, B. L., GARTHWAITE, I., SCAHILL, B. G. & HANSEN, R. P. 1996. Ovine metabolism of zearalenone to alpha-zearalanol (zeranol). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3244-3250.
- MIN, G., KIM, H., BAE, Y., PETZ, L. & KEMPER, J. K. 2002. Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). CAR inhibits ER-mediated signaling pathway by squelching p160 coactivators. *J Biol Chem*, 277, 34626-33.

- MINERVINI, F. & DELL'AQUILA, M. E. 2008. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mol Sci*, 9, 2570-84.
- MINERVINI, F., GIANNOCCARO, A., CAVALLINI, A. & VISCONTI, A. 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicol Lett*, 159, 272-83.
- MINERVINI, F., LACALANDRA, G. M., FILANNINO, A., NICASSIO, M., VISCONTI, A. & DELL'AQUILA, M. E. 2010. Effects of in vitro exposure to natural levels of zearalenone and its derivatives on chromatin structure stability in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 73, 392-403.
- MIROCHA, C. J., PATHRE, S. V. & ROBISON, T. S. 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol*, 19, 25-30.
- MIRSKI, S. E., GERLACH, J. H. & COLE, S. P. 1987. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res*, 47, 2594-8.
- MIYAGAWA, S., SATO, M. & IGUCHI, T. 2011. Molecular mechanisms of induction of persistent changes by estrogenic chemicals on female reproductive tracts and external genitalia. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127, 51-7.
- MNIF, W., PASCUSI, J. M., PILLON, A., ESCANDE, A., BARTEGI, A., NICOLAS, J. C., CAVAILLES, V., DUCHESNE, M. J. & BALAGUER, P. 2007. Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicol Lett*, 170, 19-29.
- MOFFIT, J. S., ALEKSUNES, L. M., MAHER, J. M., SCHEFFER, G. L., KLAASSEN, C. D. & MANAUTOU, J. E. 2006. Induction of hepatic transporters multidrug resistance-associated proteins (Mrp) 3 and 4 by clofibrate is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Pharmacol Exp Ther*, 317, 537-45.
- MOORE, L. B., MAGLICH, J. M., MCKEE, D. D., WISELY, B., WILLSON, T. M., KLIEWER, S. A., LAMBERT, M. H. & MOORE, J. T. 2002. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol*, 16, 977-86.
- MORAL, R., WANG, R., RUSSO, I. H., LAMARTINIERE, C. A., PEREIRA, J. & RUSSO, J. 2008. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinol*, 196, 101-12.
- MULLER, M., MEIJER, C., ZAMAN, G. J., BORST, P., SCHEPER, R. J., MULDER, N. H., DE VRIES, E. G. & JANSEN, P. L. 1994. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 13033-7.

- MUTOH, K., TSUKAHARA, S., MITSUHASHI, J., KATAYAMA, K. & SUGIMOTO, Y. 2006. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells. *Cancer Sci*, 97, 1198-204.
- NADAL, A., ROPERIO, A. B., LARIBI, O., MAILLET, M., FUENTES, E. & SORIA, B. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11603-8.
- NAGAOKA, R., IWASAKI, T., ROKUTANDA, N., TAKESHITA, A., KOIBUCHI, Y., HORIGUCHI, J., SHIMOKAWA, N., IINO, Y., MORISHITA, Y. & KOIBUCHI, N. 2006. Tamoxifen activates CYP3A4 and MDR1 genes through steroid and xenobiotic receptor in breast cancer cells. *Endocrine*, 30, 261-8.
- NEWBOLD, R. R. 2004. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicol Appl Pharmacol*, 199, 142-50.
- NEWBOLD, R. R., HANSON, R. B., JEFFERSON, W. N., BULLOCK, B. C., HASEMAN, J. & MCLACHLAN, J. A. 1998. Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis*, 19, 1655-63.
- NEWBOLD, R. R., PADILLA-BANKS, E. & JEFFERSON, W. N. 2006. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, 147, S11-7.
- NIES, A. T., JEDLITSCHKY, G., KONIG, J., HEROLD-MENDE, C., STEINER, H. H., SCHMITT, H. P. & KEPPLER, D. 2004. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience*, 129, 349-60.
- NIES, A. T., SPRING, H., THON, W. F., KEPPLER, D. & JEDLITSCHKY, G. 2002. Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system. *J Urol*, 167, 2271-5.
- NIKAIDO, Y., YOSHIZAWA, K., DANBARA, N., TSUJITA-KYUTOKU, M., YURI, T., UEHARA, N. & TSUBURA, A. 2004. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol*, 18, 803-11.
- NIKAIDO, Y., YOSHIZAWA, K., PEI, R. J., YURI, T., DANBARA, N., HATANO, T. & TSUBURA, A. 2003. Prepubertal zearalenone exposure suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis but causes severe endocrine disruption in female Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer*, 47, 164-70.

- NTP, N. T. P. 1982. Carcinogenesis Bioassay of Zearalenone (CAS No. 17924-92-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 235, 1-155.
- OBREMSKI, K., GAJECKI, M., ZWIERZCHOWSKI, W., BAKULA, T., APOZNANISKI, J. & WOJCIECHOESKI, J. 2003a. The level of zearalenone and α -zearalenol in the blood of gilts with clinical symptoms of toxicosis, fed diets with a low zearalenone content. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 12, 529-538.
- OBREMSKI, K., GAJECKI, M., ZWIERZCHOWSKI, W., ZIELONKA, L., OTROCKA-DOMAGALA, I., ROTKIEWICZ, T., MIKOLAJCZYK, A., GAJECKA, M. & POLAK, M. 2003b. Influence of zearalenone on reproductive system cell proliferation in gilts. *Pol J Vet Sci*, 6, 239-45.
- OGAWA, K., SUZUKI, H., HIROHASHI, T., ISHIKAWA, T., MEIER, P. J., HIROSE, K., AKIZAWA, T., YOSHIOKA, M. & SUGIYAMA, Y. 2000. Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278, G438-46.
- OLIVER, W. T., MILES, J. R., DIAZ, D. E., DIBNER, J. J., ROTTINGHAUS, G. E. & HARRELL, R. J. 2010. Zearalenone Increases Reproductive Tract Development, but not Skeletal Muscle Signaling in Prepubertal Gilts. *Journal of Animal Science*, 88(E-Supplement 2), 113.
- ORLANDO, E. F. & GUILLETTE, L. J., JR. 2007. Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. *Environ Res*, 104, 163-73.
- ORTIZ, D. F., LI, S., IYER, R., ZHANG, X., NOVIKOFF, P. & ARIAS, I. M. 1999. MRP3, a new ATP-binding cassette protein localized to the canalicular domain of the hepatocyte. *Am J Physiol*, 276, G1493-500.
- OTHMEN, Z. O., GOLLI, E. E., ABID-ESSEFI, S. & BACHA, H. 2008. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, α Zearalenol and β Zearalenol, on cultured Vero cells. *Toxicology*, 252, 72-7.
- OTT, M., FRICKER, G. & BAUER, B. 2009. Pregnane X receptor (PXR) regulates P-glycoprotein at the blood-brain barrier: functional similarities between pig and human PXR. *J Pharmacol Exp Ther*, 329, 141-9.
- OUANES, Z., ABID, S., AYED, I., ANANE, R., MOBIO, T., CREPPY, E. E. & BACHA, H. 2003. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. *Mutat Res*, 538, 63-70.
- OUANES, Z., AYED-BOUSSEMA, I., BAATI, T., CREPPY, E. E. & BACHA, H. 2005. Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17β -estradiol, progesterone and Vitamin E. *Mutat Res*, 565, 139-49.

- OZBURN, G. W. & MORRISON, F. O. 1962. Development of a DDT-tolerant strain of laboratory mice. *Nature*, 196, 1009-10.
- PALYUSIK, M., HARRACH, B., HORVATH, G. & MIROCHA, C. J. 1990. Experimental fusariotoxicosis of swine produced by zearalenone and T-2 toxins. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 10, 52-5.
- PAULUSMA, C. C., BOSMA, P. J., ZAMAN, G. J., BAKKER, C. T., OTTER, M., SCHEFFER, G. L., SCHEPER, R. J., BORST, P. & OUDE ELFERINK, R. P. 1996. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*, 271, 1126-8.
- PAZAITI, A., KONTOS, M. & FENTIMAN, I. S. 2012. ZEN and the art of breast health maintenance. *Int J Clin Pract*, 66, 28-36.
- PESTKA, J. J., TAI, J. H., WITT, M. F., DIXON, D. E. & FORSELL, J. H. 1987. Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem Toxicol*, 25, 297-304.
- PFEIFFER, E., HILDEBRAND, A., DAMM, G., RAPP, A., CRAMER, B., HUMPF, H. U. & METZLER, M. 2009. Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. *Mol Nutr Food Res*, 53, 1123-33.
- PFEIFFER, E., HILDEBRAND, A., MIKULA, H. & METZLER, M. 2010. Glucuronidation of zearalenone, zeranol and four metabolites in vitro: formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Mol Nutr Food Res*, 54, 1468-76.
- PFEIFFER, E., KOMMER, A., DEMPE, J. S., HILDEBRAND, A. A. & METZLER, M. 2011. Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zeranol in Caco-2 cells in vitro. *Mol Nutr Food Res*, 55, 560-7.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., CHEKIR-GHEDIRA, L. & BACHA, H. 1995. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis*, 16, 2315-20.
- POONACHA, K. B., WENTWORTH, B. C. & CHAPMAN, A. B. 1973. Genetic resistance to DDT in the Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*. *Poult Sci*, 52, 841-6.
- PRATT, S., SHEPARD, R. L., KANDASAMY, R. A., JOHNSTON, P. A., PERRY, W., 3RD & DANTZIG, A. H. 2005. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol Cancer Ther*, 4, 855-63.

- PRELUSKY, D. B., SCOTT, P. M., TRENHOLM, H. L. & LAWRENCE, G. A. 1990. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J Environ Sci Health B*, 25, 87-103.
- PRINS, G. S. 2008. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocr Relat Cancer*, 15, 649-56.
- PUNG, O. J., LUSTER, M. I., HAYES, H. T. & RADER, J. 1984. Influence of steroidal and nonsteroidal sex hormones on host resistance in mice: increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* after exposure to estrogenic hormones. *Infect Immun*, 46, 301-7.
- RADILOVA, H., LIBRA, A., HOLASOVA, S., SAFAROVA, M., VISKOVA, A., KUNC, F. & BUNCEK, M. 2009. COX-1 is coupled with mPGES-1 and ABCC4 in human cervix cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 330, 131-40.
- RAINEY, M. R., TUBBS, R. C., BENNETT, L. W. & COX, N. M. 1990. Prepubertal exposure to dietary zearalenone alters hypothalamo-hypophysial function but does not impair postpubertal reproductive function of gilts. *J Anim Sci*, 68, 2015-22.
- RALPH, J. L., ORGEBIN-CRIST, M. C., LAREYRE, J. J. & NELSON, C. C. 2003. Disruption of androgen regulation in the prostate by the environmental contaminant hexachlorobenzene. *Environ Health Perspect*, 111, 461-6.
- RAMOS, A. J., HERNÁNDEZ, E., PLÁ-DELFINA, J. M. & MERINO, M. 1996. Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. *International Journal of Pharmaceutics*, 128, 129-137.
- RANZENIGO, G., CALONI, F., CREMONESI, F., AAD, P. Y. & SPICER, L. J. 2008. Effects of Fusarium mycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. *Anim Reprod Sci*, 107, 115-30.
- RAZIN, A. & KANTOR, B. 2005. DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Prog Mol Subcell Biol*, 38, 151-67.
- REIK, W. & WALTER, J. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, 2, 21-32.
- REINEN, J., KALMA, L. L., BEGHEIJN, S., HEUS, F., COMMANDEUR, J. N. & VERMEULEN, N. P. 2011. Application of cytochrome P450 BM3 mutants as biocatalysts for the profiling of estrogen receptor binding metabolites of the mycotoxin zearalenone. *Xenobiotica*, 41, 59-70.
- RIORDAN, J. R. & LING, V. 1979. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem*, 254, 12701-5.

- RITTER, C. A., JEDLITSCHKY, G., MEYER ZU SCHWABEDISSEN, H., GRUBE, M., KOCK, K. & KROEMER, H. K. 2005. Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev*, 37, 253-78.
- RIUS, M., NIES, A. T., HUMMEL-EISENBEISS, J., JEDLITSCHKY, G. & KEPPLER, D. 2003. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology*, 38, 374-84.
- ROBEY, R. W., TO, K. K., POLGAR, O., DOHSE, M., FETSCH, P., DEAN, M. & BATES, S. E. 2009. ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 3-13.
- ROBILLARD, K. R., HOQUE, T. & BENDAYAN, R. 2012. Expression of ATP-binding cassette membrane transporters in rodent and human sertoli cells: relevance to the permeability of antiretroviral therapy at the blood-testis barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 340, 96-108.
- ROST, D., KONIG, J., WEISS, G., KLAR, E., STREMMEL, W. & KEPPLER, D. 2001. Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia. *Gastroenterology*, 121, 1203-8.
- ROTTER, B. A., THOMPSON, B. K., LESSARD, M., TRENHOLM, H. L. & TRYPHONAS, H. 1994. Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam Appl Toxicol*, 23, 117-24.
- RUEHLMANN, D. O., STEINERT, J. R., VALVERDE, M. A., JACOB, R. & MANN, G. E. 1998. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells. *FASEB J*, 12, 613-9.
- RYU, D., HANNA, M. A. & BULLERMAN, L. B. 1999. Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *J Food Prot*, 62, 1482-4.
- SALAH-ABBES, J. B., ABBES, S., ABDEL-WAHHAB, M. & OUESLATI, R. 2010a. Immunotoxicity of zearalenone in Balb/c mice in a high subchronic dosing study counteracted by Raphanus sativus extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 32, 628-36.
- SALAH-ABBES, J. B., ABBES, S., ABDEL-WAHHAB, M. A. & OUESLATI, R. 2010b. In-vitro free radical scavenging, antiproliferative and anti-zearalenone cytotoxic effects of 4-(methylthio)-3-butenyl isothiocyanate from Tunisian Raphanus sativus. *J Pharm Pharmacol*, 62, 231-9.
- SAVILLE, B., WORMKE, M., WANG, F., NGUYEN, T., ENMARK, E., KUIPER, G., GUSTAFSSON, J. A. & SAFE, S. 2000. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem*, 275, 5379-87.

- SCHARENBERG, C., MANNOWETZ, N., ROBEY, R. W., BRENDDEL, C., REPGES, P., SAHRHAGE, T., JAHN, T. & WENNEMUTH, G. 2009. ABCG2 is expressed in late spermatogenesis and is associated with the acrosome. *Biochem Biophys Res Commun*, 378, 302-7.
- SCHARENBERG, C. W., HARKEY, M. A. & TOROK-STORB, B. 2002. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99, 507-12.
- SCHEFFER, G. L., KOOL, M., DE HAAS, M., DE VREE, J. M., PIJNENBORG, A. C., BOSMAN, D. K., ELFERINK, R. P., VAN DER VALK, P., BORST, P. & SCHEPER, R. J. 2002. Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest*, 82, 193-201.
- SCHINKEL, A. H. & JONKER, J. W. 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 3-29.
- SCHOEVERS, E. J., SANTOS, R. R., COLENBRANDER, B., FINK-GREMMELS, J. & ROELEN, B. A. 2012. Transgenerational toxicity of Zearalenone in pigs. *Reprod Toxicol*, 34, 110-9.
- SCHUETZ, E. G., BRIMER, C. & SCHUETZ, J. D. 1998. Environmental xenobiotics and the antihormones cyproterone acetate and spironolactone use the nuclear hormone pregnenolone X receptor to activate the CYP3A23 hormone response element. *Mol Pharmacol*, 54, 1113-7.
- SCHUETZ, J. D., CONNELLY, M. C., SUN, D., PAIBIR, S. G., FLYNN, P. M., SRINIVAS, R. V., KUMAR, A. & FRIDLAND, A. 1999. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med*, 5, 1048-51.
- SCHUG, T. T., JANESICK, A., BLUMBERG, B. & HEINDEL, J. J. 2011. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127, 204-15.
- SEEGER, M. A. & VAN VEEN, H. W. 2009. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1794, 725-37.
- SEELING, K., DANICKE, S., UEBERSCHAR, K. H., LEBZIEN, P. & FLACHOWSKY, G. 2005. On the effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows. *Food Addit Contam*, 22, 847-55.
- SENIOR, A. E., AL-SHAWI, M. K. & URBATSCH, I. L. 1995. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett*, 377, 285-9.
- SENIOR, A. E. & BHAGAT, S. 1998. P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry*, 37, 831-6.

- SHEEHAN, D. M., WILLINGHAM, E., GAYLOR, D., BERGERON, J. M. & CREWS, D. 1999. No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? *Environ Health Perspect*, 107, 155-9.
- SHEFLIN, L., KEEGAN, B., ZHANG, W. & SPAULDING, S. W. 2000. Inhibiting proteasomes in human HepG2 and LNCaP cells increases endogenous androgen receptor levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 276, 144-50.
- SHIER, W. T., SHIER, A. C., XIE, W. & MIROCHA, C. J. 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol*, 39, 1435-8.
- SHIN, B. S., HONG, S. H., BULITTA, J. B., HWANG, S. W., KIM, H. J., LEE, J. B., YANG, S. D., KIM, J. E., YOON, H. S., KIM DO, J. & YOO, S. D. 2009. Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. *J Toxicol Environ Health A*, 72, 1406-11.
- SHIRE, J. G. 1976. The forms, uses and significance of genetic variation in endocrine systems. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 51, 105-41.
- SHONO, T., SUITA, S., KAI, H. & YAMAGUCHI, Y. 2004. 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, 217-9; discussion 217-9.
- SIGNORINI, M. L., GAGGIOTTI, M., MOLINERI, A., CHERICATTI, C. A., ZAPATA DE BASILICO, M. L., BASILICO, J. C. & PISANI, M. 2012. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food Chem Toxicol*, 50, 250-7.
- SILVEIRA, P. P., PORTELLA, A. K., GOLDANI, M. Z. & BARBIERI, M. A. 2007. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr (Rio J)*, 83, 494-504.
- SIMON, F. R., IWAHASHI, M., HU, L. J., QADRI, I., ARIAS, I. M., ORTIZ, D., DAHL, R. & SUTHERLAND, E. 2006. Hormonal regulation of hepatic multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) primarily involves the pattern of growth hormone secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G595-608.
- SINGH, A., WU, H., ZHANG, P., HAPPEL, C., MA, J. & BISWAL, S. 2010. Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Mol Cancer Ther*, 9, 2365-76.
- SKINNER, M. K., MANIKKAM, M. & GUERRERO-BOSAGNA, C. 2011. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol*, 31, 337-43.
- SMEETS, P. H., VAN AUBEL, R. A., WOUTERSE, A. C., VAN DEN HEUVEL, J. J. & RUSSEL, F. G. 2004. Contribution of multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2)

- to the renal excretion of p-aminohippurate (PAH) and identification of MRP4 (ABCC4) as a novel PAH transporter. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2828-35.
- SOARES, M. J., CHAKRABORTY, D., KARIM RUMI, M. A., KONNO, T. & RENAUD, S. J. 2012. Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*, 33, 233-43.
- SOLBACH, T. F., KONIG, J., FROMM, M. F. & ZOLK, O. 2006. ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med*, 16, 7-15.
- SPARREBOOM, A., VAN ASPEREN, J., MAYER, U., SCHINKEL, A. H., SMIT, J. W., MEIJER, D. K., BORST, P., NOOIJEN, W. J., BEIJNEN, J. H. & VAN TELLINGEN, O. 1997. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2031-5.
- ST-PIERRE, M. V., STALLMACH, T., FREIMOSER GRUNDSCHOBBER, A., DUFOUR, J. F., SERRANO, M. A., MARIN, J. J., SUGIYAMA, Y. & MEIER, P. J. 2004. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287, R1505-16.
- STEINBERG, R. M., JUENGER, T. E. & GORE, A. C. 2007. The effects of prenatal PCBs on adult female paced mating reproductive behaviors in rats. *Horm Behav*, 51, 364-72.
- STEINBERG, R. M., WALKER, D. M., JUENGER, T. E., WOLLER, M. J. & GORE, A. C. 2008. Effects of perinatal polychlorinated biphenyls on adult female rat reproduction: development, reproductive physiology, and second generational effects. *Biol Reprod*, 78, 1091-101.
- STOB, M., BALDWIN, R. S., TUIITE, J., ANDREWS, F. N. & GILLETTE, K. G. 1962. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*, 196, 1318.
- SU, L., MRUK, D. D. & CHENG, C. Y. 2011. Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *J Endocrinol*, 208, 207-23.
- SUTKEVICIENE, N., RISKEVICIENE, V., JANUSKAUSKAS, A., ZILINSKAS, H. & ANDERSSON, M. 2009. Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta Vet Scand*, 51, 53.
- SUZUKI, M., SUZUKI, H., SUGIMOTO, Y. & SUGIYAMA, Y. 2003. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem*, 278, 22644-9.
- SWEDENBORG, E., RUEGG, J., MAKELA, S. & PONGRATZ, I. 2009. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J Mol Endocrinol*, 43, 1-10.

- SYPECKA, Z., KELLY, M. & BRERETON, P. 2004. Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs. *J Agric Food Chem*, 52, 5463-71.
- SYVALA, H., VIENONEN, A., ZHUANG, Y. H., KIVINEVA, M., YLIKOMI, T. & TUOHIMAA, P. 1998. Evidence for enhanced ubiquitin-mediated proteolysis of the chicken progesterone receptor by progesterone. *Life Sci*, 63, 1505-12.
- SZAKACS, G., VARADI, A., OZVEGY-LACZKA, C. & SARKADI, B. 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today*, 13, 379-93.
- SZATMARI, I., VAMOSI, G., BRAZDA, P., BALINT, B. L., BENKO, S., SZELES, L., JENEY, V., OZVEGY-LACZKA, C., SZANTO, A., BARTA, E., BALLA, J., SARKADI, B. & NAGY, L. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem*, 281, 23812-23.
- TABB, M. M. & BLUMBERG, B. 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol*, 20, 475-82.
- TACHAMPA, K., TAKEDA, M., KHAMDANG, S., NOSHIRO-KOFUJI, R., TSUDA, M., JARIYAWAT, S., FUKUTOMI, T., SOPHASAN, S., ANZAI, N. & ENDOU, H. 2008. Interactions of Organic Anion Transporters and Organic Cation Transporters With Mycotoxins. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106, 435-443.
- TAKEMURA, H., SHIM, J. Y., SAYAMA, K., TSUBURA, A., ZHU, B. T. & SHIMOI, K. 2007. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 103, 170-7.
- TAKESHITA, A., KOIBUCHI, N., OKA, J., TAGUCHI, M., SHISHIBA, Y. & OZAWA, Y. 2001. Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription. *Eur J Endocrinol*, 145, 513-7.
- TANABE, N., KIMOTO, T. & KAWATO, S. 2006. Rapid Ca(2+) signaling induced by Bisphenol A in cultured rat hippocampal neurons. *Neuro Endocrinol Lett*, 27, 97-104.
- TANAKA, Y., SLITT, A. L., LEAZER, T. M., MAHER, J. M. & KLAASSEN, C. D. 2005. Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 326, 181-7.
- TENG, S., JEKERLE, V. & PIQUETTE-MILLER, M. 2003. Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug Metab Dispos*, 31, 1296-9.

- TEP, J. 2008. *Étude in vitro du transfert intestinal des fusariotoxines majeures : interactions avec les transporteurs membranaires de la famille ABC*. PhD science, Claude Bernard Lyon 1.
- THIEBAUT, F., TSURUO, T., HAMADA, H., GOTTESMAN, M. M., PASTAN, I. & WILLINGHAM, M. C. 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7735-8.
- THIGPEN, J. E., SETCHELL, K. D., PADILLA-BANKS, E., HASEMAN, J. K., SAUNDERS, H. E., CAVINESS, G. F., KISSLING, G. E., GRANT, M. G. & FORSYTHE, D. B. 2007. Variations in phytoestrogen content between different mill dates of the same diet produces significant differences in the time of vaginal opening in CD-1 mice and F344 rats but not in CD Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect*, 115, 1717-26.
- THUST, R., KNEIST, S. & HUHNE, V. 1983. Genotoxicity of Fusarium mycotoxins (nivalenol, fusarenon-X, T-2 toxin, and zearalenone) in Chinese hamster V79-E cells in vitro. *Arch Geschwulstforsch*, 53, 9-15.
- TIEMANN, U., BRUSSOW, K. P., DANNENBERGER, D., JONAS, L., POHLAND, R., JAGER, K., DANICKE, S. & HAGEMANN, E. 2008. The effect of feeding a diet naturally contaminated with deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) on the spleen and liver of sow and fetus from day 35 to 70 of gestation. *Toxicol Lett*, 179, 113-7.
- TIEMANN, U., TOMEK, W., SCHNEIDER, F. & VANSELOW, J. 2003. Effects of the mycotoxins alpha- and beta-zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. *Reprod Toxicol*, 17, 673-81.
- TOMASZEWSKI, J., MITURSKI, R., SEMCZUK, A., KOTARSKI, J. & JAKOWICKI, J. 1998. [Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium]. *Ginekol Pol*, 69, 363-6.
- TOMPKINS, L. M., LI, H., LI, L., LYNCH, C., XIE, Y., NAKANISHI, T., ROSS, D. D. & WANG, H. 2010. A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. *Biochem Pharmacol*, 80, 1754-61.
- TSAKMAKIDIS, I. A., LYMBEROPOULOS, A. G., ALEXOPOULOS, C., BOSCO, C. M. & KYRIAKIS, S. C. 2006. In vitro effect of zearalenone and alpha-zearalenol on boar sperm characteristics and acrosome reaction. *Reprod Domest Anim*, 41, 394-401.
- TSAKMAKIDIS, I. A., LYMBEROPOULOS, A. G., KHALIFA, T. A., BOSCO, C. M., SARATSI, A. & ALEXOPOULOS, C. 2008. Evaluation of zearalenone and alpha-zearalenol toxicity on boar sperm DNA integrity. *J Appl Toxicol*, 28, 681-8.

- TSAKMAKIDIS, I. A., LYMBEROPOULOS, A. G., VAINAS, E., BOSCO, C. M., KYRIAKIS, S. C. & ALEXOPOULOS, C. 2007. Study on the in vitro effect of zearalenone and alpha-zearalenol on boar sperm-zona pellucida interaction by hemizona assay application. *J Appl Toxicol*, 27, 498-505.
- TSUCHIYA, Y., NAKAJIMA, M. & YOKOI, T. 2005. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*, 227, 115-24.
- TURCOTTE, J. C., HUNT, P. J. & BLAUSTEIN, J. D. 2005. Estrogenic effects of zearalenone on the expression of progesterin receptors and sexual behavior in female rats. *Horm Behav*, 47, 178-84.
- UCHIUMI, T., HINOSHITA, E., HAGA, S., NAKAMURA, T., TANAKA, T., TOH, S., FURUKAWA, M., KAWABE, T., WADA, M., KAGOTANI, K., OKUMURA, K., KOHNO, K., AKIYAMA, S. & KUWANO, M. 1998. Isolation of a novel human canalicular multispecific organic anion transporter, cMOAT2/MRP3, and its expression in cisplatin-resistant cancer cells with decreased ATP-dependent drug transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 252, 103-10.
- UHR, M., HOLSBOER, F. & MULLER, M. B. 2002. Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both mdr1a and mdr1b P-glycoproteins. *J Neuroendocrinol*, 14, 753-9.
- UNDERHILL, K. L., ROTTER, B. A., THOMPSON, B. K., PRELUSKY, D. B. & TRENHOLM, H. L. 1995. Effectiveness of cholestyramine in the detoxification of zearalenone as determined in mice. *Bull Environ Contam Toxicol*, 54, 128-34.
- URRY, W. H., WEHRMEISTER, H. L., HODGE, E. B. & HIDY, P. H. 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 7, 3109-3114.
- VAHAKANGAS, K. & MYLLYNEN, P. 2009. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol*, 158, 665-78.
- VAN AUBEL, R. A., SMEETS, P. H., PETERS, J. G., BINDELS, R. J. & RUSSEL, F. G. 2002. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol*, 13, 595-603.
- VAN DE WETERING, K. & SAPTHU, S. 2012. ABCG2 functions as a general phytoestrogen sulfate transporter in vivo. *FASEB J*, 15, 15.
- VAN DER DOES, C. & TAMPE, R. 2004. How do ABC transporters drive transport? *Biol Chem*, 385, 927-33.

- VAN HERWAARDEN, A. E. & SCHINKEL, A. H. 2006. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 10-6.
- VAN KALKEN, C. K., BROXTERMAN, H. J., PINEDO, H. M., FELLER, N., DEKKER, H., LANKELMA, J. & GIACCONE, G. 1993. Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Br J Cancer*, 67, 284-9.
- VANDENBERG, L. N., COLBORN, T., HAYES, T. B., HEINDEL, J. J., JACOBS, D. R., JR., LEE, D. H., SHIODA, T., SOTO, A. M., VOM SAAL, F. S., WELSHONS, W. V., ZOELLER, R. T. & MYERS, J. P. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*, 33, 378-455.
- VENDRELL, J. A., MAGNINO, F., DANIS, E., DUCHESNE, M. J., PINLOCHE, S., PONS, M., BIRNBAUM, D., NGUYEN, C., THEILLET, C. & COHEN, P. A. 2004. Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation. *J Mol Endocrinol*, 32, 397-414.
- VIDEMANN, B., MAZALLON, M., PROUILLAC, C., DELAFORGE, M. & LECOEUR, S. 2009. ABCC1, ABCC2 and ABCC3 are implicated in the transepithelial transport of the myco-estrogen zearalenone and its major metabolites. *Toxicol Lett*, 190, 215-23.
- VLAMING, M. L., LAGAS, J. S. & SCHINKEL, A. H. 2009. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 14-25.
- VLATA, Z., PORICHIS, F., TZANAKAKIS, G., TSATSAKIS, A. & KRAMBOVITIS, E. 2006. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Lett*, 165, 274-81.
- VOM SAAL, F. S., AKINGBEMI, B. T., BELCHER, S. M., BIRNBAUM, L. S., CRAIN, D. A., ERIKSEN, M., FARABOLLINI, F., GUILLETTE, L. J., JR., HAUSER, R., HEINDEL, J. J., HO, S. M., HUNT, P. A., IGUCHI, T., JOBLING, S., KANNO, J., KERI, R. A., KNUDSEN, K. E., LAUFER, H., LEBLANC, G. A., MARCUS, M., MCLACHLAN, J. A., MYERS, J. P., NADAL, A., NEWBOLD, R. R., OLEA, N., PRINS, G. S., RICHTER, C. A., RUBIN, B. S., SONNENSCHNIG, C., SOTO, A. M., TALSNESS, C. E., VANDENBERGH, J. G., VANDENBERG, L. N., WALSER-KUNTZ, D. R., WATSON, C. S., WELSHONS, W. V., WETHERILL, Y. & ZOELLER, R. T. 2007. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*, 24, 131-8.
- VORE, M. & LEGGAS, M. 2008. Progesterone acts via progesterone receptors A and B to regulate breast cancer resistance protein expression. *Mol Pharmacol*, 73, 613-5.

- WALKER, D. M. & GORE, A. C. 2007. Endocrine-disrupting chemicals and the brain. *In: GORE, A. C. (ed.) Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice.*
- WALSH, D. E., DOCKERY, P. & DOOLAN, C. M. 2005. Estrogen receptor independent rapid non-genomic effects of environmental estrogens on $[Ca^{2+}]_i$ in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 230, 23-30.
- WANG, H., LEE, E. W., ZHOU, L., LEUNG, P. C., ROSS, D. D., UNADKAT, J. D. & MAO, Q. 2008. Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. *Mol Pharmacol*, 73, 845-54.
- WANG, H., WU, X., HUDKINS, K., MIKHEEV, A., ZHANG, H., GUPTA, A., UNADKAT, J. D. & MAO, Q. 2006a. Expression of the breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) in tissues from pregnant mice: effects of pregnancy and correlations with nuclear receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291, E1295-304.
- WANG, H., ZHOU, L., GUPTA, A., VETHANAYAGAM, R. R., ZHANG, Y., UNADKAT, J. D. & MAO, Q. 2006b. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17beta-estradiol in human placental BeWo cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290, 13.
- WASOWICZ, K., GAJECKA, M., CALKA, J., JAKIMIUK, E. & GAJECKI, M. 2005. Influence of chronic administration of zearalenone on the processes of apoptosis in the porcine ovary. *Veterinarni Medicina*, 50, 531-536.
- WATSON, C. S., JENG, Y. J. & GUPTARAK, J. 2011. Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127, 44-50.
- WELSHONS, W. V., NAGEL, S. C. & VOM SAAL, F. S. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147, S56-69.
- WELSHONS, W. V., THAYER, K. A., JUDY, B. M., TAYLOR, J. A., CURRAN, E. M. & VOM SAAL, F. S. 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect*, 111, 994-1006.
- WESTPHAL, K., WEINBRENNER, A., GIESSMANN, T., STUHR, M., FRANKE, G., ZSCHIESCHE, M., OERTEL, R., TERHAAG, B., KROEMER, H. K. & SIEGMUND, W. 2000. Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*, 68, 6-12.

- WETHERILL, Y. B., PETRE, C. E., MONK, K. R., PUGA, A. & KNUDSEN, K. E. 2002. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, 1, 515-24.
- WIJAYARATNE, A. L. & MCDONNELL, D. P. 2001. The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem*, 276, 35684-92.
- WIJNHOLDS, J., MOL, C. A., VAN DEEMTER, L., DE HAAS, M., SCHEFFER, G. L., BAAS, F., BEIJNEN, J. H., SCHEPER, R. J., HATSE, S., DE CLERCQ, E., BALZARINI, J. & BORST, P. 2000. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7476-81.
- WILLINGHAM, E. & CREWS, D. 2000. The Red-Eared Slider Turtle: An Animal Model for the Study of Low Doses and Mixtures. *American Zoologist*, 40, 421-428.
- WU, X., ZHANG, X., ZHANG, H., SU, P., LI, W., LI, L., WANG, Y., LIU, W., GAO, P. & ZHOU, G. 2012. Progesterone receptor downregulates breast cancer resistance protein expression via binding to the progesterone response element in breast cancer. *Cancer Sci*, 103, 959-67.
- XIONG, H., SUZUKI, H., SUGIYAMA, Y., MEIER, P. J., POLLACK, G. M. & BROUWER, K. L. 2002. Mechanisms of impaired biliary excretion of acetaminophen glucuronide after acute phenobarbital treatment or phenobarbital pretreatment. *Drug Metab Dispos*, 30, 962-9.
- YACOVINO, L. L., GIBSON, C. J. & ALEKSUNES, L. M. 2012. Down-Regulation of Brush Border Efflux Transporter Expression in the Kidneys of Pregnant Mice. *Drug Metab Dispos*, 15, 15.
- YAMANE, Y., FURUICHI, M., SONG, R., VAN, N. T., MULCAHY, R. T., ISHIKAWA, T. & KUO, M. T. 1998. Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *J Biol Chem*, 273, 31075-85.
- YANG, J., ZHANG, Y., WANG, Y. & CUI, S. 2007a. Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicol In Vitro*, 21, 558-65.
- YANG, J. Y., WANG, G. X., LIU, J. L., FAN, J. J. & CUI, S. 2007b. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol*, 24, 381-7.
- YASUDA, S., ITAGAKI, S., HIRANO, T. & ISEKI, K. 2005. Expression level of ABCG2 in the placenta decreases from the mid stage to the end of gestation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69, 1871-6.

- YOU, L., SAR, M., BARTOLUCCI, E., PLOCH, S. & WHITT, M. 2001. Induction of hepatic aromatase by p,p'-DDE in adult male rats. *Mol Cell Endocrinol*, 178, 207-14.
- YU, Z., HU, D. & LI, Y. 2004. Effects of zearalenone on mRNA expression and activity of cytochrome P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, 58, 187-93.
- YU, Z., ZHANG, L., WU, D. & LIU, F. 2005. Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, 62, 441-6.
- YUMBE-GUEVARA, B. E., IMOTO, T. & YOSHIZAWA, T. 2003. Effects of heating procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat. *Food Addit Contam*, 20, 1132-40.
- ZELCER, N., REID, G., WIELINGA, P., KUIL, A., VAN DER HEIJDEN, I., SCHUETZ, J. D. & BORST, P. 2003. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J*, 371, 361-7.
- ZHANG, Y., ZHOU, G., WANG, H., ZHANG, X., WEI, F., CAI, Y. & YIN, D. 2006. Transcriptional upregulation of breast cancer resistance protein by 17beta-estradiol in ERalpha-positive MCF-7 breast cancer cells. *Oncology*, 71, 446-55.
- ZHAO, C., DAHLMAN-WRIGHT, K. & GUSTAFSSON, J. A. 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*, 6, e003.
- ZHOU, S., SCHUETZ, J. D., BUNTING, K. D., COLAPIETRO, A. M., SAMPATH, J., MORRIS, J. J., LAGUTINA, I., GROSVELD, G. C., OSAWA, M., NAKAUCHI, H. & SORRENTINO, B. P. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 7, 1028-34.
- ZHOU, S. F., WANG, L. L., DI, Y. M., XUE, C. C., DUAN, W., LI, C. G. & LI, Y. 2008. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem*, 15, 1981-2039.
- ZINEDINE, A., SORIANO, J. M., MOLTO, J. C. & MANES, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol*, 45, 1-18.
- ZOLLNER, G., FICKERT, P., FUCHSBICHLER, A., SILBERT, D., WAGNER, M., ARBEITER, S., GONZALEZ, F. J., MARSCHALL, H. U., ZATLOUKAL, K., DENK, H. & TRAUNER, M. 2003. Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol*, 39, 480-8.
- ZWIERZCHOWSKI, W., PRZYBYLOWICZ, M., OBREMSKI, K., ZIELONKA, L., SKORSKA-WYSZYNSKA, E., GAJECKA, M., POLAK, M., JAKIMIUK, E.,

JANA, B., RYBARCZYK, L. & GAJECKI, M. 2005. Level of zearalenone in blood serum and lesions in ovarian follicles of sexually immature gilts in the course of zearalenone micotoxicosis. *Pol J Vet Sci*, 8, 209-18.

TITRE: ETUDE *IN VIVO/IN VITRO* DE L'EFFET DE LA ZEARALENONE SUR L'EXPRESSION DE TRANSPORTEURS ABC MAJEURS LORS D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE OU NEONATALE

RESUME

La zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine produite par des *Fusarium* qui contaminent les cultures céréalières. Oestrogéno-mimétique et perturbateur endocrinien, ses effets toxiques concernent l'appareil reproducteur. En amont de l'évaluation du risque lié à une exposition à de faibles doses de ZEN, nous nous sommes intéressés à l'effet de la ZEN sur le niveau d'expression de transporteurs ABC majeurs. Ces pompes d'efflux sont présentes dans les barrières de l'organisme (notamment les barrières testiculaires et placentaires) où elles jouent un rôle dans la protection des tissus contre la toxicité de leurs substrats xénobiotiques. Dans ce travail nous avons d'abord caractérisé le métabolisme et la distribution tissulaire de la ZEN chez le rat, puis avons évalué son effet respectivement à court et long terme sur l'expression des transporteurs ABC après une exposition gestationnelle et néonatale. Nos résultats mettent en évidence des différences de comportement toxicocinétique de la ZEN en fonction du genre et du statut hormonal, et une réelle exposition fœtale et néonatale via la mère. La ZEN module l'expression des transporteurs ABC majeurs *in vivo* (dans les organes maternels, le foie fœtal, le testicule du jeune adulte exposé J1-J5). Les résultats obtenus sur modèles *in vitro* (lignées sertolienne et placentaire) suggèrent que ces modulations sont liées en partie à l'interaction de la ZEN avec les récepteurs aux œstrogènes. Les conséquences d'une modulation de l'expression des transporteurs ABC induite par la ZEN pourraient être dramatiques pour le développement et la santé des individus à l'âge adulte et doivent être évaluées.

TITLE: *IN VIVO/IN VITRO* EFFECT OF ZEARALENONE ON MAJOR ABC TRANSPORTERS AFTER GESTATIONAL OR NEONATAL EXPOSURE.

ABSTRACT

Zearalenone (ZEN) is a mycotoxin produced by *Fusarium* that infect cereal crops. This Estrogen-mimetic and endocrine disruptor affects the reproductive system. Upstream of the risk assessment of exposure to low doses of ZEN, we are interested in the effect of ZEN on the expression level of major ABC transporters. These efflux pumps are present in the barriers of organism (including testicular and placental barriers), where they protect tissues against the toxicity of their xenobiotic substrates. In this work, we first characterized the metabolism and tissue distribution of ZEN in rat and then evaluated respectively its short and long-term effect on ABC transporters expression after gestational and neonatal exposure. Our results highlight differences in the toxicokinetic behavior of ZEN by gender and hormonal status, and fetal and neonatal real exposure via the mother. ZEN modulates the expression of major ABC transporters *in vivo* (in the maternal organs, fetal liver, testis of young adult exposed J1-J5). The results of *in vitro* models (sertoli and placental cell lines) suggest that these variations are partly due to the interaction of ZEN with the estrogen receptors. The consequences of expression modulations of ABC transporters induced by ZEN could be dramatic for the development and health of individuals in adulthood and should be evaluated.

DISCIPLINE: ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

MOTS-CLES: zéaralénone - transporteurs ABC - récepteurs nucléaires - mycotoxine oestrogénique-gestation - néonatalité

Unité INSERM U1060/ INRA 1235/ Université-Lyon1/ INSA-Lyon, Laboratoire de Recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition (CarMeN)